



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana* L. aplicando el método de secado por aspersión

Carlos Alberto Bernal Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2018

Desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana* L. aplicando el método de secado por aspersión

Carlos Alberto Bernal Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Química Farmacéutica M.Sc., Ph.D Yolima Baena Aristizábal

Codirector:

Químico M.Sc., Ph.D Freddy Alejandro Ramos Rodríguez

Líneas de Investigación:

Obtención de extractos estandarizados y Diseño y desarrollo de productos fitofarmacéuticos

Grupos 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

2018

A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta.

É uma viagem, nunca uma chegada.

Karl Popper

AGRADECIMIENTOS

Al SER SUPREMO, por darme la oportunidad y la fortaleza para culminar este ciclo en mi vida y permitirme llegar a este nuevo comienzo.

A mis padres por su apoyo incondicional en las etapas más difíciles de este proceso.

A Gil, Julio y Pedro por el apoyo y todo el amor que me brindaron durante mi estancia en Brasil.

A la profesora Yolima Baena por todas sus enseñanzas y su acertada dirección para la culminación de cada una de las etapas de esta tesis.

Al profesor Freddy Ramos por su amistad incondicional, su apoyo, su confianza, sus sabios consejos y toda la ayuda que me brindó para culminar con éxito la etapa fitoquímica de esta tesis.

A la profesora Valquiria Linck Vassani de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por recibirme con todo el afecto en su laboratorio y permitirme desarrollar parte de mi tesis durante mi pasantía en Brasil.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, por sus aportes a mi formación durante este proceso.

A todos mis compañeros y amigos en Colombia y en Brasil, por todos los aportes que me dieron tanto en mi formación profesional como en mi formación personal.

Especial agradecimiento a todos los integrantes de los Grupos de Investigación: Tecnología de Productos Naturales, Sistemas de Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas del Departamento de Farmacia, Estudio y aprovechamiento de Productos Naturales.

II Desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana* L. aplicando el método de secado por aspersión

Marinos y Frutas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por sus muestras de afecto y por cada uno de los aportes que me brindaron.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, sede Bogotá, por permitirme realizar mis estudios a nivel de Doctorado y por el apoyo económico a través de la beca Estudiante Sobresaliente de Posgrado.

A Colorcon por los materiales suministrados para el desarrollo de este trabajo.

.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un fitoterapéutico coadyuvante en el tratamiento de la diabetes con un extracto etanólico estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* L., mediante el método de secado por aspersión, permitiendo la liberación modificada del extracto a partir del sistema matricial.

Se estandarizó el extracto, incluyendo el aislamiento de marcadores terapéuticos y analíticos, utilizando una estrategia de fraccionamiento biodirigido por medio de un test *in vitro* de inhibición de la α -amilasa. El exudado que cubre los frutos mostró una actividad inhibitoria (AI) superior a la acarbosa, debida a los **Peruviósidos A-F**, que se presentan como marcadores terapéuticos. De la composición del extracto se seleccionaron glucosa y fructosa como marcadores analíticos, para los estudios posteriores.

Se empleó un diseño estadístico experimental para establecer las condiciones del secado por aspersión, para el co-procesamiento con el coadyuvante de secado. Bajo estas mismas condiciones, el extracto fue co-procesado con el coadyuvante de secado y el polímero seleccionado (HPMC K15M), para obtener el sistema de liberación modificada (SLM). La composición de los co-procesados con y sin polímero, presentaron buenas propiedades de flujo y compactación. La caracterización de los SLM, mostró una liberación modulada del extracto, siendo la concentración del polímero el factor que afectó su velocidad de liberación. El mecanismo de liberación encontrado es una combinación de la difusión del extracto y la erosión de la matriz. Los estudios de actividad *in-vitro* demostraron que los excipientes y el proceso no influyeron significativamente en la actividad farmacológica del extracto.

Palabras clave: *Physalis peruviana* L., ésteres de sacarosa, secado por aspersión, matrices hidrofílicas, mecanismo de liberación.

SUMMARY

The purpose of this work is to develop a phytotherapeutic product as a coadjuvant in the diabetes disease with a *Physalis peruviana* L. fruits ethanolic standardized extract, using a spray drying method, allowing the modified release of the extract from the matrix system.

The extract was standardized, including the isolation and identification of therapeutic and analytical compounds, using isolation and structural elucidation techniques, through the bioguide fractionation using an *in vitro* α -amylase inhibition test. It was found that the exudate covering of the fruit showed an inhibitory activity (IA), major than acarbose and it was attributed to the **Peruviosides A-F**, which are presented as therapeutic compounds. From the composition of the extract, glucose and fructose were selected as analytical compounds, for subsequent studies.

Statistical experimental design was employed to set the drying conditions. Extract was co-processing with the drying coadjuvant, by spray-drying method. Under the same conditions, the extract was co-processed with the drying coadjuvant and the selected polymer (HPMC K15M) to obtain the modified release system (MRS). It was established that the composition of the co-processed with and without polymer, presented good flow and compaction properties. The characterization of the MRS showed a modulated release of the extract, where the concentration of the polymer was a factor that affected its release rate. The mechanism of release was found to be a combination of diffusion of the extract and erosion of the matrix. The *in-vitro* studies showed that the excipients and the process did not significantly influence the pharmacological activity of the extract.

Key words: *Physalis peruviana* L., sucrose esters, spray drying, hydrophilic matrices, release mechanism.

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1. Aspectos generales	5
1.1 La diabetes y el empleo de plantas medicinales para la elaboración de fitoterapéuticos.	5
1.2 Desarrollo de un producto fitoterapéutico	7
1.3 Etapas del desarrollo de un medicamento fitoterapéutico.....	9
1.4 Estado del arte	11
1.4.1 <i>Formulación de extractos:</i>	11
1.5 Objetivos	21
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	21
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	21
Capítulo 2. Aislamiento e identificación de marcadores farmacológicos y analíticos del extracto de <i>Physalis peruviana</i>	23
2.1 <i>Physalis peruviana</i> L.	23
2.1.1 <i>Descripción, distribución y usos populares</i>	23
2.1.2 <i>Usos populares reportados</i>	24
2.1.3 <i>Actividad farmacológica</i>	25
2.1.4 <i>Estudios fitoquímicos</i>	26
2.2 Metodología	29
2.2.1 <i>Materiales</i>	29
2.2.2 <i>Equipos</i>	29
2.2.3 <i>Métodos</i>	30
2.3 Resultados y discusión.....	36
2.3.1 <i>Extracción, aislamiento y purificación</i>	36
2.3.2 <i>Elucidación estructural de los compuestos</i>	38
2.3.3 <i>Cuantificación de glucosa y fructosa por HPLC</i>	45
2.4 Conclusiones.....	52
Capítulo 3. Establecimiento de las condiciones del proceso para la obtención del extracto seco aplicando la metodología de secado por aspersión	55
3.1 Marco conceptual	55
3.1.1 <i>Características generales del extracto</i>	55
3.1.2 <i>Secado por aspersión (Spray Drying)</i>	57
3.2 Metodología	60
3.2.1 <i>Materiales</i>	60
3.2.2 <i>Equipos</i>	61
3.2.3 <i>Métodos</i>	62
3.3 Resultados y discusión de resultados.....	70
3.3.1 <i>Obtención del extracto fluido</i>	70

3.3.2	<i>Establecimiento de las condiciones de secado</i>	71	
3.3.3	<i>Evaluación final del proceso de secado</i>	85	
3.4	Conclusiones	92	
Capítulo 4. Selección del polímero para el desarrollo de un sistema de liberación modificada			93
4.1	Marco conceptual.....	93	
4.1.1	<i>Sistemas de liberación modificada (SLM)</i>	93	
4.1.2	<i>Co-procesados</i>	95	
4.2	Metodología	99	
4.2.1	<i>Materiales</i>	99	
4.2.2	<i>Equipos</i>	100	
4.2.3	<i>Métodos</i>	100	
4.3	Resultados y discusión de resultados	104	
4.3.1	<i>Selección de los posibles polímeros a partir de la revisión bibliográfica</i>	104	
4.3.2	<i>Elaboración del material co-procesado</i>	106	
4.3.3	<i>Preparación de las matrices y evaluación preliminar del comportamiento de liberación</i>	107	
4.4	Conclusiones	110	
Capítulo 5. Estudio del mecanismo y comportamiento fisicoquímico de la liberación del extracto a partir de un sistema tipo matriz hidrofílica			111
5.1	Marco conceptual.....	111	
5.1.1	<i>Sistemas de liberación modificada (SLM): Matrices hidrofílicas</i>	111	
5.1.2	<i>Mecanismo de liberación del principio activo a partir de matrices hidrofílicas</i>	114	
5.2	Metodología	116	
5.2.1	<i>Materiales</i>	116	
5.2.2	<i>Equipos</i>	117	
5.2.3	<i>Métodos</i>	122	
5.3	Resultados y discusión de resultados	131	
5.3.1	<i>Preparación y caracterización de los materiales co-procesados</i>	131	
5.3.2	<i>Evaluación del comportamiento y mecanismo de liberación</i>	141	
5.4	Conclusiones	157	
Conclusiones generales			161
Recomendaciones generales			163
Anexo A: Protocolo para evaluar la inhibición de alfa amilasa			165
Anexo B Validación de la metodología analítica para la cuantificación de glucosa y fructosa en el extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i>			167
Anexo C Espectros de masa obtenidos para cada uno de los compuestos purificados			187
Anexo D Espectros RMN obtenidos para cada uno de los compuestos purificados ..			191
Bibliografía			199

Lista de tablas

Tabla 1-1 Desarrollo de formulaciones a partir de extractos en diferentes formas farmacéuticas a nivel mundial	13
Tabla 2-1 Compuestos químicos aislados de <i>Physalis peruviana</i>	27
Tabla 2-2 Datos de RMN- ¹ H, RMN- ¹³ C y 2D-HMBC para los compuestos P1-P4 (CDCl ₃ , 400 MHz)	40
Tabla 2-3 Resumen de los resultados de la validación del método analítico por HPLC-IR, para los marcadores fructosa y glucosa.	51
Tabla 3-1 Matriz experimental para el secado del extracto.	63
Tabla 3-2 Niveles de las variables de operación para el DEE.	64
Tabla 3-3 Respuestas del diseño estadístico experimental.....	73
Tabla 3-4 Coeficientes estimados del modelo y valores p para los factores principales y combinación de dos factores.....	74
Tabla 3-5 Viscosidad de las suspensiones de partida para cada una de las dispersiones	75
Tabla 3-6 Resumen general para el proceso de secado	86
Tabla 3-7 Condiciones seleccionadas para el secado del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i>	86
Tabla 3-8 Resultados del experimento final bajo las condiciones de secado seleccionadas	87
Tabla 4-1 Polímeros utilizados en SLM tipo matriz hidrofílica.....	97
Tabla 4-2 Diferencias químicas de los polímeros derivados de celulosa utilizados.	98
Tabla 4-3 Óxido de polietileno WSR NF para aplicaciones farmacéuticas	99
Tabla 4-4 Formulaciones elaboradas para la selección del polímero	101
Tabla 4-5 Evaluación del rendimiento del proceso en términos de variaciones en la formulación (relación extracto / coadyuvante / polímero) y viscosidad de las formulaciones.....	106
Tabla 4-6 Factor de similitud para comparación de perfiles de liberación preliminar en la selección del polímero.....	108
Tabla 4-7 Análisis cinético de liberación de extracto a partir de las matrices formuladas con los diferentes polímeros de HPMC	109
Tabla 5-1 Formulaciones para la elaboración de las diferentes matrices hidrofílicas	118
Tabla 5-2 Composición de los medios de disolución a emplear en los ensayos de liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas.	123
Tabla 5-3 Modelos aplicados para la liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas.....	124
Tabla 5-4 Propiedades de los diferentes materiales co-procesados obtenidos por secado por aspersión para el polímero HPMC K15M.	128
Tabla 5-5 Parámetros y coeficientes de determinación para cada uno de los modelos cinéticos de liberación estudiados en las diferentes formulaciones de las matrices hidrofílicas.....	140
Tabla 5-6 Factor de similitud para comparación de perfiles en el estudio de liberación del extracto	142
Tabla 5-7 Comportamiento del proceso de captación de agua de la matriz hidrofílica correspondiente a la formulación 3-3	145
Tabla A-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa amilasa	160
Tabla B-1 Selectividad del sistema para la Fructosa	163

Tabla B-2 Selectividad del sistema para la Glucosa	163
Tabla B-3 Precisión del sistema y precisión intradía (Repetibilidad) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices para la fructosa (agua).....	164
Tabla B-4 Precisión intradía (Repetibilidad) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices para la glucosa	165
Tabla B-5 Precisión interdía (Precisión intermedia) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices a una concentración de 5.0 mg/mL para la fructosa (agua).....	166
Tabla B-6 Precisión interdía (Precisión intermedia) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices a una concentración de 5.0 mg/mL para la glucosa (agua)	167
Tabla B-7 Exactitud evaluada en cada una de las matrices, expresada como porcentaje de recuperación (5,0 mg/mL) para la fructosa (agua).....	168
Tabla B-8 Exactitud evaluada en cada una de las matrices, expresada como porcentaje de recuperación (5.0 mg/mL) para la glucosa (agua).....	168
Tabla B-9 Linealidad del sistema fructosa (agua).....	169
Tabla B-10 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el sistema (agua).....	170
Tabla B-11 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de fructosa en el sistema (agua)	170
Tabla B-12 Linealidad del sistema glucosa (agua).....	171
Tabla B-13 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de glucosa en el sistema (agua)	171
Tabla B-14 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de glucosa en el sistema (agua)	172
Tabla B-15 Evaluación de la linealidad del método para fructosa. Método 1: Matriz extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua)	172
Tabla B-16 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el método 1: Extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua)	173
Tabla B-17 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de fructosa en el método 1: Extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua).....	173
Tabla B-18 Evaluación de la linealidad del método para glucosa. Método 1: Matriz extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua)	174
Tabla B-19 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de glucosa en el método 1: Extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua).....	175
Tabla B-20 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de glucosa en el método 1: Extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i>	175
Tabla B-21 Evaluación de la linealidad del método para fructosa. Método 2: Matriz polímero HPMC K15M (agua).....	176
Tabla B-22 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua).....	176
Tabla B-23 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua).....	177
Tabla B-24 Evaluación de la linealidad del método para glucosa. Método 2: Matriz polímero HPMC K15M (agua).....	178
Tabla B-25 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de glucosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua).....	178
Tabla B-26 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de glucosa en el método 2: Polímero HPMC K15M	179
Tabla B-27 Limite de detección y límite de cuantificación para cada uno de los marcadores analíticos.....	180

Lista de figuras

Figura 2-1 <i>Physalis peruviana</i> L.....	24
Figura 2-2 Estructura química de algunos Withanólidos presentes en <i>P. peruviana</i>	26
Figura 2-3 Fraccionamiento de los frutos de <i>Physalis peruviana</i>	31
Figura 2-4 Esquema de fraccionamiento de la fracción FD a través de cromatografía en columna y HPLC semipreparativa.	32
Figura 2-5 Acarbosa	34
Figura 2-6 Actividad <i>in-vitro</i> de inhibición de α amilasa para el fraccionamiento del extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i>	37
Figura 2-7 Actividad <i>in-vitro</i> de inhibición de α amilasa para el fraccionamiento de FD... ..	37
Figura 2-8 Perfil cromatográfico UHPLC de la fracción FD8.....	38
Figura 2-9 Ésteres de sacarosa de los frutos de <i>Physalis peruviana</i>	42
Figura 2-10 Estructura propuesta y correlaciones importantes en HMBC para el compuesto P2.	42
Figura 2-11 Actividad <i>in-vitro</i> expresada de inhibición de α amilasa para los Peruviósidos A-F.	46
Figura 2-12 Perfil cromatográfico del extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (Detector ELSD)	47
Figura 2-13 Espectro de RMN- ¹ H en DMSO del extracto etanólico de <i>Physalis peruviana</i>	48
Figura 2-14 Perfil cromatográfico del extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> para la cuantificación de azúcares (en presencia de diferentes polímeros).....	49
Figura 2-15 Perfil cromatográfico del extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> para la cuantificación de azúcares (ejemplo de cromatograma correspondiente al estudio de la cinética de liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas).	49
Figura 3-1 Los procesos principales involucrados en el secado por aspersión.	58
Figura 3-2 Equipo para la determinación de la fluidez por el método del ángulo de reposo.	67
Figura 3-3 Curva de calibración para la obtención del extracto fluido.....	71
Figura 3-4 Microfotografías SEM.	79
Figura 3-5 Respuesta angular de fluidez	82
Figura 3-6 Diagrama de caja para cada factor de la respuesta angular.....	83
Figura 3-7 Extracto de <i>Physalis peruviana</i>	88
Figura 3-8 Termogramas DSC	89
Figura 3-9 Difractogramas de rayos X (DRX).....	90
Figura 3-10 Ensayo de actividad <i>in-vitro</i> de inhibición de α -amilasa.	91
Figura 4-1 Configuración estructural de la HPMC	98
Figura 4-2 Estructura básica del óxido de polietileno	99
Figura 4-3 Comportamiento de la formulación 6 frente al secado por aspersión	105
Figura 4-4 Liberación del extracto (% de fructosa y glucosa liberada) a partir de tabletas de Extracto:SiO ₂ y sistemas matriciales con diferentes tipos de HPMC, empleando como medio de liberación agua.....	107
Figura 5-1 Representación esquemática de una matriz hidrofílica después de determinado tiempo de hinchamiento, en donde se señalan las diferentes zonas.	116
Figura 5-2 Aparato de Enslin utilizado para la evaluación de la captación de agua (279)	125

Figura 5-3 Dispositivo de acrílico utilizado para la medición de los frentes de movimiento	127
Figura 5-4 Distribución del tamaño de partícula para las diferentes formulaciones.	130
Figura 5-5 Microfotografías SEM.	131
Figura 5-6 Curva de compactabilidad	133
Figura 5-7 Termogramas DSC.....	134
Figura 5-8 Difractogramas de rayos X (DRX).	136
Figura 5-9 Ensayo de actividad inhibición de alfa amilasa <i>in-vitro</i>	137
Figura 5-10 Gráficas del perfil de liberación del extracto de frutos de <i>P. peruviana</i> a partir de las diferentes formulaciones evaluadas	139
Figura 5-11 Gráficas del modelo de Peppas y Sahlin aplicado a cada uno de los tiempos de muestreo del perfil de liberación de fructosa de la formulación 3-3 (Ex:SiO ₂ :HPMC-K15M 55,2 : 41,4 : 3,4).....	141
Figura 5-12 Comportamiento de sorción de agua de la matriz hidrofílica a partir de la formulación 3-3 (Ex:SiO ₂ :HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%).....	144
Figura 5-13 Correlación entre la captación de agua y la liberación del extracto.....	146
Figura 5-14 Perfil de erosión para la matriz Ex:SiO ₂ :HPMC-K15M 1:0,75:0,0625 en función del tiempo.....	147
Figura 5-15 Correlaciones de la erosión de la matriz con la liberación del extracto y de la captación de agua con la erosión.....	148
Figura 5-16 Imagen de la matriz que contiene la formulación 3-3 (Ex:SiO ₂ :HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%), después de 240 minutos de hinchamiento.....	149
Figura 5-17 Frentes de movimiento de la matriz que contiene Ex:SiO ₂ :HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% en función del tiempo.....	150
Figura 5-18 Imágenes de los frentes de movimiento de la matriz Ex:SiO ₂ :HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% en función del tiempo.....	150
Figura 5-19 Espesor de la capa de gel	151
Figura B-1 Curva de calibración para fructosa en el sistema (agua).....	170
Figura B-2 Curva de calibración para glucosa en el sistema (agua)	172
Figura B-3 Curva de calibración para fructosa en el método 1: Extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua).....	174
Figura B-4 Curva de calibración para glucosa en el método 1: Extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> (agua).....	175
Figura B-5 Curva de calibración para fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua).....	177
Figura B-6 Curva de calibración para fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua).....	179

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
dL	Decilitro
L	Litro
f_1	Factor de diferenciación
f_2	Factor de similitud
nm	Nanómetros
mL	Mililitro
mUA	Miliunidades de absorbancia
m/z	Relación masa-carga
δ	Desplazamiento químico
J	Constante de acoplamiento
cps	Centipoise
<i>ppm</i>	Partes por millón
Hz	Hertz

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ANOVA	Análisis de varianza
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
IR	Índice de refracción
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
MS	Mass spectrometry – Espectrometría de Masas
ESI	Electrospray Ionization
APT	Attached Proton Test
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Correlation through multiple bond coherence

Abreviatura	Término
<i>COSY</i>	Correlation Spectroscopy
<i>NOESY</i>	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<i>ESI-MS</i>	Electrospray Ionization - Mass Spectrometry
<i>s</i>	Singlete
<i>br.s</i>	Singlete ancho
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble doblete
<i>ddd</i>	Doble doblete doblete
<i>t</i>	Triplete
<i>q</i>	Cuarteto
<i>sp</i>	Septete
<i>m</i>	Multiplete
<i>AcOEt</i>	Acetato de etilo
<i>BuOH</i>	Butanol
<i>EtOH</i>	Etanol
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>MeCN</i>	Acetonitrilo
<i>H₂O</i>	Agua
<i>PM</i>	Peso molecular (masa molar)
<i>DEE</i>	Diseño estadístico experimental
<i>CD</i>	Compresión directa
<i>Dvs</i>	Diámetro volumen-superficie promedio
<i>FFS</i>	Forma farmacéutica sólida
<i>HR</i>	Humedad relativa
<i>ICH</i>	International conference on harmonization
<i>IK</i>	Índice de Carr o Índice de consolidación
<i>WSR</i>	Resina hidrosoluble
<i>HPMC</i>	Hidroxipropil metilceulosa
<i>SLM</i>	Sistemas de liberación modificada
<i>SEM</i>	Microscopia electrónica de barrido
<i>DSC</i>	Calorimetría diferencial de barrido
<i>DRX</i>	Difracción de rayos X

Abreviatura	Término
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
NA	No aplica
NGS	Niveles de glucosa sanguínea
No.	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrogeniones
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

Introducción

La medicina tradicional se ha definido como la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, que se ha utilizado ampliamente para mantener la salud, prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales y que ha adquirido una gran importancia dentro de los sistemas sanitarios y de carácter económico en los últimos años (1).

En los países en desarrollo, la utilización generalizada de la medicina tradicional se puede atribuir al hecho de que está presente en el lugar y es muy asequible. En África, por ejemplo, la proporción de curanderos tradicionales por habitante es de 1:500, mientras que la de médicos por habitante es de 1:40000. Por lo tanto, para millones de personas de las zonas rurales, los curanderos siguen siendo los proveedores de atención sanitaria. En Asia y en Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. En China, la medicina tradicional contabiliza alrededor de un 40% de la atención sanitaria. En algunos países, como Singapur y Corea del Sur, en los que el sistema convencional de atención de salud está bien establecido, el 76% y el 86% de las respectivas poblaciones siguen recurriendo a la medicina tradicional (1).

Por otra parte, en muchos países desarrollados, la medicina tradicional se está haciendo cada vez más popular. El porcentaje de la población que ha utilizado este tipo de medicina al menos una vez al año es de un 48% en Australia, un 70% en Canadá, un 42% en EE.UU. un 38% en Bélgica y un 75% en Francia (1, 2).

Los países en desarrollo, que son los países en donde vive el 75% de la población mundial, consumen al menos el 15% del mercado total de medicamentos. La mayor parte de esta población no tiene acceso a los medicamentos industrializados, por lo que el uso de las plantas medicinales, como parte de la medicina tradicional, constituyen el único recurso terapéutico disponible para los sectores más pobres de la población. Considerando el

crecimiento demográfico constante en estos países, la importancia de las plantas medicinales y su uso se hace cada vez mayor (1, 2).

Según estimaciones, en 2012 las ventas de productos fitoterapéuticos alcanzaron los US\$ 83100 millones en la República de Corea, un incremento del 20% respecto al año anterior. En 2008, en los Estados Unidos, los usuarios pagaron US\$ 14800 millones para adquirir fitoterapéuticos, lo que demuestra que el empleo de plantas como materia prima para la producción de extractos y productos fitoterapéuticos, es un área en expansión (1).

En este contexto, los extractos estandarizados adquieren una importancia cada vez mayor pues garantizan una mejor caracterización analítica, permitiendo así que los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento, sean cumplidos de una manera más eficaz (1, 2).

La formulación de un extracto estandarizado en una forma farmacéutica determinada con miras al desarrollo de un producto fitoterapéutico, ofrece diversas dificultades tecnológicas relacionadas con las características físicas implícitas en la naturaleza de este material, asociado a los problemas de inestabilidad que puede tener un sistema multi-componente de esta clase. En este caso, a diferencia de los principios activos puros obtenidos por síntesis o por aislamiento de una fuente natural, los extractos son materias primas que contienen a la vez cantidades variables pero pequeñas de principio(s) activo(s) y gran cantidad de compuestos secundarios (sales orgánicas e inorgánicas, ácidos y bases orgánicas, saponinas, polifenoles, taninos, azúcares, polisacáridos, etc.), que influyen apreciablemente en la transformación tecnológica del extracto y en la estabilidad de la forma farmacéutica (2, 3).

Dentro de las formas farmacéuticas, los comprimidos ocupan un lugar de preferencia, pues las tabletas son las formas de dosificación más usadas en la medicina actual, incluyendo los productos fitoterapéuticos. Entre las ventajas que ofrecen los sólidos como forma de presentación de un fitoterapéutico se encuentran (2, 3):

- La vía de administración: En general para este tipo de forma farmacéutica se emplea la vía oral, lo que permite la administración del medicamento por el paciente mismo además de ofrecer comodidad y sencillez, lo que la convierte en el método más importante de administración de sustancias bioactivas destinadas a lograr efectos sistémicos, de modo

que se usa en el 90% de estos productos (2, 3).

- Dosificación exacta.
- Costo más bajo en comparación de las demás formas de dosificación oral.
- Mayor estabilidad.

En contraposición a lo anterior, pudieran citarse, entre otras, las siguientes desventajas (2, 3):

- Extractos o drogas que se oponen a la compresión generando comprimidos densos y poco resistentes a la abrasión a que deben ser sometidos durante su manipulación en el envasado y transporte.
- Drogas poco hidrosolubles, esto es, de pobre humectación y lenta desintegración / disolución, lo que podría dificultar su biodisponibilidad.
- Drogas que requieren altas dosis, con las consiguientes dificultades organolépticas y tecnológicas que esto ocasiona.

Todas estas dificultades, o la combinación de algunas de ellas, pueden disminuir la posibilidad de lograr el objetivo de obtener una forma farmacéutica adecuada.

De acuerdo a lo mencionado, se requiere de la aplicación de los conocimientos propios de la fitoquímica, la química analítica e instrumental, la farmacotecnia y la farmacología, que permitan el desarrollo de procedimientos que aproximen al investigador a la consecución exitosa de la formulación de un producto farmacéutico a partir de una droga en el menor tiempo y con el mínimo de recursos posibles.

En el presente trabajo, a partir de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana* L., el cual ha mostrado en estudios previos tener actividad hipoglicemiante, se pretende, mediante una metodología que incluye el diseño estadístico de experimentos, desarrollar la formulación del extracto, en un sistema de liberación modificada tipo matriz hidrofílica, aplicando el método de secado por aspersion (co-spray dry) y evaluar fisicoquímicamente el comportamiento de su liberación a partir de esta matriz, como parte del desarrollo de un producto fitoterapéutico, que en un futuro pueda comercializarse.

Capítulo 1. Aspectos generales

En este capítulo se hace un recorrido por las temáticas globales que enmarcan el presente trabajo, que incluyen la diabetes; las plantas medicinales que han sido estudiadas y a las cuales se les ha encontrado potencial hipoglicemiante, destacando el extracto de los frutos de *Physalis peruviana* L., motivo de este estudio; los aspectos asociados al desarrollo de un producto fitoterapéutico a partir de un extracto estandarizado y el estado del arte del desarrollo de productos fitoterapéuticos.

1.1 La diabetes y el empleo de plantas medicinales para la elaboración de fitoterapéuticos.

La diabetes es un conjunto de trastornos metabólicos caracterizada por un alto nivel de glucosa en sangre, resultado de defectos en la capacidad del cuerpo para producir o usar insulina. Se pueden diferenciar la diabetes tipo 1 y la tipo 2. La tipo 1 se refiere, en la mayor parte de los casos, a la diabetes resultante de la destrucción de las células β de los islotes pancreáticos y que es propensa a la cetoacidosis; se incluyen casos que pueden ser debidos a procesos autoinmunológicos y otros procesos desconocidos. La tipo 2, antes denominada diabetes no-insulinodependiente o diabetes de aparición a la edad adulta, es aquella presente en individuos que tienen una deficiencia relativa de insulina, o que en estos pacientes hay reducción de la masa de las células β , unida a un proceso secretor defectuoso. Estos pacientes no necesitan insulina para sobrevivir (4, 5).

La Federación Internacional de Diabetes indica que a nivel mundial el número de personas que padecían diabetes en el 2015 era de 415 millones y se espera que para el 2040 aumente a 642 millones, si no se toman medidas urgentes. Esto equivaldría a tres nuevos casos cada diez segundos o casi diez millones por año. Así mismo, la Federación Internacional de Diabetes ha estimado que unos 183 millones de personas no saben que

tienen diabetes. Sur y Centro América participan con el 4,5% de los gastos mundiales en diabetes (USD 20,8 billones), teniendo 25,1 millones de personas con esta enfermedad. A nivel de Suramérica, Brasil presenta el mayor número de personas diabéticas (12,4 millones), seguido por Colombia, Venezuela y Argentina (6-8). La mayoría de los diabéticos tienen diabetes tipo 2. En Estados Unidos, aproximadamente 90% de los diabéticos presentan este tipo de diabetes. La incidencia de esta última aumenta con la edad, con una tasa media alrededor de 440 casos /100000 habitantes por año, aumentando en varones mayores de sesenta años (6-8).

El control de la diabetes tipo 2 se centra en intervenciones del estilo de vida, la reducción de otros factores de riesgo cardiovascular y el mantenimiento de la glicemia en el rango normal. En este último aspecto, las plantas medicinales con potencial hipoglicemiante han tomado gran importancia, ya sea por el aislamiento de una gran variedad de compuestos a partir de ellas (alcaloides, glucósidos, flavonoides, terpenos, etc.), o por el empleo de su extracto que podría ser potencialmente empleado para el desarrollo de fitoterapéuticos; si bien es difícil encontrar entre las plantas un sustituto para la insulina, si es posible que se encuentren extractos de plantas que estimulen la biosíntesis y secreción de insulina endógena (9). En este contexto, el principal desafío es el desarrollo de fitoterapéuticos a partir de los extractos estandarizados, que permitan tener un producto seguro, eficaz y confiable basado en criterios de un diseño racional de este tipo de medicamentos (10).

Aunque existen datos limitados, la experiencia con pacientes diabéticos indica que usan plantas medicinales y se recurre a vendedores de hierbas locales, haciendo las veces de coadyuvantes en alcanzar la meta del control de la glicemia (9).

A pesar de la existencia de las diferentes opciones terapéuticas para su tratamiento, la diabetes, por ser una patología de tipo crónico, presenta como problema prevalente en la práctica clínica una falta de adherencia al tratamiento farmacológico o incumplimiento terapéutico. En general, se estima que un 20-50% de los pacientes no toma sus medicamentos como están prescritos, aunque la tasa de incumplimiento puede variar mucho según la patología. En el contexto de las enfermedades crónicas, la OMS considera la falta de adherencia un tema prioritario de salud pública debido a sus consecuencias negativas: fracasos terapéuticos, mayores tasas de hospitalización y aumento de los costos sanitarios. Así, en un estudio realizado sobre diabetes y enfermedad cardiaca, los pacientes con falta de adherencia tenían tasas de mortalidad significativamente más altas que los

pacientes cumplidores (12,1% vs 6,7%). En otro estudio en pacientes con diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia e insuficiencia cardiaca, encontraron que para todas estas patologías las tasas de hospitalización eran significativamente más altas en pacientes con baja adherencia (13% vs 30% para diabéticos; 19% vs 28% en hipertensión) (11, 12).

La simplificación del régimen posológico es quizá la intervención con mayores evidencias de eficacia. Una revisión sistemática en la Guía NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) (13), concluye que disminuir la frecuencia de dosificación en pacientes con enfermedades crónicas mejora la adherencia, prefiriéndose una vez al día frente a dos veces al día y tres veces al día.

En cuanto a posibilidad de desarrollo de fitoterapéuticos, el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales, sólo presenta tres especies que han sido aprobadas como hipoglicemiantes o antidiabéticas, entre las que se encuentran el marañón (*Anacardium occidentale* L.), la balsamina (*Momordica charantia* L.) y el casco de vaca (*Bauhinia variegata* L.) (14). Adicionalmente, el extracto de frutos de *P. peruviana*, en el que se centra la presente investigación, ha demostrado poseer actividad hipoglicemiante de acuerdo con trabajos previos realizados en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia al igual que por parte de otros investigadores en el ámbito internacional (15-18).

El desarrollo de un producto fitoterapéutico a partir del extracto de frutos de *P. peruviana*, como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes, pensando en un producto que permita un régimen de dosificación adecuado para que el paciente aumente la adherencia al tratamiento, constituye el tema central de esta investigación. En este sentido, la propuesta parte de desarrollar un sistema de liberación modificada para el extracto de *P. peruviana*, de tipo matriz hidrofílica, pretendiendo un acercamiento a su formulación, en lo concerniente a la fase preclínica, quedando pendiente otras etapas del desarrollo, correspondientes a las fases clínicas, para llegar a comercializarlo.

1.2 Desarrollo de un producto fitoterapéutico

La aplicación de los conocimientos y las metodologías para el desarrollo de productos fitoterapéuticos son similares a los requeridos para los medicamentos desarrollados a partir de principios activos de origen sintético, pero debido a su naturaleza, merecen

consideraciones y cuidados adicionales (2, 3).

El desarrollo de un fitoterapéutico involucra objetivos dirigidos a obtener un producto física y químicamente estable, tecnológicamente realizable y biológicamente disponible. Se requiere, en la mayoría de los casos, de la transformación tecnológica del extracto, esto es lograr un producto intermedio correspondiente al extracto estabilizado, que incluso podría constituir un producto comercializable; por ejemplo un solubilizado o el extracto absorbido en un sustrato. De acuerdo a las propiedades del extracto y a los fines propuestos en el diseño (vía de administración, población a la que va dirigida, entre otros), la presentación final del producto fitoterapéutico puede darse en cualquier sistema farmacéutico (2, 3, 19-22), tales como:

Formulaciones líquidas como gotas, jarabes, soluciones o suspensiones para cápsulas de gelatina blanda.

Formulaciones sólidas como los comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura y gránulos.

Preparaciones semisólidas para uso externo, como por ejemplo cremas, lociones y ungüentos.

Sistemas de entrega modificados como por ejemplo micropartículas, nanopartículas, parches transdérmicos, sistemas de tipo matricial, entre otros.

Independiente de la forma farmacéutica seleccionada, en un producto fitoterapéutico se busca cumplir con las siguientes consideraciones (2, 3):

- Debe ser aceptable para el paciente
- Debe ser química, física y microbiológicamente estable.
- Debe ser capaz de proporcionar una dosis correcta del (de los) ingrediente(s) activo(s)
- Debe ser terapéuticamente seguro y eficaz.
- El proceso de elaboración debe ser accesible para la fabricación a gran escala.

1.3 Etapas del desarrollo de un medicamento fitoterapéutico

El desarrollo de un producto fitoterapéutico a base de un extracto, (estable, tecnológicamente viable y biológicamente disponible), exige la aplicación del concepto de "Diseño Racional de Medicamentos", que incluye:

- *Los estudios de preformulación:* esta etapa comprende la recopilación de información relacionada con el extracto y con los excipientes a emplear en el diseño del producto. La búsqueda de información puede realizarse bibliográficamente y complementarla con ensayos de laboratorio, cuando no se disponga de este conocimiento en la literatura. Este tipo de revisiones debe estar dirigida al objetivo planteado, es decir, debe enfocarse al tipo de producto que se quiera diseñar; en otras palabras no toda la información que exista o se genere es útil para el fin propuesto. Para el caso del diseño de una forma farmacéutica sólida (FFS), la información requerida se enfoca a las propiedades relacionadas con el estado sólido como propiedades fisicoquímicas, la solubilidad y las propiedades farmacotécnicas en general, como tamaño y forma de las partículas, fluidez, densidad, compresibilidad de los materiales, entre otras (21, 23, 24). Adicionalmente, es indispensable disponer de la información de la estabilidad de los diferentes componentes que van a hacer parte de la formulación especialmente lo relacionado al extracto en cuestión, en el estado sólido y lo concerniente a la compatibilidad entre los componentes del extracto y los excipientes. A este nivel, se requiere contar con las metodologías analíticas necesarias para poder asegurar, mediante los análisis correspondientes la seguridad, eficacia y estabilidad del producto en las siguientes etapas (21, 23, 24). Además, como fruto de toda esta recopilación de información se obtienen las pautas a considerar en la implementación del proceso de fabricación del producto en las etapas posteriores (21, 23, 24).
- *Los estudios de formulación:* con la información recopilada en la etapa anterior, se realiza un análisis que permita determinar, de acuerdo a las propiedades del extracto y de los excipientes, los componentes más probables que podrían hacer parte de la fórmula cualitativa y cuantitativa que se ha de definir. Para la toma de este tipo de decisiones es conveniente hacer uso del diseño estadístico experimental (DEE) que permite realizar un manejo estadístico de la información obtenida a partir de él, con el fin de elegir una o unas posibles formulaciones, sin caer en el ensayo y error que implica

un mayor costo representado tanto en tiempo como en dinero. Como cualquier tipo de DEE, se requiere elegir unas variables o factores asociados a la formulación o al proceso que afecten una o más variables respuestas definidas de antemano con criterio farmacéutico. Algunos de los factores a considerar relacionados con la composición de la posible formulación serían: el tipo de excipientes, las proporciones en las que están presentes y el tipo de envase o inherentes al proceso de elaboración: el tipo de equipos y el método de procesamiento a emplear. Algunas de las variables respuesta de mayor interés podrían ser: la liberación de él o los componentes activos (marcadores en este caso), las propiedades farmacotécnicas, la estabilidad del producto y el mantenimiento de la actividad farmacológica. A este nivel, además de tener una posible formulación del producto, se cuenta con un procedimiento preliminar del proceso de fabricación a una escala laboratorio (23).

- *Los estudios de escalado del proceso de fabricación (23):* La finalidad de esta fase es definir todas las condiciones operacionales del proceso a una escala determinada y después de sucesivos escalados llegar a la escala industrial. Una vez en esta escala se estandariza y valida el proceso y de aquí en adelante se busca mediante un programa de garantía de calidad, asegurar que todos los parámetros se mantengan bajo control. Cuando se inicia esta etapa ya se tiene información acerca de una formulación cualitativa y cuantitativa del producto.

Sin embargo, en muchas ocasiones la definición del proceso que ha iniciado desde la formulación, a este nivel puede requerir ajustes, esto implica una retroalimentación continua entre las diferentes etapas de desarrollo de un producto, aunque aparentemente parezca ser un proceso que se lleve a cabo de manera secuencial. En esta última fase y en las previamente enunciadas es útil emplear herramientas como lo es el análisis de riesgos (25), que permita establecer los puntos críticos, sobre los cuales hay que realizar un seguimiento posterior.

Para el fin del presente trabajo, se pretende avanzar hasta la etapa de formulación, partiendo de información generada en un trabajo anterior (26), relacionado con la etapa de preformulación.

1.4 Estado del arte

1.4.1 Formulación de extractos

No son muchos los estudios disponibles en publicaciones científicas, aplicados al diseño y desarrollo de productos fitoterapéuticos, siendo este un tema que se ha empezado a abordar en los últimos años por parte de países en vía de desarrollo, especialmente Brasil e India, líderes en este contexto.

En la Tabla 1-1 se puede observar algunos estudios realizados con diferentes extractos, en los que se han desarrollado diversas formas farmacéuticas, desde sistemas convencionales hasta de liberación modificada.

De la revisión presentada en la Tabla 1-1, se puede observar que en las últimas décadas se han hecho grandes avances relacionados con el desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada para fármacos, los cuales han empezado a aplicarse a los extractos de origen vegetal. También llama la atención que sólo se encontraron dos trabajos de formulación de extractos con propiedades antidiabéticas, uno con *Ipomoea digitata* Linn (27) y el otro con *Cedrus deodara* (28), además de *P. peruviana* publicado recientemente (29).

Muchos de los estudios publicados se enfocan en sistemas coloidales como las nanopartículas, los liposomas, los fitosomas, las microesferas, entre otros (30-59); sin embargo, también se encuentran algunos sistemas matriciales de administración oral y transdérmica (60-64). Estos últimos, presentan como ventaja la facilidad en el escalado y por consiguiente una posibilidad de salir más rápidamente al mercado.

Los sistemas de liberación modificada tienen grandes ventajas sobre las formulaciones convencionales de activos y extractos vegetales que involucran mejoras en la solubilidad y la estabilidad, una mayor biodisponibilidad y la disminución de la toxicidad. Algunos estudios destacan la situación actual del desarrollo de nuevas formulaciones a base de extractos a partir de plantas y resumen su método de preparación, el tipo de extracto, los marcadores principales del extracto, la actividad biológica y las aplicaciones de las nuevas formulaciones (65). En la Tabla 1-1 se evidencia como las formas farmacéuticas

heterodispersas (66-89), y los sistemas convencionales sólidos (27, 28, 88, 90-99) son ampliamente investigados para la formulación de extractos, a diferencia de lo que ocurre con las formas farmacéuticas en solución (88, 100, 101), que desfavorecen la estabilidad.

A partir de esta revisión se puede evidenciar que la mayoría de estudios sobre el desarrollo de formulaciones con extractos vegetales, es realizada en países en vía de desarrollo caracterizados por su gran biodiversidad. Sin embargo, a pesar de la amplia biodiversidad que existe en Latinoamérica, no todos los países investigan en este campo. Se destacan países como Brasil y Argentina, siendo Brasil quien va a la vanguardia en este aspecto. En Colombia no existen muchos estudios publicados relacionados con el desarrollo de productos fitoterapéuticos y teniendo en cuenta la gran biodiversidad con que cuenta nuestro país, estos trabajos constituyen un excelente campo de investigación y de futuro desarrollo para el país.

De la misma manera, la viabilidad de desarrollar productos fitoterapéuticos de liberación modificada, como son las matrices hidrofílicas, muestran una posibilidad de llevar a largo plazo un medicamento de esta naturaleza al mercado con buenas probabilidades de poder ser comercializado, considerando las ventajas del proceso de manufactura que pueden hacerlo fácilmente escalable.

Tabla 1-1 Desarrollo de formulaciones a partir de extractos en diferentes formas farmacéuticas a nivel mundial

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
1	<i>Ipomoea digitata</i> Linn	-	Éter de petróleo, acetona, etanol o agua.	Antidiabético	Tabletas	Compresión	India	(27)
2	<i>Rhinacanthus nasutus</i>	-	Extracto metanólico crudo	Larvicida	Tabletas	Granulación húmeda	Tailandia	(90)
3	<i>Piper nigrum</i> y <i>Nyctanthes arbortristis</i>	-	Material vegetal en polvo	Antimalárico	Tabletas	Granulación por vía húmeda	India	(88)
4	<i>Valeriana officinalis</i>	-	Extracto fluido y Extracto seco (en un soporte sólido de dióxido de silicio)	Tratamiento de la ansiedad y el insomnio	Tabletas	Compresión directa	Argentina	(91)
5	<i>Peumus boldus</i>	Boldina	Extracto fluido y Extracto seco (en un soporte sólido de dióxido de silicio)	-	Tabletas	Granulación por vía húmeda y compresión.	Argentina	(92, 93)
6	<i>Begonia laciniata</i> , <i>Cuscuta epithimum</i> y <i>Dendrobium ovatum</i>	Flavonoides totales, fenoles totales y contenido de alcaloides	Extracto metanólico seco	Antioxidante	Tabletas	Compresión directa	India	(94)
7	<i>Cedrus deodara</i>	-	Extracto etanólico, (extracto crudo)	Antidiabético	Gránulos y Cápsulas	Granulación por vía seca	India	(28)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
8	<i>Physalis peruviana</i>	-	Extracto etanólico, (extracto crudo)	Hipoglicemiante	Gránulos	Absorción del extracto	Colombia	(29)
9	<i>Pothomorphe umbellata</i>	4-Nerolidilcatecol	Extracto hidroalcohólico	Antioxidante	Pellets	Extrusión y esferonización	Brasil	(96)
10	<i>Asparagus racemosus</i> , <i>Cyperus</i> , <i>Musa paradisiac</i> y <i>Psidium guava</i>	-	Extracto seco hidroalcohólico	Galactogogo	Cápsulas	Granulación vía húmeda	India	(97)
11	<i>Adhatoda vasica</i>	Vasicina y vasicinona	Extracto seco acuoso (liofilizado)	Antimalárico	Cápsulas	Obtención del extracto seco y encapsulado	India	(98)
12	<i>Leonotis leonorus</i>	Flavonoides (Apogenia y luteolina)	Extracto acuoso seco (liofilizado)	Antitusivo	Cápsulas	Obtención del extracto seco y encapsulado.	Sur África	(99)
	<i>Mentha longifolia</i>	Flavonoides (Apogenia y luteolina)	Extracto acuoso seco (liofilizado)	Antiespasmódico	Cápsulas	Obtención del extracto seco y encapsulado.	Sur África	(99)
13	<i>Pluchea lanceolata</i> , <i>Vitex negundo</i> , <i>Solanum xanthocarpum</i> , <i>Cleorodandrum phlomoides</i> y <i>Curcuma longa</i>	-	Aceite	Antiinflamatorio	Aceite	Arrastre con vapor	India	(101)
14	<i>Piper nigrum</i> y <i>Nyctanthes arbortristis</i>	-	Decocción con agua	Antimalárico	Jarabe	Mezcla simple	India	(88)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
15	<i>Pothomorphe umbellata</i> (L.)	4-nerolidilcatecol	Extracto hidroalcohólico (1:1)- liofilizado (seco)	Antioxidante	Emulsión tópica	Emulsificación.	Brasil	(66)
16	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Allium sativum</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> , <i>Mentha spicata</i> y <i>Mentha piperita</i>	Compuestos volátiles	Aceites esenciales	Antibacterial	Emulsión tópica	Emulsificación.	Irán	(67)
17	<i>Sechium edule</i>	Compuestos fenólicos	Extracto hidroalcohólico Fluido	Antibacterial y antifúngico	Emulgel tópico	Formación del emulgel <i>in-situ</i>	Argentina	(68)
18	<i>Brucea javanica</i>	Aceite esencial	Aceite esencial	Anticancerígeno	Emulsión intravenosa	Emulsificación por ultraturrax.	China	(69)
	<i>Coix lacryma-jobi</i> L	Aceite	Expresión de las semillas	Anticancerígeno	Emulsión intravenosa	Emulsificación por ultraturrax	China	(69)
19	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	-	Extracto (hídoroalcohólico por maceración)	Antifúngico	Crema	Emulsificación <i>in-situ</i>	Irán	(71)
20	<i>Launaea intybacea</i>	-	Fracción enriquecida de taninos, fracción enriquecida de flavonoides	Antiacné	Crema	Emulsificación <i>in-situ</i>	India	(73)
21	<i>Evodia rutaecarpa</i>	Evodiamina y rutaecapina (alcaloides)	Extracto seco hidroalcohólico	Analgésico de uso tópico	Crema	Emulsificación <i>in-situ</i>	China	(76)
22	<i>Aleurites moluccana</i>	-	Extracto hidroalcohólico seco	Analgésico y antiinflamatorio	Crema	Emulsificación <i>in-situ</i>	Brasil	(78)
23	<i>Butea monosperma</i>	Flavonoides	Extracto etanólico (varias concentraciones)	Aliviar sensación de ardor, en el tratamiento de la gota, la lepra	Gel	Gelificación <i>in-situ</i>	India	(80)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
24	<i>Clerodendron infortunatum</i>	-	Extracto fluido (acuoso)	Antiinflamatorio	Gel	Gelificación <i>in-situ</i>	India	(81)
25	<i>Calophyllum inophyllum</i>	-	Extracto fluido (etanólico)	Antiinflamatorio	Gel	Gelificación <i>in-situ</i>	India	(82)
26	<i>Cacalia hastata</i> L.	Alcaloides totales, carotenoides totales y taninos totales	Extracto blando	Cicatrizante	Gel	Gelificación <i>in-situ</i>	Malasia	(83)
27	<i>Albezia lebeck</i> Linn	-	Extracto acuoso, etanólico y petróleo éter de petróleo en varias concentraciones	Tratamiento de la psoriasis	Gel	Gelificación <i>in-situ</i>	India	(85)
28	<i>Crataegus monogyna</i>	Fenoles totales y flavonoides totales	Extracto metanólico seco	Antioxidante	Gel hidrosoluble	Gelificación <i>in-situ</i>	Portugal	(86)
29	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	Polifenoles totales y taninos totales	Extracto oleoso	Tratamiento de quemaduras, cicatrizante	Ungüento	Emulsificación <i>in-situ</i>	Italia	(87)
30	<i>Piper nigrum</i> y <i>Nyctanthes arbortristis</i>	-	Material vegetal en polvo	Antimalárico	Suspensión	Mezcla simple	India	(88)
31	<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Jasminum officinale</i> y <i>Mentha piperita</i>	-	Extracto fluido acuoso	Tratamiento de úlceras bucales	Jalea	Mezcla simple	India	(89)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
32	<i>Tamarindus indica</i>	Alfa hidroxiácidos	Fluido (Acuoso)	-	Parche transdérmico	Agitación constante, formación del hidrogel <i>in-situ</i>	Tailandia	(30, 31)
33	<i>Silybum marianum</i>	Silimarina	-	Hepatoprotector	Liposomas	Técnica de evaporación reversa	Tailandia	(32)
34	<i>Artemisia arborescens L</i>	Aceite esencial de <i>Artemisia arborescens</i>	Obtención del aceite esencial por arrastre con vapor	Antiviral	Liposomas	Formación de película y sonicación	Italia	(33)
35	<i>Sophora alopecuroides</i>	Alcaloides (Soforidina, matrina, sofocarpina, lemannina)	Extracto seco	Antiendotóxico, anticancerígeno y antiinflamatorio	Etosomas	Carga pasiva y carga activa	China	(34)
36	<i>Ginkgo biloba</i>	Flavonoides	-	Antioxidante, cardioprotector	Fitosomas	Complejación de fosfolípidos	India	(35)
37	<i>Cuscuta chinensis</i>	Flavonoides y lignanos	Reflujo con etanol, extracto seco liofilizado	Hepatoprotector	Nanopartículas	Formación de nanosuspensión y evaporación del solvente	Taiwán	(36)
38	<i>Mukia scabrella</i>	-	Extracto acuoso	Antimicrobiano	Nanopartículas	Biosíntesis	India	(37)
39	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Ácido salvianólico	Extracto seco	Homeostático, tratamiento de enfermedades coronarias, como angina de pecho e infarto agudo del miocardio	Nanopartículas	Secado por aspersión	China	(38)
40	<i>Ginkgo biloba</i>	Gincósidos	Extracto fluido etanólico absorbido en una resina porosa	Activación de la función cerebral	Nanopartículas	Homogenización por alta presión	Japón	(39)
41	<i>Carum copticum</i>	Timol, γ -terpineno y p -cimeno	Aceite esencial	Antioxidante y antibacterial	Nanopartículas	Gelación por emulsificación iónica	Irán	(40)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
42	<i>Curcuma longa</i>	Curcuminoides y curcumina	Extracto acuoso seco	Antiinflamatorio	Nanopartículas	Método de emulsificación por fusión en caliente	Brasil	(41)
43	<i>Callendula officinalis</i>	Ésteres de faradiol, y carotenos	Extracto obtenido por fluido supercrítico	Antiinflamatorio	Nanopartículas lipídicas	Dilución de una microemulsión	España	(42)
44	<i>Curcuma zedoaria</i>	Aceite esencial de cúrcuma	Aceite esencial	Hepatoprotector, anticancerígeno y antibacterial	Nanoemulsión	Emulsificación <i>in situ</i>	China	(43)
45	<i>Callendula officinalis</i>	Quercetina, α , β , y γ Tocoferol	Aceite	Antioxidante	Nanoemulsión	Emulsificación <i>in situ</i>	Turquía	(44)
46	<i>Lippia sidoides</i>	Fenoles totales	Aceite esencial	Antimicrobiano	Nanocápsulas	Método de difusión de la emulsión	Brasil	(45)
47	<i>Crocus sativus</i>	Crocina, picrocrocina y safranal	Extracto acuoso	-	Nanocápsulas	Secado por aspersión	Irán	(46)
48	<i>Aronia melanocarpa</i> L.	Polifenoles totales	Extracto hidroalcohólico	Antioxidante	Micropartículas	Extrusión electrostática	Serbia	(48)
49	<i>Paullinia cupana</i>	Catequina y epicatequina	Extracto semipurificado	Antidepresivo Antioxidante	Micropartículas	Secado por aspersión	Brasil	(49)
50	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ácido Glicirricínico	Extracto seco	Antitumoral	Micropartículas	Precipitación por adición de un no-solvente	China	(50)
51	<i>Physalis peruviana</i>	Rutina	Extracto etanólico	Antioxidante	Micropartículas	emulsificación – evaporación del solvente	Colombia	(102)
52	<i>Cassia alata</i>	-	Extracto seco (acuoso)	Fungicida	Microencapsulado	Evaporación múltiple emulsión-solvente	Malasia	(51)
53	<i>Terminalia arjuna</i> , <i>Withania somnifera</i> , <i>Bacopamonnieri</i> y	-	Extracto seco (hidroalcohólico)	Tratamiento del estrés	Microencapsulado	Adición de un no-solvente	India	(52)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
	<i>Convolvulus pluricaulis</i>							
54	<i>Taraxacum officinale</i> L.	Polifenoles y β -caroteno	Extracto acuoso	Antioxidante	Microencapsulado	Secado por aspersión	Croacia	(53)
55	<i>Tagetes erecta</i> L.	Luteína	-	Antioxidante	Microencapsulado	Secado por aspersión	India	(54)
56	<i>Stevia rebaudiana</i>	Polifenoles totales	Extracto acuoso	Antioxidante	Microencapsulado	Extrusión	Brasil	(55)
57	<i>Paeonia rockii</i>	Ácido gálico	Extracto acuoso	Antioxidante y antifúngico	Microencapsulado	Secado por aspersión	Italia	(56)
58	<i>Ginkgo biloba</i>	Gincósidos, quercetina, kampferol,	Extracto seco	Antioxidante, tratamiento de enfermedad cardiovascular y neurodegenerativa	Dispersión sólida	Secado por aspersión y extrusión por fusión	China	(57)
60	<i>Echinacea angustifolia</i> , <i>Pestacia lentiscus</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> y <i>Salvia officinalis</i>	-	Extracto seco	Tratamiento de la halitosis	Tableta mucoadhesiva	Compresión	Israel	(61)
59	<i>Bidens pilosa</i>	Polifenoles totales	Extracto seco	Antioxidante	Tableta mucoadhesiva	Compresión	Brasil	(60)
61	<i>Hamamelis virginiana</i>	Taninos totales	Extracto acuoso	Tratamiento de la vena varicosa crónica	Matriz hidrofílica	Secado por aspersión	Argentina	(62)
62	<i>Kaempferia parviflora</i>	Metoxi flavonas	Extracto etanólico	antiinflamatorio	Microemulsión	Emulsificación con ultraturax	Tailandia	(58)

Estudio	Especie vegetal	Marcadores	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Forma farmacéutica	Tecnología aplicada	País	Ref.
63	<i>Clerodendrum petasites</i>	Ácido vanílico, verbascósido, nepetins y hispidulina	Extracto etanólico	Enfermedades cutáneas	Crema aceite en agua y loción transdérmica	Emulsificación	Tailandia	(59)
64	<i>Zingiber cassumunar</i>	Compuesto D; (E)-4-(30,40-dimethoxifenil	Extracto etanólico	Antiinflamatorio	Parche transdérmico	Evaporación del solvente	Tailandia	(63)
65	<i>Ocotea duckei</i> Vattimo (Lauraceae)	Yangambina y epi-yangambina	-	Tratamiento de la leishmaniasis	Parche transdérmico	Método de formación de microemulsión	Brasil	(64)

Teniendo en cuenta el marco conceptual presentado, se plantearon los siguientes objetivos para esta investigación:

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema de liberación modificada tipo matriz hidrofílica a partir de un extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* L. empleando la técnica de secado por aspersión.

1.5.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones del proceso para la obtención del extracto seco aplicando la metodología de secado por aspersión (Spray dry).
- Seleccionar el (los) posible(s) polímero(s) para el desarrollo de sistemas matriciales, aplicando aspectos propios del desarrollo de medicamentos.
- Desarrollar los sistemas matriciales hidrofílicos a ser estudiados empleando el método de co-spray drying (co-procesamiento por secado por aspersión).
- Estudiar el mecanismo y el comportamiento fisicoquímico de la liberación del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* formulado como matrices hidrofílicas.

Capítulo 2. Aislamiento e identificación de marcadores farmacológicos y analíticos del extracto de *Physalis peruviana*

El objetivo de este capítulo fue aislar e identificar los compuestos responsables de la inhibición de la α -amilasa *in-vitro* como posible indicador de la actividad hipoglicemiante del extracto crudo de frutos de *Physalis peruviana* L., además de identificar marcadores analíticos que permitieran el desarrollo, implementación y validación de una metodología analítica para la cuantificación del extracto en las etapas posteriores de esta investigación.

2.1 *Physalis peruviana* L.

2.1.1 Descripción, distribución y usos populares

Planta de la familia Solanaceae conocida popularmente en Colombia como uchuva, uchuba, uchubo, buchuva, guchuva, alquenque, capulí, vejigón, puchero, uvilla, entre otros, de la cual usualmente se utilizan los frutos como alimento y varias partes de la planta con fines medicinales (103, 104).

Es una hierba de un metro de alto, que prefiere los rastrojos y lugares más o menos sombreados. Presenta hojas alternas, muy pecioladas, pubescentes, ovaladas, de base obtusa o truncada y ápice acuminado. Tiene flores de color amarillo y frutos globosos u ovoides, de aproximadamente 2 cm de diámetro, de color amarillo-anaranjado cuando están maduros, con pulpa jugosa de olor y sabor característico, que contiene numerosas semillas pequeñas. Los frutos están encerrados en un cáliz acrescente globoso-ovoide, como un farol colgante, vellosa, con venas moradas salientes, de 3 cm de diámetro. El cáliz se mantiene verde hasta madurar la fruta, momento en el que se torna pardo translúcido (ver Figura 2-1) (103, 105-107).

Figura 2-1 *Physalis peruviana* L. (108)



Originaria de los Andes, en Suramérica es cultivada en Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. También se encuentran cultivos comerciales en Sudáfrica, Kenia y el suroeste de Asia. En Colombia se cultiva tanto para el consumo interno como para exportación en los Departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Norte de Santander y Tolima, en alturas comprendidas entre 1700 y 2900 m.s.n.m. (105).

2.1.2 Usos populares reportados

Los frutos son empleados popularmente para la prevención y tratamiento de pterigios, como expectorante, diurético y vermífugo; para el tratamiento de la diabetes, albuminuria y tosferina, así como para fortalecer los dientes y evitar su caída. Según los usuarios el consumo diario de los frutos crudos de *P. peruviana* contribuye al mantenimiento de un nivel estable de glucosa en sangre (16).

La infusión de las flores se utiliza como tratamiento de la “tos rebelde”. A las hojas se les atribuyen propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antiasmáticas y se emplean solas en el tratamiento de la litiasis renal, la gota, la tuberculosis y la depresión; se usan en combinación con los tallos para el alivio de contusiones, torceduras y dislocaciones óseas. La planta entera se utiliza como diurético, antilitiásico y antipirético (16, 105, 109-113).

2.1.3 Actividad farmacológica

Estudios realizados con *P. peruviana* demostraron que la planta entera presenta actividad diurética, las hojas actividades antihelmíntica, inmunosupresora, larvicida y repelente de insectos, y el material seco no especificado, actividad antiviral (113). Extractos hidroetanólicos de la planta entera presentan buena actividad antioxidante, siendo ésta mayor para el extracto en etanol 95% (114).

Para los cálices se ha reportado actividad larvicida (115) y actividad antiinflamatoria, evaluada mediante el modelo de edema auricular (113) y edema plantar en ratones (116). Los resultados de la caracterización fitoquímica de extractos y fracciones de cálices de *P. peruviana* con actividad antiinflamatoria, sugieren que los responsables de esta actividad son glucósidos de ésteres alifáticos derivados de ácidos de cadena corta llamados Peruviósidos A y B (113).

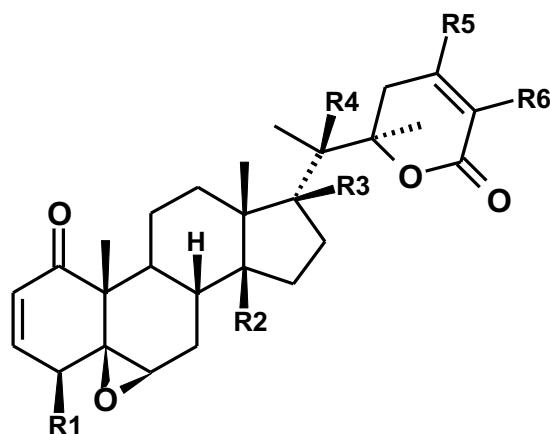
El zumo de los frutos presenta actividad antiinflamatoria en modelos de ojos de conejo y una acción inhibitoria fuerte sobre el crecimiento de fibroblastos de conejo en medio de cultivo, lo que sugiere que puede tener un efecto benéfico para el tratamiento de los pterigios en humanos (112).

P. peruviana mostró actividad hipoglicemiante por vía oral en ratones (15, 117). La fracción clorofórmica obtenida por fraccionamiento con solventes inmiscibles, a partir de un extracto etanólico de frutos frescos potenció el efecto de la insulina exógena en ratones normoglicémicos (16). Este extracto etanólico total y su fracción clorofórmica no mostró efectos de toxicidad aparente en ratones por administración repetida (16).

2.1.4 Estudios fitoquímicos

En la Tabla 2-1 se resumen los compuestos encontrados en las diferentes partes de la planta, dentro de los que se encuentran alcaloides, flavonoides, ésteres, algunos glicósidos aislados como precursores del aroma, entre otros. Dentro de los compuestos más investigados de *P. peruviana* están los Withanólidos, que probablemente son producidos por la planta para defenderse de los parásitos que la atacan (103, 115). La estructura general de estos compuestos se muestra en la Figura 2-2.

Figura 2-2 Estructura química de algunos Withanólidos presentes en *P. peruviana* (118-125).



Withanólido E:

R1=R5=R6=H
R3=R4=(β)OH
R2= (α)OH

4- β -Hidroxiwithanólido E:

R5=R6=H
R1=R3=R4=(β)OH
R2= (α)OH

28-Hidroxiwithanólido E:

R1=R5=H
R3=R4=R5=(β)OH
R2= (α)OH
R6=CH₂OH

Tabla 2-1 Compuestos químicos aislados de *Physalis peruviana* (26).

Parte analizada	Tipo de compuesto	Compuestos aislados
Hojas	Alcaloides (126)	3 β -acetoxitropano y dos isómeros N-metilpirrolidinilhigrina
	Withanólidos (120, 121, 127-130)	Phyperunólido A Phyperunólido B Phyperunólido C Phyperunólido D Peruvianóxido Phyperunólido E Phyperunólido F 1,10-seco withaperuvina C 4 β -hidroxewithanólido E 2,3-dihidroxewithanólido E Visconólido Withanólido E Withanólido F Withanólido S Witafisanólido Witaperuvina D Fisalolactona Fisalolactona b Fisalolactona c 23-hidroxifisalolactona 3-o- β -d-glucopiranosido de fisalolactona B
	Otros esteroidales (131, 132)	Fisalina A Perulactona Perulactona B Sitosterol 24-metilno colesterol
	Flavonoides (17)	No especificados
Cálices	Withanólidos (133)	4 β -hidroxewithanólido E 28- hidroxewithanólido E
	Ésteres de sacarosa (134)	Peruviósido A Peruviósido B
Fruto	Glucósidos (135, 136)	1-o-trans-cinamoil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranososa, (1S,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol 2-o- β -D-glucopiranosido, <i>p</i> -ment-4(8)-ene-1,2-diol 1-o- α -l-arabinopiranosil-(1-6)- β -d-glucopiranosido 1-fenilpropano-1,2-diol y <i>p</i> -ment-4(8)-ene-1,2-diol-3-o- β -d-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -d-glucopiranosido de etil 3-hidroxiocetanoato

Parte analizada	Tipo de compuesto	Compuestos aislados
		3-o- β -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido de butil (3R)-hidroxibutanoato 3-o- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido de butil (3S)-hidroxibutanoato
	Vitaminas (137)	α , β y γ -tocoferol Vitamina K1 Vitamina C Vitamina A β -Caroteno Ácidos grasos
	Withanólidos (115)	4 β -hidroxewithanólido E , withanólido E
	Alcaloides (138)	Calisteginas A3, B1, B2, y C1
	Ésteres (139)	Ésteres del ácido cinámico Ácido ascórbico Ácido 16-hidroxiohexadecanoico
Raíz	Alcaloides (119, 122-124, 140, 141)	Figrina Withaperuvina B Withaperuvina C Withaperuvina E Withaperuvina F Withaperuvina G Withaperuvina H Fisoperuvina N-N-dimetilisoperuvina Tigloidina Higrina
	Withanólidos (133)	4 β -hidroxewithanólido E
Planta entera	Withanólidos (142-144)	17 β -hidroxi-14,20-epoxi-1-oxo-3 β -(O- β -D-glucopiranosil)-wita-5,24-dienolido 4 β -hidroxewithanólido E(20R,22R)-5 α ,6 β ,14 α ,20,27-pentahidroxi-1-oxowit-24-enólido (20S,22R)-5 β ,6 β -epoxy-4 β ,14 β ,15 α -trihidroxi-1-oxowit-2,24-dienólido
	Flavonoides (145)	Quercetina y kampferol
	Alcaloides (125, 126, 146)	(+)-Fisoperuvina trigloidina 3- α -tigloiloxitropano (+)-Physoperuvina (\pm)-Physoperuvina (3-metilamino-cicloheptanona) sal del anión (+)-N,N-dimetilphysoperuvion (anión desconocido)

Si bien la uchuva es una planta conocida desde hace siglos, el potencial de esta fruta como fuente de compuestos farmacológicamente activos hasta ahora ha comenzado a ser explorado. Los primeros resultados de estas investigaciones han despertado gran interés debido a sus propiedades nutricionales e industriales, siendo una candidata prometedora para el desarrollo de productos fitoterapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades (147). Sin embargo, y a pesar de tener descritos más de 60 compuestos aislados, hasta el momento no se ha logrado establecer cuáles de ellos son los responsables de la actividad hipoglicemiante, actividad a la que está enfocada el presente trabajo, por lo que adelantar estudios fitoquímicos que permitan determinar algunos de los compuestos responsables de dicha actividad farmacológica, se convierte en un aporte científico importante.

2.2 Metodología

2.2.1 Materiales

Metanol (Grado HPLC) de JT Baker, acetonitrilo (Grado HPLC) de JT Baker, agua de calidad HPLC obtenida a través del sistema Milli-Q de Millipore Co[®]. La fructosa (Grado reactivo analítico) y la glucosa (Grado reactivo analítico) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich y la glucosa (Grado reactivo analítico) de Merck.

Los frutos de *P. peruviana* fueron colectados en el municipio de Subia, Cundinamarca, Colombia en Enero de 2014. 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 (Nº Col. 574701).

2.2.2 Equipos

Los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C mono- y bidimensionales se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz) (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.) empleando cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente y la señal residual del solvente como estándar interno. Los espectros de ESI-MS fueron obtenidos en un equipo Applied Biosystems QSTAR Elite hybrid quadrupole Time-of-Flight (q-TOF). La ionización por electrospray (ESI)

se realizó en modo positivo y los parámetros de la interfase y el detector MS fueron: gas nebulizador de flujo de 1 L/min, detector de voltaje 1,8 kV y temperatura CDL 250°C.

Para el fraccionamiento inicial se utilizó un HPLC semipreparativo Perkin-Elmer LC 480, equipado con un controlador AD224, una bomba Perkin-Elmer series 410 LC, un detector de arreglo de diodos LC-480 auto scan, realizando la detección a una longitud de onda de 210 nm; para el segundo fraccionamiento se utilizó un equipo UHPLC Thermo Dionex ultimate 3000 system, acoplado a un detector Light Scattering (ELSD) Sedex 85 (Sedere, Francia), detectando a una temperatura de 40°C y una ganancia de 10 unidades arbitrarias.

La rotación óptica de los azúcares fue medida en un polarímetro Polartronic E, Schmidt + Haensch en agua grado purificada.

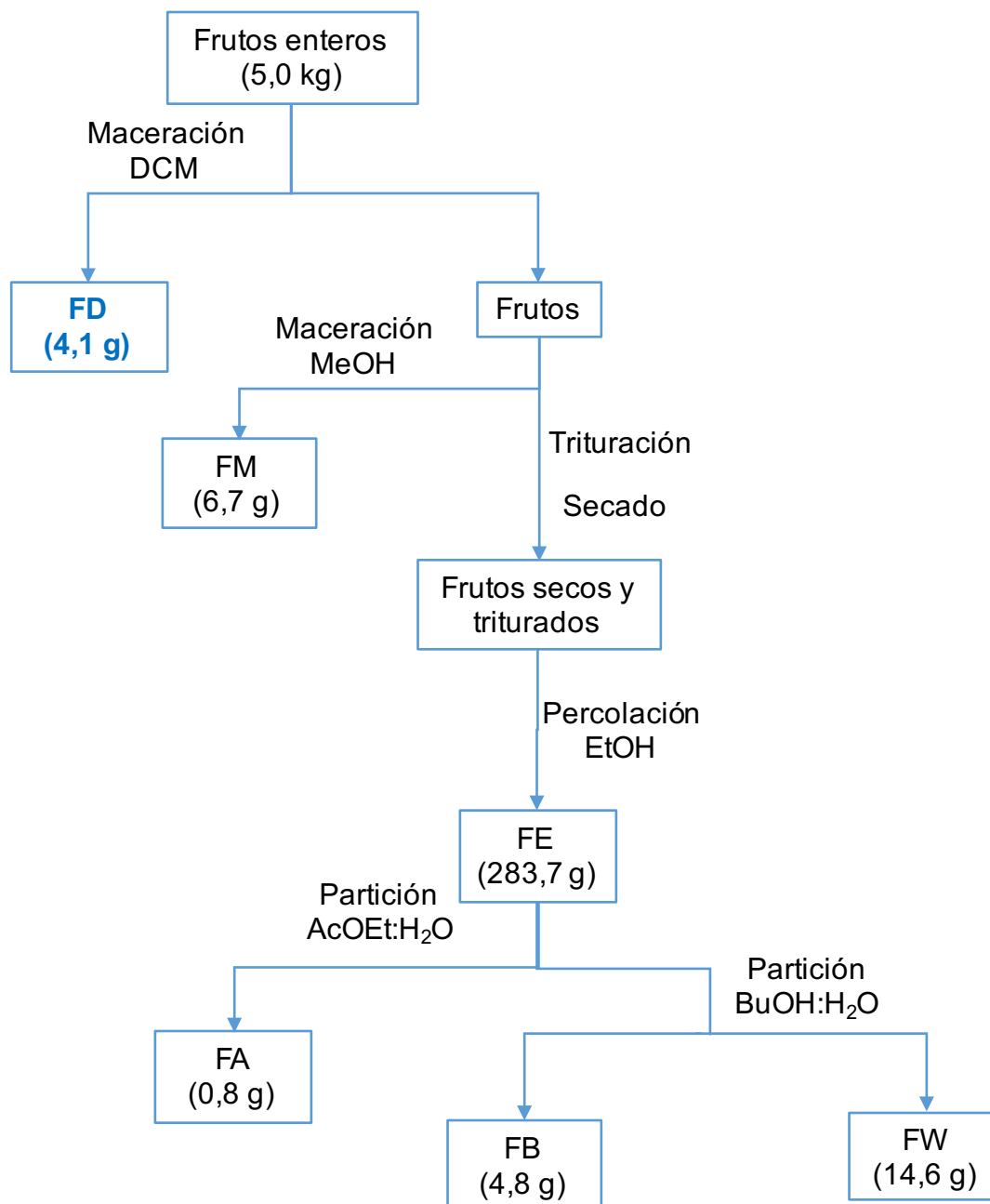
La cuantificación de los marcadores del extracto se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual se realizó en un equipo HPLC Agilent Technology modelo 9100 con detector de índice de refracción. Los datos se recogieron mediante el software LCsolution.

2.2.3 Métodos

2.2.3.1 Extracción, aislamiento y purificación

Los frutos enteros sin capacho de *P. peruviana* (5,0 kg) se sometieron al siguiente procedimiento: en primer lugar fueron sumergidos en diclorometano (DCM) durante 5 minutos y el extracto así obtenido fue concentrado para obtener la fracción FD (4,1 g); luego, los mismos frutos fueron sumergidos por 5 minutos en metanol (MeOH) obteniendo la fracción FM (6,7 g). Posteriormente, esos frutos fueron secados a 40°C siguiendo el procedimiento establecido en trabajos anteriores (26). Una vez realizado esto, se efectuó la percolación en etanol (EtOH) para obtener la fracción FE (extracto crudo en etanol, 283,7 g). El extracto crudo en etanol fue fraccionado posteriormente en acetato de etilo (AcOEt), butanol (BuOH) y agua (W) para obtener las fracciones FA (0,8 g), FB (4,8 g), FW (14,6 g), respectivamente, luego de concentrarlos (Figura 2-3).

Figura 2-3 Fraccionamiento de los frutos de *Physalis peruviana*



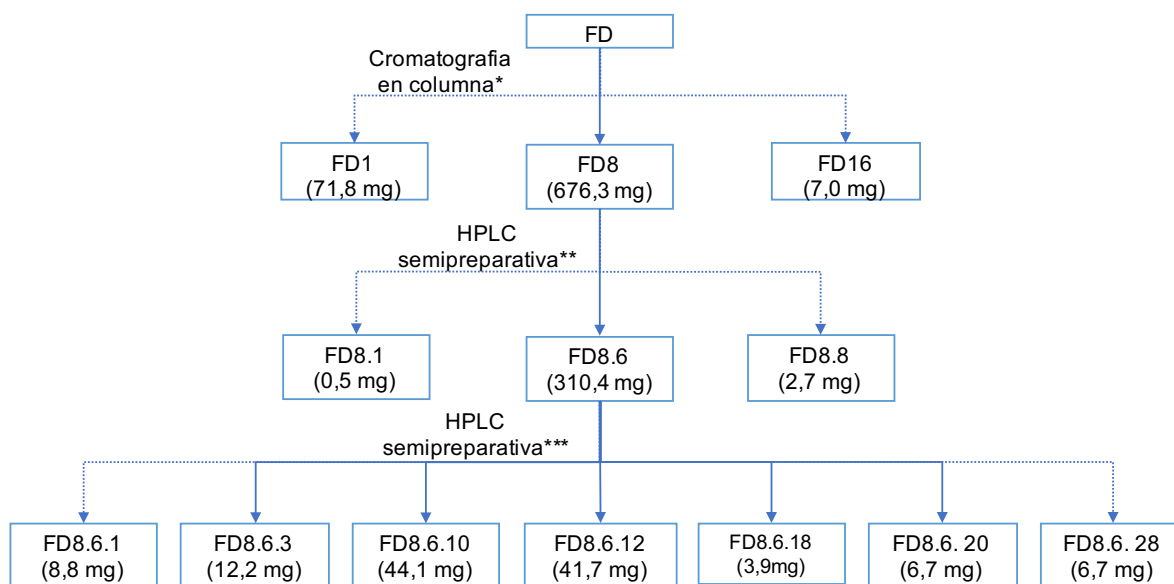
FD= Fracción Diclorometano (DCM); FM = Fracción Metanol (MeOH); FE = Fracción etanol (EtOH); FA = Fracción acetato de etilo (AcOEt), FB = Fracción butanol (BuOH); FW = Fracción acuosa.

Se evaluó la actividad inhibitoria de α -amilasa *in-vitro* de cada una de las 6 fracciones, siguiendo la metodología que se presenta en el numeral 2.2.3.3, siendo la fracción de DCM (FD), aquella que mostró mayor actividad. En adelante, el aislamiento del marcador

farmacológico se hizo de manera bioguiada, en función de los resultados obtenidos en los modelos de inhibición de α -amilasa *in vitro*. A partir de estos ensayos, se seleccionó la fracción de diclorometano (FD) para realizar la purificación e identificar el marcador.

Inicialmente, la fracción FD se eluyó en una columna por gravedad con sílica gel utilizando como fase móvil 250 mL de las siguientes mezclas de solventes hexano, hexano/AcOEt (80:20, v/v), hexano/AcOEt (50:50), hexano/AcOEt (20:80), AcOEt (100%), AcOEt/MeOH (90:10), AcOEt/MeOH (50:50), MeOH (100%) y MeOH/H₂O (90:10), donde se colectaron 16 fracciones de 125 mL las cuales fueron posteriormente secadas al vacío para obtener las fracciones FD1 a FD16 (Figura 2-4). La evaluación de la actividad mostró que la fracción FD8 presentó la mayor inhibición *in-vitro* de la α -amilasa.

Figura 2-4 Esquema de fraccionamiento de la fracción FD a través de cromatografía en columna y HPLC semipreparativa.



* Fase estacionaria: Sílica 60. Fase móvil: 250 mL c/u hexano 100; hexano:acetato de etilo 80:20; hexano:acetato de etilo 50:50; hexano:acetato de etilo 20:80; acetato de etilo 100; acetato de etilo:metanol 90:10; acetato de etilo:metanol 50:50; metanol 100; metanol:agua 90:10.

** Volumen de inyección 20 μ L; Fase estacionaria: Columna XDB-C18 (5 μ m; 9,5 X 250 mm); Fase móvil: H₂O/MeOH (30:70), 5 min; MeOH 100, 20 min; MeOH 100, 10 min; H₂O/MeOH (30:70), 5 min; Flujo 2 mL/min; detector DAD: λ : 210 nm.

*** Volumen de inyección 20 μ L; Fase estacionaria: Columna XDB-C18 (5 μ m; 9,5 X 250 mm); Fase móvil: H₂O/MeOH (10:90), 30 min; MeOH 100, 5 min; MeOH 100, 10 min; H₂O/MeOH (10:90) 5 min; Flujo 1,5 mL/min; detector ELSD ganancia 10; temperatura 40°C.

Posteriormente, FD8 (676,3 mg) fue concentrada hasta 20 mL y filtrada a través de un filtro de membrana (0,45 μm , Millipore). Se realizaron inyecciones repetidas de esta fracción (676,3 mg) en un equipo de HPLC Perkin-Elmer LC 480, realizando la detección a una longitud de onda de 210 nm; como fase estacionaria se utilizó una columna semipreparativa Zorbax Eclips XDB (250 mm X 9,4 mm, 5 μm ,) y como fase móvil se utilizó un gradiente de: H₂O/MeOH (30:70) 5 min a (0:100) en 20 min, seguido por MeOH (100%) por 10 min, con una velocidad de flujo de 2 mL/min. Se colectaron fracciones cada 5 minutos obteniendo ocho fracciones FD8.1 a FD8.8 (Figura 2-4), las cuales corresponden a un líquido viscoso e incoloro. De estas, la fracción FD8.6 (310 mg) fue la que presentó la mayor inhibición *in-vitro* de α -amilasa.

Finalmente, 300 mg de FD8.6 fueron fraccionados utilizando un equipo UHPLC Thermo Dionex ultimate 3000 system, con un detector acoplado de Light Scattering (ELSD) Sedex 85. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 Zorbax Eclipse XDB (250 mm X 9,4 mm, 5 μm), como fase móvil se utilizó el gradiente: H₂O/MeOH (10:90) por 30 minutos, posteriormente se llevó hasta (0:100) en 5 min, seguido de MeOH (100) por 10 min, y nuevamente se llevó a H₂O/MeOH (10:90) por 5 min, con un flujo de 1,5 mL/min. Se obtuvieron 28 fracciones FD8.6.1 a FD8.6.28, para obtener los compuestos **P1** (8,8 mg), **P2** (12,2 mg), **P3** (3,9 mg) y **P4** (6,7 mg), junto con las fracciones FD8.6.10 y FD8.6.12, que corresponden a los compuestos **P5** y **P6**, respectivamente. Estas fracciones fueron caracterizadas a través de RMN mono y bidimensional y espectroscopía de masas para la elucidación de las estructuras.

2.2.3.2 Hidrólisis básica de los compuestos

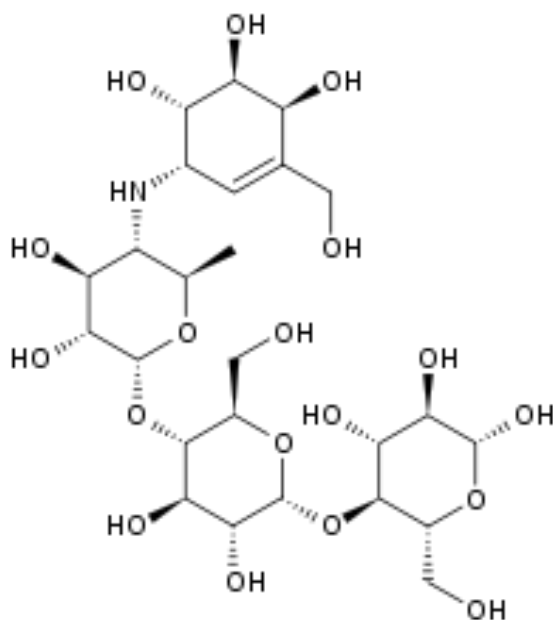
Se llevó a cabo la hidrólisis de cada uno de los compuestos **P1** a **P4** con el fin de determinar el tipo de azúcar y los ácidos grasos presentes. Se disolvieron 2 mg de cada compuesto purificado por separado en 10 mL de una solución de KOH al 5% en metanol y se colocaron en reflujo por 1 hora. La solución básica se enfrió y se neutralizó cuidadosamente con HCl 2N y se diluyó con 10 mL de agua. La solución resultante fue extraída con éter etílico Et₂O (3 X 10 mL). El sólido que quedó en la fracción acuosa fue analizado por RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃).

2.2.3.3 Ensayo *in-vitro* de inhibición de α -amilasa.

El ensayo *in-vitro* de inhibición de α -amilasa, se realizó de acuerdo a la metodología de inhibición de alfa amilasa (Remazol Brilliant Blue) (148), descrita por Hansawasdi-Kawabata (149) y modificada por Rey et al. (150, 151), que se detalla en el Anexo A.

La alfa amilasa hidroliza los enlaces 1-4 glicosídicos, produciendo azúcares simples, principalmente glucosa y maltosa a partir de polisacáridos (152), por lo que su inhibición también está asociada a la reducción de niveles de glucosa en sangre. Los resultados obtenidos en los ensayos *in-vitro* de inhibición de α -amilasa 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 del test de Tukey y la prueba de Dunnett, con el fin de evidenciar cual o cuales fueron las fracciones con mayor capacidad inhibitoria. Como control positivo se utilizó la acarbosa (Figura 2-5), la cual es es un oligosacárido que se obtiene del *Actinoplanes utahensis* utilizado como farmaco para tratar la diabetes mellitus tipo 2. Es un inhibidor de la alfa-glucosidasa, una enzima que libera la glucosa a partir de hidratos de carbono complejos (5, 153).

Figura 2-5 Acarbosa



2.2.3.4 Cuantificación de glucosa y fructosa por HPLC

Debido a que la proporción presente de los marcadores farmacológicos (ésteres de sacarosa) es baja en el extracto, no fue posible llevar a cabo su cuantificación, por lo tanto se decidió evaluar la cantidad de azúcares mayoritarios presentes en el extracto (glucosa y fructosa), que se constituirán para las etapas posteriores del desarrollo del producto fitoterapéutico en los marcadores analíticos a los que se les hará el seguimiento. La cuantificación de glucosa y fructosa se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

2.2.3.5 Desarrollo del método analítico por HPLC

▪ Condiciones cromatográficas

Teniendo en cuenta estudios previos para azúcares en extractos vegetales y frutas (154, 155), se desarrolló un método cromatográfico de acuerdo a las necesidades y condiciones de trabajo, empleando como se mencionó HPLC en fase reversa con detector de índice de refracción. Se realizaron diferentes análisis para la determinación de la temperatura de la columna y las condiciones de la fase móvil. Como fase estacionaria se utilizó una columna Aminex[®] HPX 87H (300 mm x 7,8 mm, 9 µm) con una temperatura del horno de 60 °C. Para el método se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 0,05 mM y la velocidad de flujo se mantuvo constante a 0,6 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 µL. Cada solución fue filtrada a través de una membrana de 0,45 µm antes de inyectar en el equipo de HPLC.

▪ Validación de la metodología analítica

El método analítico fue validado según las directrices de la ICH Q2R1 (156), en cuanto a: selectividad, 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 glucosa y fructosa en el extracto de frutos de *P. peruviana*. La metodología detallada se presenta en el Anexo B.

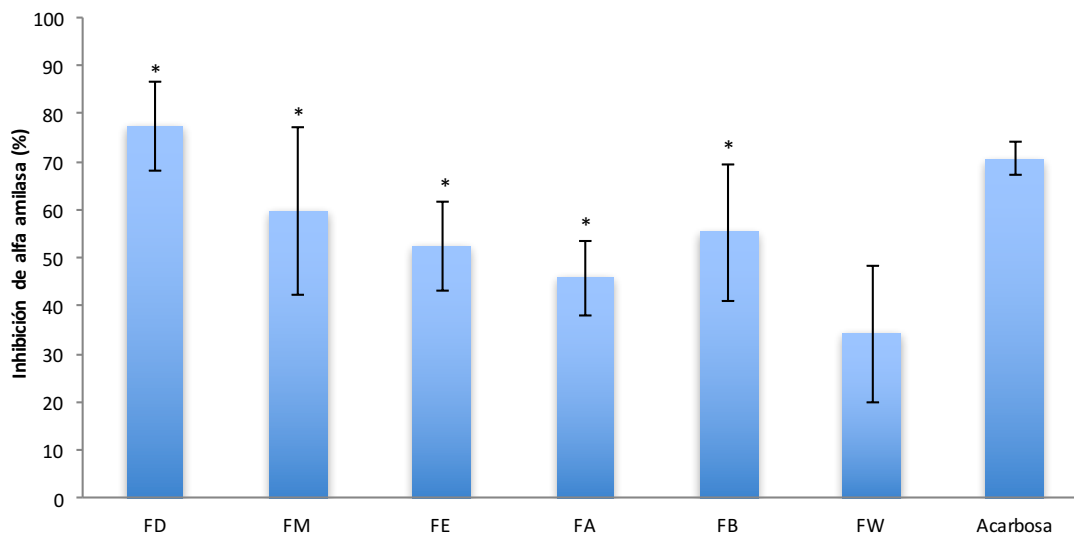
2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Extracción, aislamiento y purificación

A partir de los frutos de *P. peruviana* se realizaron una serie de extracciones y particiones con el fin de determinar si la actividad se concentra en los compuestos que exuda el fruto o en los compuestos al interior de este y fraccionarlos de acuerdo a su polaridad. Así, se obtuvieron extractos de polaridad media (FD) y alta (FM), de los compuestos que recubren al fruto entero y el extracto etanólico del fruto homogenizado y secado (FE), que fue posteriormente fraccionado para obtener fracciones de polaridad media (FA), polaridad alta (FB) y el residuo acuoso de la extracción (FW). Para definir la fracción a utilizar para el aislamiento y purificación del marcador terapéutico, se realizó el seguimiento bioguiado del fraccionamiento mediante la utilización de ensayos *in-vitro* de inhibición de la α -amilasa (150, 151). El resultado de este ensayo mostró que, aunque la actividad se observó en los extractos FD, FM, FE, FA y FB, la actividad se concentró en el extracto en diclorometano, FD, con valores de inhibición similares a los observados para la acarbosa empleada como control positivo (Figura 2-6).

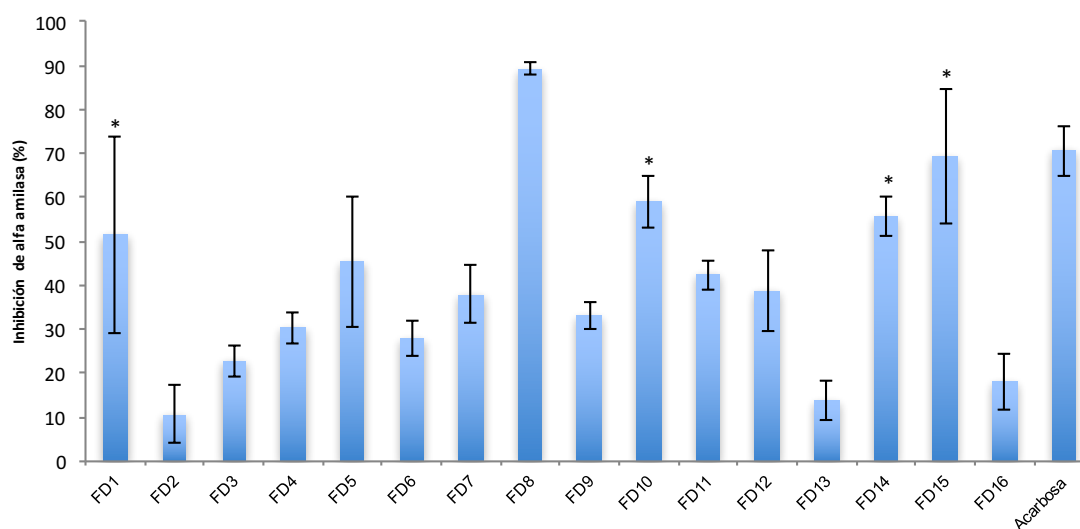
Posteriormente, se realizó un fraccionamiento bioguiado de los compuestos responsables de la actividad a partir de FD, empezando por el fraccionamiento de FD por cromatografía flash. Los resultados del ensayo aplicado a las 16 fracciones mostró que la actividad se concentró en la fracción FD8 (Figura 2-7), que fue posteriormente fraccionada por HPLC semipreparativo en una columna C18 Zorbax Eclipse XDB (250 mm X 9,4 mm, 5 μ m), que permitió la obtención de los compuestos P1 a P6 (Figura 2-8).

Figura 2-6 Actividad *in-vitro* de inhibición de α amilasa para el fraccionamiento del extracto de frutos de *Physalis peruviana*.



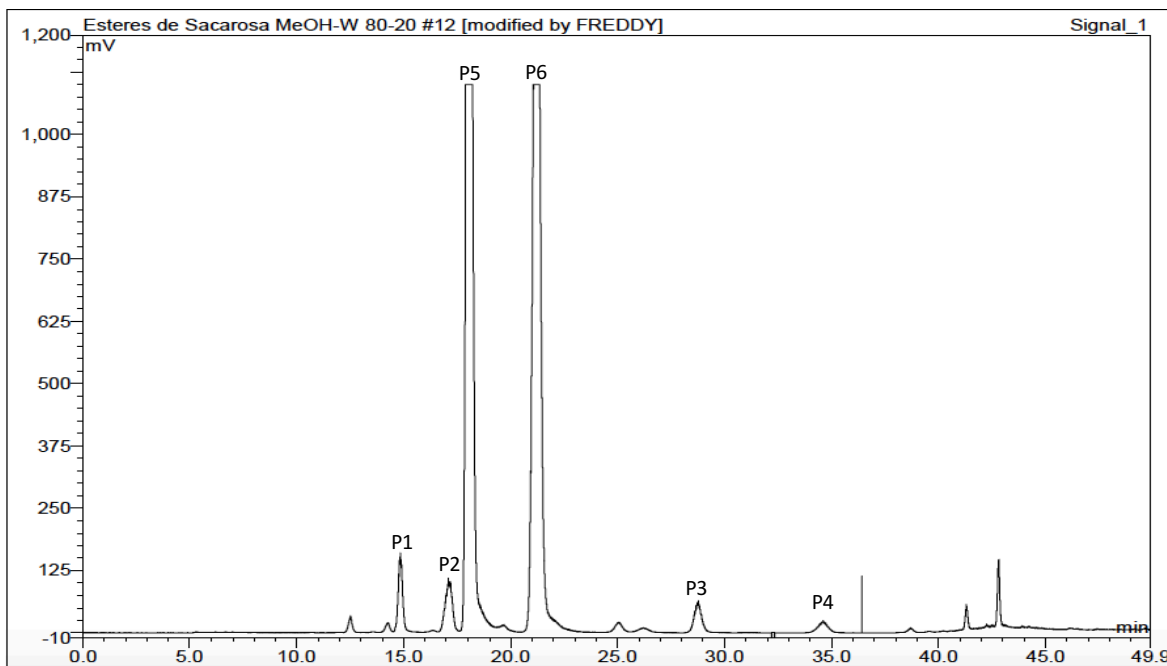
FD= Fracción Diclorometano (DCM); FM = Fracción Metanol (MeOH); FE = Fracción Etanol (EtOH); FA = Fracción Acetato de Etilo (AcOEt), FB = Fracción Butanol (BuOH); FW = Fracción Acuosa. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test de Tukey y test de Dunnett, * Las fracciones no presentan diferencias significativas en comparación con el grupo control $P < 0,05$.

Figura 2-7 Actividad *in-vitro* de inhibición de α amilasa para el fraccionamiento de FD



FD= Fracción Diclorometano (FD). Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test de Dunnett, * Las fracciones no presentan diferencias significativas en comparación con el grupo control $P < 0,05$.

Figura 2-8 Perfil cromatográfico UHPLC de la fracción FD8



Volumen de inyección 20 μ L; Fase estacionaria: Columna XDB-C18 (5 μ m; 9,5 X 250 mm); Fase móvil: MeOH : H₂O 90:10, 30 min; MeOH 100, 5 min; MeOH 100, 10 min; MeOH : H₂O 90:10, 5 min; Flujo 1,5 mL/min; detector ELSD, ganancia 10; temperatura 40°C.

2.3.2 Elucidación estructural de los compuestos

El compuesto P1 (9 mg, Figura 2-9 1), fue aislado como un líquido viscoso e incoloro. Su fórmula molecular fue establecida como C₃₂H₅₄O₁₅, por el ión obtenido en ESI-MS en m/z 701,3375, calculado para C₃₂H₅₄NaO₁₅, 701,3354, error 2,9 ppm, (Anexo C). El espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, Tabla 2-2) mostró señales para 8 protones carbonílicos con desplazamientos característicos de unidades de azúcares en δ_H 5,60 (1H, d, $J = 3,3$ Hz); 5,47 (1H, t, $J = 9,9$); 5,20 (1H, d, $J = 7,9$); 4,95 (1H, d, $J = 9,9$); 4,92 (1H, dd, $J = 9,6, 2,2$); 4,52 (1H, t, $J = 7,9$); 4,15 (1H, d, $J = 9,8$); 3,92 (1H, m); tres metilenos enlazados a oxígeno con señales en δ_H 3,89 (1H, m) y 3,75 (1H, m); 3,60 (2H, m); 3,58 (1H, d, $J = 13,0$ Hz) y 3,46 (1H, d, $J = 13,0$ Hz). Se observaron también señales de septetos característicos de tres grupos isobutilo en δ_H 2,75 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz); 2,51 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz); 2,45 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz), además de señales para una cadena de metilenos y señales multipletes de metilos entre δ_H 2,25 y 1,25, junto con un metilo terminal de un ácido graso a δ_H 0,87.

En el espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2-2) se observaron señales para cuatro carbonilos de ésteres en δ_C 177,81; 176,00; 175,76; 172,87; señales para dos carbonos anoméricos (δ_C 103,82; 89,38); 7 hidroximetinos (δ_C 82,54; 79,05; 72,04; 71,30; 70,03; 68,98; 68,24) y tres hidroximetilenos (δ_C 64,54; 61,50; 59,92), característicos de subunidades de azúcar tipo sacarosa. Además, se observaron cuatro señales en δ_C 33,99; 33,90; 33,87; 33,83 y señales características de cadenas alifáticas (δ_C 31,56; 29,00; 28,85; 24,54; 22,56 y 14,04).

Estas señales guardan una alta semejanza con los Peruviosidos A y B, ésteres de sacarosa previamente aislados de los cálices de *P. peruviana* (116, 134), caracterizados por tener un ácido graso de cadena larga (C₁₀) en la posición 2 y con sustituyentes isobutirilo en las posiciones 3, 4 y 3' de la sacarosa (Figura 2-10). La asignación de las señales se realizó por experimentos HSQC y los análisis de los espectros de COSY y HMBC (Tabla 2-2) permitió establecer que el ácido graso de la posición dos tenía una longitud de 8 átomos de carbono con señales a 172,87; 33,83; 31,56; 29,00; 28,85; 24,54; 22,56 y 14,04, para los átomos de carbonos C-1'' a C-8'', lo cual fue confirmado por el análisis del espectro de RMN-¹³C y de espectro de masas donde se observó un ion en m/z 701, indicando que la fórmula tiene 28 unidades de masa menos que la del Peruviosido A (reportado en m/z 729).

La configuración relativa de la sacarosa fue determinada por el análisis de las constantes de acoplamiento H-H y por comparación de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C reportados en la literatura (134). Después de la hidrólisis básica del compuesto P1, fueron obtenidos los residuos de sacarosa, como un polvo blanco amorfo, analizado por RMN, donde se encontraron señales de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H 5,71 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, anomérico), 5,47 (1H, t, $J = 9,9$ Hz, -CHOH), 5,36 (1H, d, $J = 5,7$ Hz, -CHOH), 5,24 (1H, dd, $J = 20,2, 10,7$ Hz, CHOH), 4,95 (1H, d, $J = 5,4$ Hz, -CHOH), 4,61 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, -CH₂OH), 4,21 (1H, m, -CH), 3,87 (1H, s, -CH), 3,84 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, -CHOH), 3,72 (1H, d, $J = 13,3$ Hz, -CHOH), 3,64 (2H, m, -CH₂OH), 3,55 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, -CHOH), 3,49 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, -CHOH). Estos resultados fueron confirmados por comparación de su rotación óptica con la de un estándar mostrando coincidencia en la magnitud y el signo de la rotación óptica ($[\alpha]_D$ producto = +52,7°, $[\alpha]_D$ estándar = +66°) (157-160). Así, la estructura del compuesto P1, se estableció como se presenta en la Figura 2-9 1, la cual no ha sido previamente descrita en la naturaleza, por lo cual se denominó como Peruviosido C.

Tabla 2-2 Datos de RMN-¹H, RMN-¹³C y 2D-HMBC para los compuestos P1-P4 (CDCl₃, 400 MHz)

Peruviosido C (P1)			Peruviosido D (P2)			Peruviosido E (P3)			Peruviosido F (P4)			
Posición	δ _c ; tipo	δ _H ; (J in Hz)	HMBC	δ _c ; tipo	δ _H ; (J in Hz)	HMBC	δ _c ; tipo	δ _H ; (J in Hz)	HMBC	δ _c ; tipo	δ _H ; (J in Hz)	HMBC
Unidad de glucosa												
1	89,38; CH	5,60; d; (3,3)	5; 2'	89,41; CH	5,59; d; (3,6)	5; 2'	89,40; CH	5,59; d; (3,7)	5; 2'	89,47; CH	5,47; d; (3,7)	5; 2'
2	70,03; CH	4,92; dd; (9,6; 2,2)	3; 1''	70,10; CH	4,91; d; (3,8)	3; 1''	70,06; CH	4,92; d; (3,9)	3; 1''	70,16; CH	4,91; d; (2,4)	3; 1''
3	68,98; CH	5,47; t (9,9)	2; 4; 1'''	69,05; CH	5,46; dd; (13,5; 6,2)	2; 4; 1'''	69,02; CH	5,47; t (9,9)	2; 4; 1'''	69,08; CH	5,46; t; (9,9)	2; 4; 1'''
4	68,24; CH	4,95; d; (9,9)	3; 5; 6; 1''''	68,29; CH	4,95; d; (9,8)	3; 5; 6; 1''''	68,25; CH	4,95 d (4,5)	3; 5; 6; 1''''	68,34; CH	4,95; d; (7,5)	3; 5; 6; 1''''
5	72,04; CH	4,15; d; (9,8)		72,03; CH	4,15; ddd; (4,5; 2,3; 3,2)		72,18; CH	4,15 d (10,1)		72,02; CH	4,14; dd; (10,2; 4,8)	
6	61,50; CH ₂	3,60; m		61,55; CH ₂	3,55; m		61,60; CH ₂	3,58; m		61,56; CH ₂	3,58; m	
Unidad de fructosa												
1'a		3,58; d; (13,0)			3,59; d; (7,0)			3,58; d; (13,4)			3,57; d; (3,3)	
1'b	64,54; CH ₂			64,62; CH ₂			64,69; CH ₂			64,55; CH ₂		
		3,46; d; (13,0)			3,46; d; (4,9)			3,46; d; (11,6)			3,47; t; (11,3)	
2'	103,82; C	-		103,84; C			103,81; C	-		103,94; C	-	
3'	79,05; CH	5,20; d; (7,9)	1'; 4'; 1''''	79,11; CH	5,21; d; (8,1)	1'; 4'; 1''''	79,12; CH	5,18; d; (8,1)	1'; 4'; 1''''	79,21; CH	5,22; d; (8,1)	1'; 4'; 1''''
4'	71,30; CH	4,52; t; (7,9)	3'; 5'; 6'	71,32; CH	4,52; t; (8,0)	3'; 5'; 6'	71,19; CH	4,59; t; (8,2)	3'; 5'; 6'	71,28; CH	4,55; t; (8,2)	3'; 5'; 6'
5'	82,54; CH	3,92; m	4'	82,61; CH	3,95; m	4'	82,55; CH	3,93; m	4'	82,61; CH	3,91; m	4'
6'a		3,89; m			3,88; m			3,89; m			3,73; d (1,6)	
6'b	59,92; CH ₂		4'	59,90; CH ₂		4'	59,73; CH ₂		4'	59,88; CH ₂		4'
		3,75; m			3,72; d; (13,4)			3,73; d (12,3)			3,70; d (2,0)	
Sustituyente en 2												
1''	172,87; C	-		172,87; C	-		172,78; C	-		172,88; C	-	
2''	33,83; CH ₂	2,25; m	3''	33,86; CH ₂	2,25; m	3''	34,05; CH ₂	2,25; m	3''	33,93; CH ₂	2,25; m	3''
3''	24,54; CH ₂	1,54; m	2''	24,54; CH ₂	1,53; m	2''	24,57; CH ₂	1,54; m	2''	24,57; CH ₂	1,56; m	2''
4''	28,85; CH ₂	1,25; br.s		29,14; CH ₂	1,24; br.s		29,08; CH ₂ **	1,25; br.s		29,57; CH ₂ **	1,24; br.s	
5''	29,00; CH ₂	1,25; br.s		29,05 – 29,01; CH ₂ **	1,24; br.s		29,22; CH ₂ **	1,25; br.s		29,57; CH ₂ **	1,24; br.s	
6''	31,56; CH ₂	1,25; br.s		31,75; CH ₂	1,24; br.s		29,31; CH ₂ **	1,25; br.s		29,39; CH ₂ **	1,24; br.s	
7''	22,56; CH ₂	1,25; br.s		22,58; CH ₂	1,24; br.s		29,39; CH ₂ **	1,25; br.s		29,30; CH ₂ **	1,24; br.s	
8''	14,04; CH ₃	0,87; t; (6,7)	6''; 7''	14,03; CH ₃	0,86; t; (6,8)	6''; 7''	29,58; CH ₂ **	1,25; br.s		29,21; CH ₂ **	1,24; br.s	
9''							29,69; CH ₂ **	1,25; br.s		29,09; CH ₂ **	1,24; br.s	

Peruviosido C (P1)			Peruviosido D (P2)			Peruviosido E (P3)			Peruviosido F (P4)			
Posición	δ_c ; tipo	δ_{ii} (J in Hz)	HMBC	δ_c ; tipo	δ_{ii} (J in Hz)	HMBC	δ_c ; tipo	δ_{ii} (J in Hz)	HMBC	δ_c ; tipo	δ_{ii} (J in Hz)	HMBC
10"							31,89; CH ₂	1,25; br.s		31,88; CH ₂	1,24; br.s	
11"							22,66; CH ₂	1,25; br.s		22,66; CH ₂	1,24; br.s	
12"							14,08; CH ₃	0,88; t; (6,8)	10"; 11"	14,07; CH ₃	0,87; t; (7,0)	6"; 7"
Sustituyente en 3												
1'''	175,76; C	-		175,71; C	-		175,73; C	-		174,05; C	-	
2'''	33,87; CH	2,45; sp; (7,0)		33,88; CH	2,45; sp; (7,0)		33,89; CH	2,45; sp; (7,0)		33,87; CH	2,45; sp; (7,0)	
3'''a	18,66-19,08; CH ₃ *	1,07; d; (7,0)	2'''	18,67-19,07; CH ₃ *	1,08; d; (7,0)	2'''	18,71-19,06; CH ₃ *	1,07; d; (0,8)	2'''	18,88-18,75; CH ₃	1,08 d; (7,0)	2'''
3'''b	18,66-19,08; CH ₃ *	1,08; d; (7,0)	2'''	18,67-19,07; CH ₃ *	1,06; d; (7,0)	2'''	18,71-19,06; CH ₃ *	1,08; d; (0,8)	2'''	18,88-18,75; CH ₃	1,07 d; (7,0)	2'''
Sustituyente en 4												
1''''	176,00; C	-		175,96; C	-		175,98; C	-		175,63; C	-	
2''''	33,90; CH	2,51; sp; (7,0)	3''''	33,92; CH	2,51; sp; (7,0)	3''''	33,93; CH	2,51; sp; (7,0)	3''''	33,89; CH	2,52; sp; (7,0)	3''''
3''''a	18,66-19,08; CH ₃ *	1,14; d; (7,0)	2''''	18,67-19,07; CH ₃ *	1,13; d	2''''	18,71-19,06; CH ₃ *	1,14; d; (7,0)	2''''	18,88-18,75; CH ₃	1,13; d; (2,0)	2''''
3''''b	18,66-19,08; CH ₃ *	1,06; d; (7,0)	2''''	18,67-19,07; CH ₃ *	1,11; d; (1,5)	2''''	18,71-19,06; CH ₃ *	1,05; d; (7,0)	2''''	18,88-18,75; CH ₃	1,11 d; (7,0)	2''''
Sustituyente en 3'												
1'''''	177,81; C	-		177,80; C	-		177,93; C	-		176,06; C	-	
2'''''	33,99; CH	2,75; sp; (7,0)	3'''''	43,13; CH	2,39; dd; (6,7; 12,8)	4'''''a	34,02; CH	2,75 sp (7,0)	3'''''	43,15; CH	2,40; dd; (7,0; 14,0)	4'''''a
3'''''				25,84; CH ₂	2,20; m	2'''''				25,87; CH ₂	2,19; d; (7,0)	2'''''
3'''''a	18,66-19,08; CH ₃ *	1,32; d; (7,0)	2'''''				18,71-19,06; CH ₃ *	1,33; d; (7,0)	2'''''			
3'''''b	18,66-19,08; CH ₃ *	1,29; d; (7,0)	2'''''				18,71-19,06; CH ₃ *	1,29; d; (7,0)	2'''''			
4'''''a				22,54; CH ₃	1,05; d; (2,5)	2'''''; 3'''''; 4'''''b				22,30; CH ₃	1,06; d; (1,4)	2'''''; 3'''''; 4'''''b
4'''''b				24,54; CH ₃	1,03; d; (2,5)	2'''''; 3'''''; 4'''''a				22,42; CH ₃	1,04; d; (1,3)	2'''''; 3'''''; 4'''''a

*No fue posible determinar la multiplicidad

**Las señales pueden ser intercambiables

con desplazamientos característicos de unidades de azúcares en δ_H 5,59 (1H, d, $J = 3,6$ Hz); 5,46 (1H, dd, $J = 13,5; 6,2$ Hz); 5,21 (1H, d, $J = 8,1$ Hz); 4,95 (1H, d, $J = 9,8$ Hz); 4,91 (1H, d, $J = 3,8$ Hz), 4,52 (1H, t, $J = 8,0$); 4,15 (1H, ddd, $J = 4,5; 3,2; 2,3$ Hz); 3,95 (1H, m); tres metilenos enlazados a oxígeno con señales en δ_H 3,88 (1H, m) y 3,72 (1H, d, $J = 13,4$ Hz); 3,59 (1H, d, 7,0 Hz); 3,55 (2H, m) y 3,46 (1H, d, $J = 4,9$ Hz). También señales para dos isobutil ésteres en δ_H 2,51 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz) y 2,45 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz), junto con señales a δ_H 2,39, (2H, dd, 12,8, 6,7), 2,25 (2H, m), 2,20 (1H, m) y 0,86 (3H, t, 6,8) que sugieren la presencia de una cadena de isovalerilo y una cadena de ácido graso.

En el espectro de RMN- ^{13}C del compuesto P2 ($CDCl_3$, 100 MHz, Tabla 2-2) se observaron señales para cuatro carbonilos de ésteres en δ_C 177,80; 175,96; 175,71; 172,87 y señales para una sacarosa en δ_C 103,84; 89,41; 82,61; 79,11; 72,03; 71,32; 70,10; 69,05; 68,29; 64,62; 61,55 y 59,90. Además de varias señales a δ_C 33,86; 31,75; 29,14; 29,05 – 29,01; 24,54; 22,58 y 14,03, características de cadenas alifáticas.

Estos datos son similares a los reportados para el Peruviosido B, un éster de sacarosa caracterizado por tener un ácido graso de cadena larga (C_{10}) en la posición 2 y con sustituyentes isobutirilo en C-3 y C-4 y un isovalerilo en C-3' de la sacarosa. La asignación de las señales se realizó por experimentos HSQC y HMBC. La presencia del sustituyente isovalerilo se soportó por comparación de las señales de metileno a δ_H 2,39, (2H, dd, $J = 12,8, 6,7$ Hz) / δ_C 43,13 y por comparación de señales de RMN- ^{13}C a 33,92; 33,88; 33,86 con los reportados para el Peruviosido B (134). El análisis de los espectros COSY (Tabla 2-2) permitieron establecer un sistema spin entre el metileno del isovalerilo a δ_H 2,39 (δ_C 43,14) y el metino a 2,20 (δ_C 25,84). De la misma manera, las correlaciones observadas en HMBC entre los protones del metileno en δ_H 2,39 y el metilo en δ_C 22,84 las correlaciones de los metilos terminales en δ_H 1,05 y 1,03 con los carbonos en δ_C 43,13 y 25,84; las correlaciones observadas entre los protones en δ_H 2,20 con el carbono en δ_C 43,13, permiten proponer de manera inequívoca la presencia de una subunidad de isovalerilo común en este tipo de compuestos (116, 134, 161), la cual se asignó a la posición C-3' por la correlación observada en HMBC entre el protón en δ_H 5,21 de la posición C-3'' de la subunidad de fructosa con el carbonilo en δ_C 177,80. Así, se estableció la estructura del compuesto P2 (Figura 2-9 2), denominado Peruviosido D, el cual no había sido previamente aislado de fuentes naturales.

El compuesto P3 (4 mg, Figura 2-9 3), se aisló como un líquido viscoso e incoloro cuya

fórmula molecular fue establecida $C_{36}H_{62}O_{15}$, por el ión obtenido en ESI-MS en m/z 757,3982, (calculado para $C_{36}H_{62}NaO_{15}$, 757,398, error 0,1 ppm, Anexo C), lo que sugiere la presencia de cuatro grupos metilenos adicionales en comparación con el compuesto P1 (Peruviósido C). El espectro de RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$, Tabla 2-2) mostró señales para 8 protones carbonílicos, tres metilenos enlazados a oxígenos y señales de septetos característicos de tres grupos isobutilo en δ_H 2,75 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz); 2,51 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz); 2,45 (1H, sp, $J = 7,0$ Hz), además de señales para una cadena de metilenos que muestran coincidencia con las encontradas para los ésteres de sacarosa previamente presentados para los Peruviósidos A y C (compuesto P1 y P2).

En el espectro de RMN- ^{13}C para el compuesto P3 ($CDCl_3$, 400 MHz, Tabla 2-2) se observaron señales para una sacarosa en δ_C 103,81, 89,40, 82,55; 79,12; 72,18; 71,19; 70,06; 69,02; 68,25; 64,69; 61,60 y 59,73, además de cuatro señales para carbonilos de ésteres en δ_C 177,93; 175,98; 175,73; 172,78 y sus α -carbonos δ_C 34,02; 33,93; 33,89 y 34,05 y señales para la cadena del ácido graso en δ_C 172,78; 34,05; 31,89; 29,69; 29,58; 29,39; 29,31; 29,22; 29,08; 24,57; 22,66 y 14,08, características de cadenas alifáticas, indicando que el compuesto P3 es otro éster de sacarosa similar a los Peruviósidos A y C. Sin embargo, se observaron diferencias en la longitud de la cadena del ácido graso con la aparición de señales de metilenos para un ácido graso de 12 átomos de carbono. Esto es soportado por el análisis de MS donde la fórmula molecular mostró tener cuatro metilenos más que el Peruviósido C. La asignación de señales realizada por experimentos de HSQC, y la elucidación fue corroborada por los análisis de los espectros COSY y HMBC permitiendo establecer la estructura del compuesto P3, como se presenta en la, Figura 2-9 3, que no ha sido previamente descrito en la naturaleza, por lo cual se denominó como Peruviósido E.

Finalmente, el compuesto correspondiente a P4 (7 mg, Figura 2-9 4), fue aislado como un líquido viscoso e incoloro con una fórmula molecular $C_{37}H_{64}O_{15}$ que fue establecida por el ión obtenido en ESI-MS en m/z 771,4156, (calculado para $C_{37}H_{64}NaO_{15}$, 771,4137, error 1,9 ppm. (Anexo C). El espectro de RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$, Tabla 2-2), mostró ser un éster de sacarosa con señales características de dos grupos isobutilo y un isovalerilo en δ_H 2,40, (2H, dd, 14,0, 7,0), estas señales muestran coincidencia con las encontradas para el Peruviósido D (compuesto P2).

En el espectro de RMN- ^{13}C para este compuesto ($CDCl_3$, 100 MHz, Tabla 2-2) así como el

análisis de los espectros HSQC y HMBC (Tabla 2-2) permitieron confirmar la propuesta de estructura para este compuesto. La diferencia con el Peruviosido D fue la longitud de la cadena del ácido graso de la posición 2, el cual tenía una longitud de 12 átomos de carbono, con señales en δ_C 172,88; 33,93; 31,88; 29,57; 29,57; 29,39; 29,30; 29,21; 29,09; 24,57; 22,66 y 14,07, y la fórmula molecular $C_{37}H_{64}NaO_{15}$, la cual muestra la presencia de cuatro metilenos más que en el Peruviosido D. Así, la estructura del compuesto P4, se estableció como se presenta en la Figura 2-9 4.

Finalmente, el mismo análisis espectroscópico aplicado a los compuestos P1 a P4 fue aplicado para las fracciones FD8.6.10 y FD8.6.12 permitiendo identificar el Peruviosido A (compuesto P5) y B (compuesto P6), previamente reportados por Franco et al. (116, 134).

Los Peruviosidos A a F son descritos como una familia de ésteres de sacarosa caracterizados por la presencia de grupos isobutilos en la posición C-4 la subunidad de glucosa. Esta clase de compuestos han sido descritos previamente en otras especies de *Physalis* como *P. philadelphica* Lam. y *P. angulata* (140, 162), así mismo, en otros exudados comúnmente observados en solanáceas como los provenientes de los géneros *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (159, 160). Además de los frutos, estos ésteres de sacarosa también están presentes en los tricomas y se cree que protegen a la planta y a los frutos frente a insectos y hongos. También ha sido reportado que estos compuestos son responsables de la actividad antiinflamatoria en los extractos de esta especie (162). Como en otras especies, estos ésteres de sacarosa son considerados como el principal material de los exudados obtenidos, principalmente en la fracción FD.

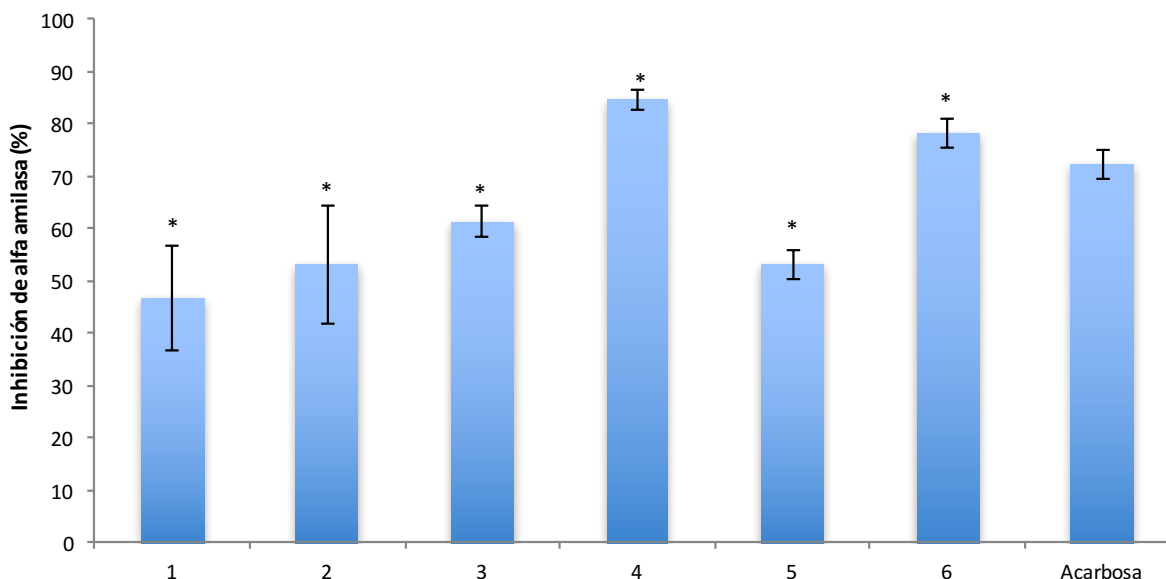
La actividad *in-vitro*, de los Peruviosidos A-F se muestran en la Figura 2-11, en donde se observa que el Peruviosido B y F son los más activas, seguidos por los Peruviosidos E, D y C.

2.3.3 Cuantificación de glucosa y fructosa por HPLC

Luego de la descripción de los marcadores terapéuticos presentes en la fracción FD, se desarrolló una metodología por HPLC para la determinación de los marcadores analíticos en las siguientes etapas del desarrollo del producto fitoterapéutico. Esta metodología permitirá por ejemplo, evaluar la liberación del extracto etanólico de frutos de *P. peruviana*

a partir del sistema de liberación modificada.

Figura 2-11 Actividad *in-vitro* expresada de inhibición de α amilasa para los Peruviósidos A-F.



1: Peruviósido C; 2: Peruviósido D; 3: Peruviósido E; 4: Peruviósido F; 5: Peruviósido A; 6: Peruviósido B. Los datos se presentan como la media de las observaciones \pm desviación estándar * Las fracciones no presentan diferencias significativas en comparación con el grupo control $P < 0,05$

2.3.3.1 Desarrollo del método analítico

En primera instancia se intentó desarrollar un método cromatográfico para la cuantificación de los Peruviósidos A – F. Sin embargo, luego de repetidos intentos empleando detectores UV, IR y detector ELSD, esto no fue posible, debido a la baja concentración de estos compuestos frente a la alta concentración de azúcares en la fracción FE, tal y como se muestra en la Figura 2-12 y la Los NADES (Figura 2-13), presentes en el extracto posiblemente están reteniendo varios de los metabolitos secundarios, aumentando la dificultad para encontrar un marcador que permita la cuantificación del extracto.

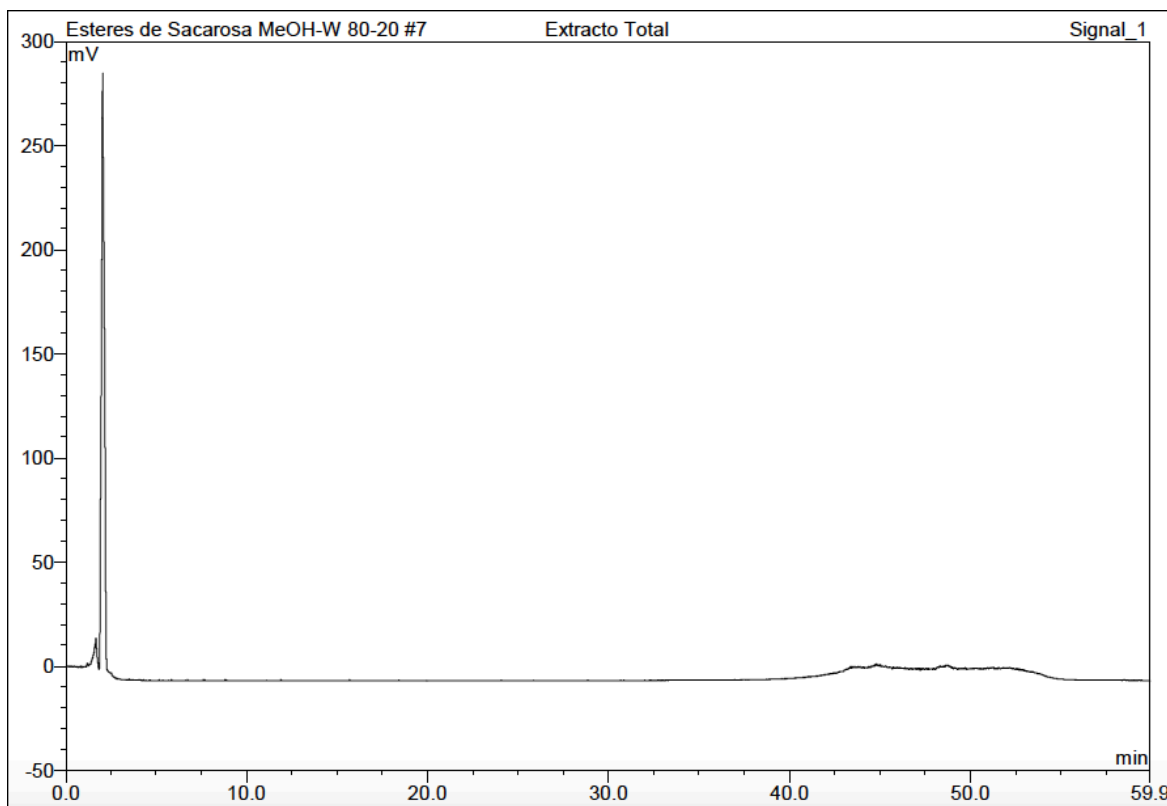
Por tal motivo, en este trabajo se desarrolló un método por HPLC-IR para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa, las cuales se emplean como marcadores analíticos. Para productos alimenticios y frutas (154, 168), es común encontrar sistemas cromatográficos

no convencionales para la identificación de azúcares del tipo glucosa, fructosa y sacarosa (155).

Figura 2-13.

Esta dificultad podría deberse a la naturaleza del extracto, en el cual se identificó en el perfil de RMN-¹H basados en el trabajo publicado por Cañari et al. (163) la presencia de sacarosa, glucosa, ácido málico, ácido cítrico, GABA, glicina, purina, valina, entre otros compuestos (Figura 2-13). Estos compuestos se conoce que hacen parte de los “disolventes eutécticos profundos de origen natural”, NADES de su sigla en inglés (Natural deep eutectic solvents), que corresponden a líquidos iónicos de origen biológico y solventes eutécticos profundos (164-167). Estos compuestos son típicamente encontradas en frutos en cantidades abundantes.

Figura 2-12 Perfil cromatográfico del extracto de frutos de *Physalis peruviana* (Detector ELSD)

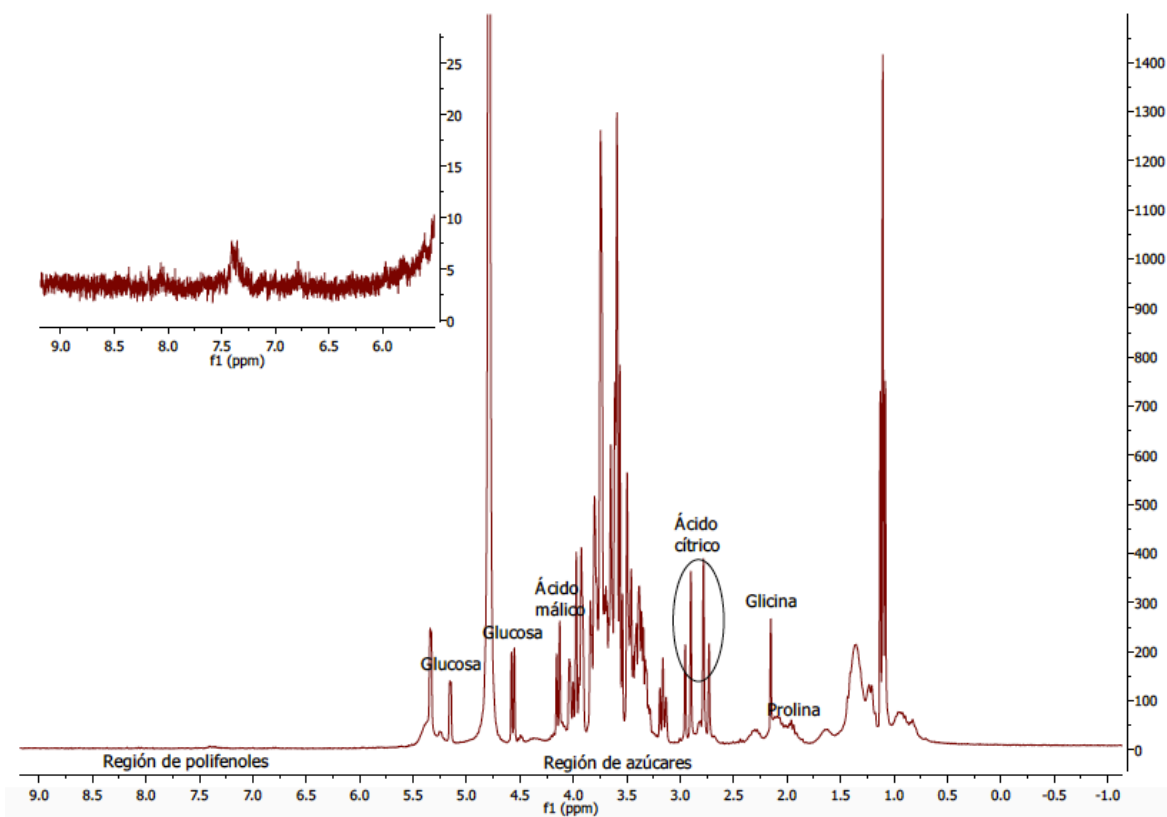


Volumen de inyección 20 µL; Fase estacionaria: Columna XDB-C18 (5 µm; 9,5 X 250 mm); Fase móvil: MeOH/H₂O 90:10, 30 min; MeOH 100, 5 min; MeOH 100, 10 min; MeOH/ H₂O 90:10, 5 min; Flujo 1,5 mL/min; detector ELSD.

Los NADES (Figura 2-13), presentes en el extracto posiblemente están reteniendo varios de los metabolitos secundarios, aumentando la dificultad para encontrar un marcador que permita la cuantificación del extracto.

Por tal motivo, en este trabajo se desarrolló un método por HPLC-IR para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa, las cuales se emplean como marcadores analíticos. Para productos alimenticios y frutas (154, 168), es común encontrar sistemas cromatográficos no convencionales para la identificación de azúcares del tipo glucosa, fructosa y sacarosa (155).

Figura 2-13 Espectro de RMN-¹H en DMSO del extracto etanólico de *Physalis peruviana* (163)

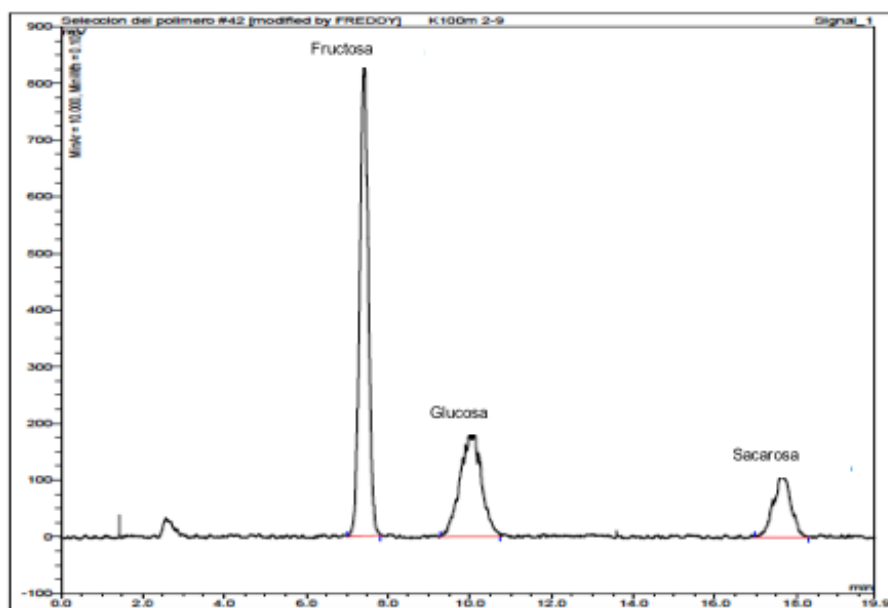


Antes de llegar al método por HPLC-IR, basados en estudios previos (154, 155, 168), inicialmente se propuso un sistema cromatográfico utilizando un equipo de UHPLC-ELSD, usando como fase estacionaria una columna Phenomenex Luna NH₂ 100 Å (3µm – 150 X 2mm), con una temperatura del horno de 30°C, como fase móvil MeCN:H₂O (82,5:12,5) por

20 minutos y con un flujo de 0,2 mL/min. Las condiciones del detector ELSD fueron ganancia: 10; temperatura: 82°C. Para la evaluación de los sistemas cromatográficos se trabajó con el extracto etanólico estandarizado de frutos de *P. peruviana*, con una concentración de 1 mg/mL en agua Milli-Q.

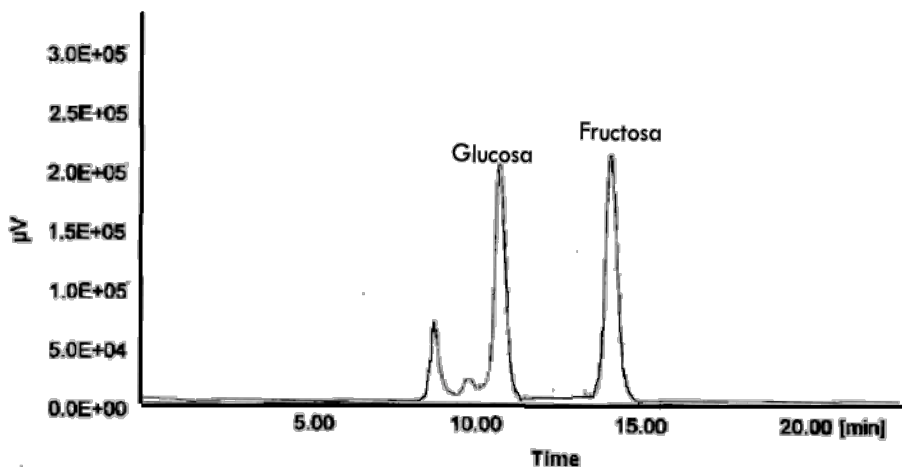
De acuerdo al perfil cromatográfico del extracto (Figura 2-15), se pueden observar tres picos bien diferenciados correspondientes a fructosa, glucosa y sacarosa. Sin embargo, debido al tipo de detector que se está utilizando en el sistema cromatográfico el ruido que se obtiene es alto y puede generar problemas en la cuantificación, por esta razón, este sistema cromatográfico únicamente fue utilizado para la etapa de selección de los polímeros.

Figura 2-14 Perfil cromatográfico del extracto de frutos de *Physalis peruviana* para la cuantificación de azúcares (en presencia de diferentes polímeros).



Columna Phenomenex Luna NH₂ 100 Å (3µm – 150 X 2mm), temperatura del horno 30°C, fase móvil MeCN:H₂O (82,5:12,5) por 20 minutos, velocidad de flujo de 0,2 mL/min, Detector ELSD: ganancia 10; temperatura: 82°C; volumen de inyección 10 µL

Figura 2-15 Perfil cromatográfico del extracto de frutos de *Physalis peruviana* para la cuantificación de azúcares (ejemplo de cromatograma correspondiente al estudio de la cinética de liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas).



Columna Aminex® HPX 87H (300 mm x 7,8 mm, 9 μm), temperatura del horno de 60°C. Fase móvil H₂SO₄ 0,05 mM. Velocidad de flujo 0,6 mL/min. Volumen de inyección 10 μL.

Considerando la dificultad en el uso del método anterior, se implementó y se validó un método analítico por HPLC para la cuantificación de fructosa y glucosa en el extracto de frutos de *P. peruviana*, mediante detección IR, la cual se realizó en un equipo HPLC (Agilent Technology modelo 9100). Como fase estacionaria se utilizó una columna Aminex® HPX 87H 300 mm x 7,8 mm, 9 μm con una temperatura del horno de 60 °C. Para el método se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 0,05 mM. El volumen de inyección fue de 10 μL y el flujo se mantuvo constante a 0,6 mL/min. Cada solución fue filtrada a través de una membrana de 0,45 μm antes de inyectar en el equipo de HPLC (Figura 2-15).

2.3.3.2 Validación de la metodología analítica

Se desarrolló y validó un método cromatográfico con el detector IR, que permitió una adecuada separación de la glucosa y fructosa de los demás componentes del extracto de frutos 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 especificidad como selectividad, ya que proporciona una señal de los marcadores con una pureza de pico satisfactoria en función del espectro IR de esta, así como evita la interferencia de componentes de las diferentes matrices (extracto vegetal y co-procesado con el polímero HPMC-K15M). En la Tabla 2-3, se presentan de manera resumida los resultados de los parámetros evaluados.

Las curvas de calibración construidas con los estándares presentaron una adecuada linealidad en el rango de trabajo, demostrada para el sistema y las matrices de HPMC-K15M y del extracto, según análisis estadístico. La curva de calibración es lineal en el intervalo de concentración de 0,25-10,00 mg/mL con $R^2 = 0,9991$ y $0,9995$ para glucosa y fructosa respectivamente.

Se comprobó una adecuada precisión y exactitud del método. La precisión (repetibilidad) intra-día y entre días (precisión intermedia) para los marcadores fueron satisfactorias con valores de coeficiente de variación (CV) inferiores al 5%. El porcentaje de recuperación cae dentro de la especificación de 95% - 105%, lo que demuestra la exactitud del método para los dos marcadores analíticos. Los límites de cuantificación y detección fueron de 0,068 y 0,021 mg/mL para fructosa y 0,049 y 0,015 mg/mL para glucosa, respectivamente.

Tabla 2-3 Resumen de los resultados de la validación del método analítico por HPLC-IR, para los marcadores fructosa y glucosa.

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Fructosa (%)	Glucosa (%)	
Selectividad	La matriz del producto no presenta ninguna señal que interfiera con la señal del estándar	Cumple	Cumple	
	pH 1,2 Estándar	0,01	0,01	
		0,12	1,56	
		1,35	0,00	
	pH 1,2 Extracto	1,03	1,53	
		0,75	1,34	
		1,58	0,13	
	pH 1,2 Placebo	0,29	0,45	
		2,30	1,30	
		2,47	1,80	
	pH 6,8 Estándar	0,45	2,55	
		0,27	1,09	
		0,39	2,94	
	pH 6,8 Extracto	2,38	0,73	
2,67		1,69		
4,90		2,75		
pH 6,8 Placebo	1,14	1,12		
	3,55	1,59		
	1,63	2,75		
Precisión del sistema (Repetibilidad)	CV < 5,0%	Estándar 0,25 mg/mL	2,44	3,19
		Extracto 0,25 mg/mL	1,30	4,56
		Placebo 0,25 mg/mL	1,11	3,82
		Estándar 5,0 mg/mL	1,51	0,32
		Extracto 5,0 mg/mL	1,46	1,14
		Placebo 5,0 mg/mL	0,43	1,37
		Estándar 10 mg/mL	0,72	0,57
		Extracto 10 mg/mL	0,40	1,15
		Placebo 10 mg/mL	0,27	1,51
Precisión intermedia	CV < 5%	Estándar	4,72	3,62
		Extracto	2,21	0,58
		Placebo	2,48	1,22
Exactitud del	% Recuperación valoración del	Extracto	103,2	100,9

Parámetro	Especificación		Resultado	
			Fructosa (%)	Glucosa (%)
método	marcador (95,0 – 105,0%)	Placebo	103,1	104,94
	CV ≤ 5%	Extracto	2,75	1,25
Linealidad del sistema y del método	F experimental > F tabla F tabla = 4,301	Placebo	1,66	1,65
		Estándar	158,3	219,6
		Extracto	264,0	118,0
	R ² = 0,99	Placebo	49,4	100,82
		Estándar	0,999	0,999
		Extracto	0,999	0,998
	t exp > t tabla t tab (22; 0,05) = 2,0739	Placebo	0,991	0,998
		Estándar	25074,1	48206,2
		Extracto	69691,3	13922,9
			Placebo	2435,5

Estos resultados demuestran que el método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de los marcadores seleccionados, en el extracto de frutos de *P. peruviana* y en presencia de los componentes de la matriz hidrofílica está validado y por tanto puede ser empleado para las cuantificaciones requeridas en las fases siguientes.

Los resultados detallados, con los análisis estadísticos correspondientes, se presentan en el Anexo B.

2.1 Conclusiones

Se demostró que la actividad *in-vitro* de inhibición de α -amilasa del extracto crudo de frutos de *P. peruviana*, se debe a los compuestos que recubren el fruto, obtenidos principalmente a partir de los extractos en diclorometano y en metanol del fruto intacto. Se estableció que la actividad de inhibición de α -amilasa también se detectó, en menor magnitud, en las fracciones solubles en acetato de etilo y en butanol, obtenidas de los extractos estandarizados de los frutos de *P. peruviana*.

El estudio bioguiado de este extracto permitió el aislamiento de 6 ésteres de sacarosa, identificados como los Peruviósidos A-F por medio de RMN mono y bidimensional, así como datos de espectrometría de masas. Los Peruviósidos C-F, se reportaron por primera vez en la naturaleza, estableciendo que sus estructuras varían en la longitud de la cadena del ácido graso en la posición 2 con longitudes de cadena de C8, C10 y C12, con sustituyentes isobutirilo en las posiciones 2 y 3 de la glucosa y con sustituyentes isobutirilo o isovalerilo en las posiciones C3' de la fructosa.

Este estudio fitoquímico permitió identificar a los marcadores terapéuticos responsables de esta actividad, encontrando que los compuestos P4 y P6, Peruviosido B y F respectivamente son los más activos, pero se encuentran en concentraciones muy bajas para poder ser cuantificados en el extracto.

Para la implementación de un método cromatográfico para las etapas posteriores de la formulación del producto fitoterapéutico, se seleccionaron la fructosa y la glucosa como marcadores analíticos, debido a la alta concentración de estos monosacáridos en el extracto.

Se desarrolló una metodología analítica para la detección y cuantificación de la fructosa y la glucosa por HPLC-IR, la cual se validó en los atributos: precisión y exactitud del método, precisión (repetibilidad) intra-día y entre días (precisión intermedia), con CV inferiores al 5% y el porcentaje de recuperación cumplió la especificación del 95% - 105%. Los análisis estadísticos realizados demostraron la linealidad en las diferentes condiciones evaluadas. Los límites de cuantificación y detección fueron de 0,068 y 0,021 mg/mL para fructosa y 0,049 y 0,015 mg/mL para glucosa, respectivamente. Se demostró la selectividad del método bajo las condiciones de trabajo para el extracto y las matrices hidrofílicas.

Capítulo 3. Establecimiento de las condiciones del proceso para la obtención del extracto seco aplicando la metodología de secado por aspersión

Una vez establecidos, los marcadores responsables de la actividad en el extracto etanólico de *Physalis peruviana* (Peruviósidos A-F) y determinados los compuestos mayoritarios presentes, que se constituirían como marcadores analíticos (glucosa y fructosa), se desarrolló y validó el método de cuantificación por HPLC requerido para las siguientes fases, relacionadas con el desarrollo de la formulación. En este capítulo se inicia con este desarrollo partiendo de establecer las condiciones de secado para obtener el extracto, como producto intermedio del proceso, que cumpla con las propiedades requeridas para ser empleado en una formulación de compresión directa.

Los ensayos buscan evaluar el efecto de diferentes factores inherentes al equipo empleado (equipo de secado por aspersión) y a la composición de la suspensión de partida, que incluye el extracto, sobre distintas variables respuesta que, mediante un DEE adecuado, permita establecer las condiciones para lograr el extracto seco con las propiedades farmacotécnicas requeridas para las fases siguientes.

3.1 Marco conceptual

3.1.1 Características generales del extracto

En lo que se refiere a las características generales del extracto del que se parte para el desarrollo de la formulación, en un trabajo anterior con el extracto estandarizado de *P. peruviana* se desarrollaron los estudios de preformulación en donde se evaluaron los

principales factores que pueden afectar la estabilidad del extracto; las propiedades físicas y químicas tanto del extracto como del absorbato obtenido a partir de este y los ensayos de compatibilidad del extracto frente a diferentes excipientes comúnmente empleados en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas (26).

En este trabajo anterior, se estableció que el extracto posee un color naranja oscuro a café oscuro, de olor característico, un sabor ácido y muy amargo que permanece al final. Así mismo, su textura es muy pastosa, pegajosa, con limitadas propiedades de flujo (flujo pobre y no uniforme), alta cohesividad, baja compresibilidad y alta higroscopicidad. Se determinó que este es sensible a condiciones de temperatura media de 60°C y a la radiación ultravioleta a 256 nm, igualmente se determinó su compatibilidad con excipientes como el talco, estearato de magnesio, croscarmelosa, crospovidona, celulosa microcristalina, almidón de maíz, dióxido de silicio coloidal, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxipropilcelulosa (HPMC), metilcelulosa (MC) y carboximetilcelulosa (CMC). Con la transformación tecnológica del extracto al estado sólido, empleando un proceso de granulación vía húmeda, se mejoraron la estabilidad, especialmente frente a la humedad y las propiedades farmacotécnicas, facilitando su manejo y su subsecuente transformación en una forma farmacéutica sólida comprimida (26, 29, 169).

Considerando la importancia de garantizar la estabilidad del extracto, como producto intermedio en el proceso de llegar a un producto fitoterapéutico, la industria farmacéutica continuamente está en la búsqueda de nuevas tecnologías más versátiles que faciliten la obtención de extractos en el estado sólido. El secado por aspersión o spray drying, es uno de los métodos más utilizados para el procesamiento de extractos, por encima del procedimiento tradicional, debido a que este reduce el tiempo de lanzamiento al mercado de un producto, ya que trae consigo beneficios como la facilidad en el escalado y una menor variabilidad de los productos (170, 171).

El secado por aspersión de extractos fluidos resulta en un producto con mejores propiedades en comparación con otros métodos, ya que este produce polvos homogéneos, además de permitir el secado de extractos fluidos altamente termolábiles sin correr el riesgo de la degradación de sus componentes (172, 173).

En general, los extractos secos de plantas, incluyendo el de *P. peruviana*, son higroscópicos y tienen propiedades reológicas y de compactabilidad deficientes (26). Por estas razones,

no pueden ser utilizados para compresión directa (CD) sin previa adición de vehículos y/o uso de las adecuadas tecnologías de procesamiento (26, 171, 174). Por lo tanto, la producción de extractos vegetales secos estables y con buenas propiedades de flujo constituyen un reto importante para los formuladores y fabricantes en la industria de fitomedicamentos (26, 171).

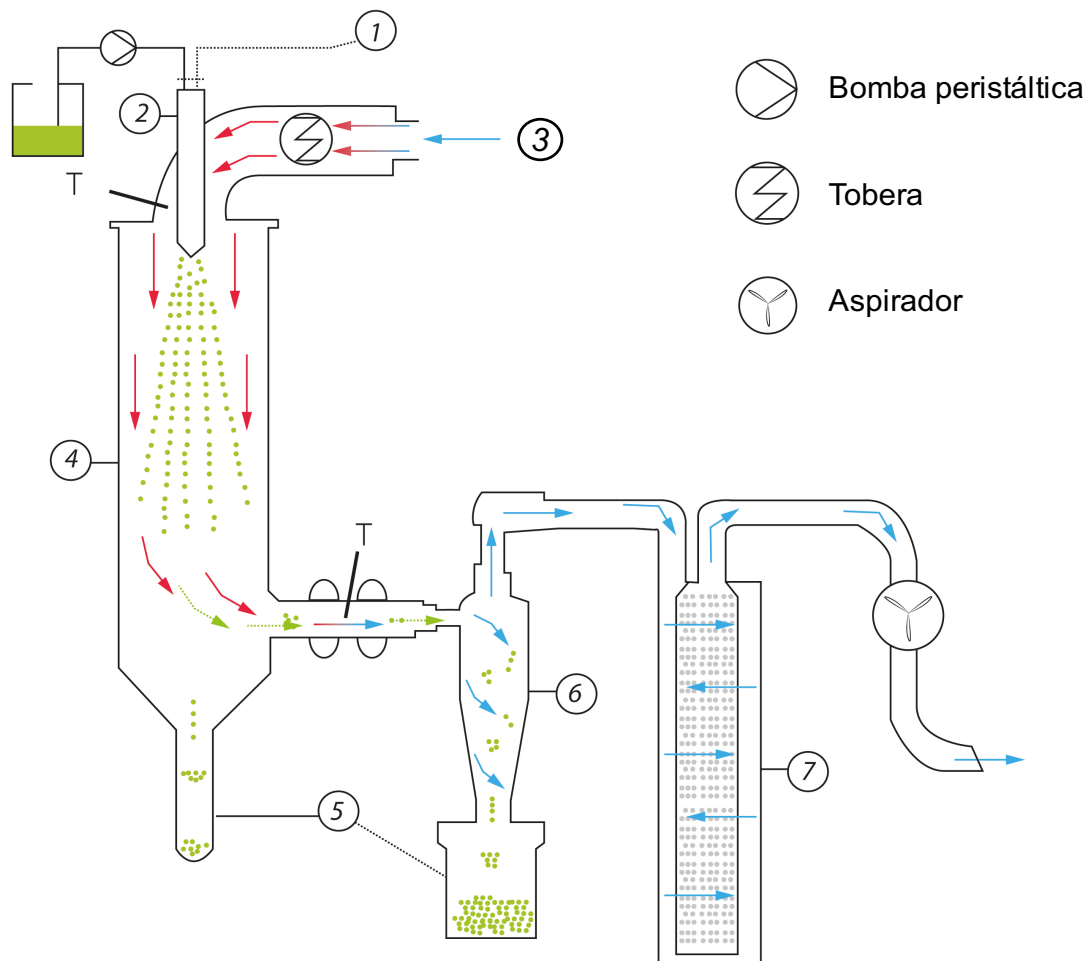
3.1.2 Secado por aspersión (Spray Drying)

El secado por aspersión o pulverización se puede definir como la transformación de un material desde un estado fluido a uno sólido en un sólo paso gracias a la alimentación de un medio de secado o gas caliente. La producción de dichas partículas es una operación unitaria ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para producir excipientes. Además, es usada para el secado de extractos, debido a la rápida evaporación del solvente (175-177).

El secado por pulverización se consigue mediante la atomización de una solución o suspensión, en un medio de secado caliente (normalmente aire). La atomización produce un rocío fino del material a secar y es un factor clave en la fabricación de productos de alta calidad, mediante la creación de condiciones óptimas para la evaporación del medio de disolución (175). Este es un proceso continuo que involucra la combinación de varios estadios, a saber: atomización, mezcla del rocío con el gas de secado, evaporación y separación del producto (Figura 3-1) (178).

Existen numerosos diseños de dispositivos secadores por aspersión (178). Los equipos son generalmente de ciclo abierto mediante el cual el gas de secado se descarga después de su uso, como se muestra en la Figura 3-1. Para los equipos que operan de esta manera, generalmente se utiliza aire comprimido como gas de secado. Sin embargo, existen configuraciones de ciclo cerrado (como el que se emplea en esta investigación), que permiten la utilización de solventes orgánicos en la solución de alimentación. En este tipo de equipos, el aire de secado se sustituye por un gas inerte, generalmente nitrógeno, el cual recircula continuamente reduciendo el riesgo de explosión, proporcionando la posibilidad de recuperar el solvente orgánico (178).

Figura 3-1 Los procesos principales involucrados en el secado por aspersion (178).



Secado por aspersion. 1. Entrada de nitrógeno reutilizado; 2. Aguja (Tobera); 3. Entrada de nitrógeno de secado; 4. Cilindro de secado; 5. Vasos de recolección de producto seco; 6. Ciclón; 7. Filtro; T. Temperatura.

La aglomeración de los polvos sobre las paredes del equipo es uno de los principales problemas durante el secado por pulverización de extractos vegetales, leche, zumos de fruta, y otros productos líquidos. En general, los productos que son secados por pulverización se clasifican en dos grupos principales: los no adherentes y los adherentes. Los no adherentes se pueden secar con equipos de diseños simples. Por otro lado, los productos adherentes son problemáticos, el secado de estos materiales puede realizarse con éxito mejorando el diseño del equipo, con la adición de coadyuvantes a la solución o suspensión de alimentación, o ambos. Esta característica adherente (“pegajosa”) de

algunos extractos está asociada a un alto contenido de azúcares que confieren una alta higroscopicidad (175, 177), que como ya se mencionó, es una característica del extracto de *P. peruviana*. Esta alta higroscopicidad y la naturaleza termoplástica de tales materiales conduce a otros problemas tales como la cristalización, el difícil manejo tecnológico, aglomeración y apelmazamiento durante el almacenamiento (175, 177).

La utilidad de los métodos teóricos para el diseño y predicción del desempeño del secado por pulverización para una aplicación particular es bastante limitada. Esto se debe principalmente a la falta de correlación entre la distribución del tamaño de gota y las propiedades físicas y química de la solución de alimentación, así como también a la descripción del comportamiento de las gotas bajo variaciones de la velocidad del aire y la temperatura dentro del secador, lo que define la contracción o expansión del tamaño en la partícula, la degradación térmica y otros mecanismos de deformación. Estos factores indican claramente la necesidad de la realización de diseños experimentales para el establecimiento de las condiciones de operación, midiendo algunas de las propiedades del producto así como también el rendimiento del proceso, sobre todo cuando se están secando nuevos materiales o materiales con un comportamiento desconocido (175).

El secado por aspersión no es una tecnología nueva para la industria farmacéutica, la cual la ha utilizado con éxito desde principios de los años 40. Este método de secado es favorable para materiales biológicos sensibles al calor, tales como enzimas y proteínas de uso farmacéutico, con una pérdida mínima de actividad (178). También se ha utilizado en tecnología farmacéutica para producir excipientes con mejoramiento de ciertas propiedades; tal es el caso de la lactosa que se utiliza para mejorar las propiedades de flujo (179) y en otros casos para preparar gránulos de flujo libre para la producción de tabletas (180).

Al modificar las variables asociadas al proceso de secado por aspersión, es posible alterar y controlar las propiedades mencionadas de los polvos obtenidos, lo que sin duda, es muy útil para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos. Un gran número de artículos publicados en el tema describen la preparación de materiales por medio de estas técnicas de secado para propósitos tales como la modificación de las propiedades biofarmacéuticas (181-184), la formulación de sólidos para la preparación de emulsiones redispersables (185-189), la elaboración de microsferas y nanopartículas (190-193), la formulación de polvos co-procesados con polímeros hidrófilos, con las propiedades

deseadas para producir sistemas de liberación modificada de extractos (31, 62) y la obtención de extractos secos (171, 175, 194-198).

Sin embargo, la tecnología de secado por pulverización o aspersion requiere de un adecuado ajuste de las condiciones de funcionamiento, así como de la composición de la solución o suspensión a secar (que contiene los principios activos o el extracto). Las variables de funcionamiento son: temperatura del aire de entrada, flujo del aire de atomización, velocidad de la bomba o tasa de flujo del líquido, velocidad de aspiración y concentración de los sólidos, y la composición de la solución o dispersión a ser secada por pulverización (170). La comprensión de cómo los cambios en estos parámetros de procesamiento afectan a las propiedades reológicas y estabilidad en los polvos producidos es conveniente para la producción industrial de más formas de dosificación sólidas por compresión directa (CD) (170, 171). Gonnissen et al. (170, 194, 195, 199) desarrollaron una técnica de co-procesamiento a través de secado por pulverización para obtener un proceso de fabricación continuo 'listo para comprimir', sin granulación intermedia, molienda o mezcla.

En este contexto, a continuación se presenta el estudio de los diferentes factores asociados al proceso de secado por aspersion y su influencia en diferentes variables respuesta, especialmente de tipo farmacotécnico, aplicando un DEE que permitiera establecer las condiciones de operación para obtener un extracto seco de *P. peruviana*, como producto intermedio con miras al desarrollo de un fitoterapéutico.

3.2 Metodología

3.2.1 Materiales

Los frutos de *P. peruviana* fueron colectados en Subia, Cundinamarca, Colombia en Enero de 2014. 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 (Nº Col. 574701). Para la preparación de los extractos se utilizó etanol (EtOH) 96% y como coadyuvante de secado se utilizó dióxido de silicio coloidal (Aerosil 200®, Degussa AG, de Evonik industries), de acuerdo a lo establecido en trabajos

previos en el tema (1).

3.2.2 Equipos

Para el proceso de secado del extracto se utilizó el equipo de secado por aspersión Büchi B290, utilizando una boquilla con un orificio de 1,5 mm de diámetro y usando un deshumidificador e Inert loop B 295 para secado con solventes orgánicos.

Para la obtención del extracto fluido se utilizó una estufa de aire circulante Stokes, y el extracto se concentró en un rotavapor IKA RV210, operado a una temperatura de 40°C y a 100 mBar de vacío. Para la determinación del índice de refracción se utilizó un refractómetro digital Mettler toledo 30PX. La determinación del peso del material seco se realizó en una balanza de precisión Ohaus modelo PA 3102.

La preparación de las muestras se realizó mediante una plancha de agitación IKA C-MAG HS 7 y para la caracterización previa al secado, en cuanto a la determinación de la viscosidad de las mismas, se utilizó un viscosímetro Brookfield DV-E.

Para la determinación del contenido de humedad se usó una balanza de humedad Geheka IV-2000.

La determinación de la morfología de las partículas se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI-Quanta 200, bajo un voltaje de aceleración de 30 kV en alto vacío, las muestras fueron metalizadas con una capa de oro mediante pulverización catódica utilizando un equipo Quorum Q150R ES. En cuanto al tamaño de las partículas se utilizó un microscopio óptico UNICO G380 acoplado a una cámara digital Moticam 2000 de 2,0 Megapíxeles.

La voluminosidad y la densidad de las partículas se determinaron con ayuda del equipo Tap Density JV1000 Copley.

La caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se hizo en un equipo Shimadzu DSC-60 y la Caracterización por difracción de rayos X (DRX) se realizó utilizando un difractómetro PANalytical's X'Pert PRO MRD, con un tubo de rayos X anódico PW3373/00 Cu LFF DK332001.

3.2.3 Métodos

3.2.3.1 Obtención del extracto fluido

El extracto fluido (con un contenido de sólidos totales de máximo 10% P/P), como materia prima de partida para el secado por aspersión se preparó siguiendo la metodología previamente establecida (200). Para esto se pesaron 5 kg de frutos previamente seleccionados y lavados, posteriormente, se procedieron a pesar fracciones de 500 g de frutos y a licuarlos con 100 mL de etanol al 96%, para colocar en cada bandeja de la estufa de secado, previamente forradas con plástico. El secado del material se realizó a una temperatura de $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, se pesaron 400 g de material seco y con ayuda de un mortero se humectó con 300 mL de alcohol USP. El material humectado se colocó en un percolador de 2 L y se adicionaron 1500 mL de etanol al 96%. Después de 24 horas se procedió a abrir la llave del percolador, con una velocidad de goteo media de aproximadamente 150 gotas por minuto. Para obtener el extracto fluido, este se concentró en un rotavapor a presión reducida, con temperatura de 40°C y con una velocidad de rotación de 50 rpm. El punto final se determinó construyendo una gráfica de índice de refracción vs. residuos sólidos del extracto, la cual se determinó reconstituyendo el extracto, seco por rotaevaporación, con etanol a una concentración conocida (200).

3.2.3.2 Establecimiento de las condiciones para el secado por aspersión

Al realizar el proceso de secado por aspersión al extracto de frutos de *P. peruviana*, este se adhirió a las paredes del cilindro de secado y se obtuvo un material de características pastosas; esto debido a las propiedades del extracto, previamente descritas. Este comportamiento hizo necesario la adición de un coadyuvante de secado, como se sugiere en trabajos previos (92, 93, 175, 196-198). En particular, el uso de dióxido de silicio coloidal ha sido recomendado para este fin ya que permite la obtención de un extracto seco no higroscópico, con buena fluidez, buenas características de compresión y propiedades de compactabilidad (62, 171, 175, 197, 201, 202), por lo que se seleccionó este excipiente como coadyuvante y se considera como una de las variables que se tiene en cuenta en el estudio para la determinación de las condiciones de secado.

▪ **Diseño estadístico experimental (DEE)**

Las condiciones de secado del extracto se establecieron teniendo en cuenta variables como la temperatura de inyección, la velocidad de flujo del nitrógeno de inyección, el ajuste de la bomba, el ajuste del aspirador, la concentración del extracto y la proporción del coadyuvante de secado.

Se utilizó un DEE tipo factorial del orden 2^{6-2} como se muestra en la Tabla 3-1, para determinar el efecto de las variables de operación sobre las propiedades del polvo obtenido, en el que se consideran como variables de operación los parámetros: temperatura de inyección, velocidad de flujo del nitrógeno de inyección, ajuste de la bomba, ajuste del aspirador, concentración del extracto y la proporción del coadyuvante de secado. En la Tabla 3-2 se resumen los niveles de estas variables, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a estudios previos (62, 170-172, 175, 176, 178, 192, 194-199, 203-208) y ensayos preliminares realizados.

Tabla 3-1 Matriz experimental para el secado del extracto.

Experimento	A	B	C	D	E	F
1	-	+	-	+	+	-
2	+	-	-	+	+	-
3	-	+	-	-	-	+
4	-	-	-	+	-	+
5	+	+	-	-	+	-
6	+	-	+	-	+	-
7	-	-	-	-	+	+
8	+	-	+	+	-	+
9	+	-	-	-	-	-
10	-	+	+	-	+	-
11	+	+	-	+	-	+
12	-	+	+	+	-	+
13	-	-	+	-	-	-
14	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	-	-	+
16	-	-	+	+	+	+

A = Temperatura de inyección; B = Velocidad de flujo del nitrógeno de inyección; C = Ajuste de la bomba; D= Ajuste del aspirador; E = Concentración del extracto; F = Proporción del coadyuvante de secado.

Tabla 3-2 Niveles de las variables de operación para el DEE.

Variable	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)	Unidades
(A) Temperatura de inyección	80	120	°C
(B) Velocidad de flujo del nitrógeno de inyección	400	600	L/h
(C) Velocidad de alimentación	5	15	%
(D) Ajuste del aspirador	80	100	%
(E) Concentración del extracto	5,0	10,0	% (p/p)
(F) Relación extracto : coadyuvante de secado	1:0,5	1:1	-

▪ Preparación de la muestra y caracterización previa al secado

De acuerdo a lo explicado, se partió para cada ensayo de una suspensión que incluyó las proporciones determinadas de dióxido de silicio coloidal y del extracto fluido, según los niveles de las variables de operación para el DEE presentado (ver Tabla 3-1 y Tabla 3-2). La dispersión de los componentes en el solvente (etanol 96%) se realizó mediante agitación magnética en una plancha de agitación durante 30 minutos; esta agitación se mantuvo durante todo el procesamiento. Previo al secado se determinó la viscosidad de cada suspensión por triplicado a 20°C, utilizando el viscosímetro Brookfield DV-E con un vástago Spin-05, a 50 RPM.

▪ Variables respuesta evaluadas

Se evaluaron las características físicas del extracto seco (contenido de humedad, tamaño y distribución de tamaño de partícula, morfología, fluidez, densidad y voluminosidad), el comportamiento frente a la humedad del extracto (higroscopicidad), el rendimiento del proceso y la temperatura de salida (inherente al funcionamiento del equipo).

▪ Rendimiento del proceso

El rendimiento se calculó como la relación entre el peso del polvo seco obtenido y el contenido inicial de sólidos presentes en la dispersión a secar.

▪ Contenido de humedad

El contenido de humedad de los polvos se determinó en una balanza de humedad. Las muestras y las determinaciones se hicieron inmediatamente después de terminar el proceso de secado por aspersión.

▪ Temperatura de salida

La temperatura de salida corresponde a la temperatura en la salida del cilindro de secado y esta se mide directamente en el panel del equipo de secado por aspersión.

▪ Tamaño y forma de partícula

La determinación y descripción de la forma de las partículas obtenidas se realizaron mediante microcopia electrónica de barrido (MEB). Para el tamaño y la distribución de tamaño de partícula se empleó el método de microscopía descrito por la USP 38 (209) y por Martin et al. (210), estandarizado en trabajos anteriores (211-214). Para este fin se evaluaron un total de 500 partículas distribuidas en 10 submuestras tomadas de diferentes partes del material de las cuales se obtuvo la información sobre el diámetro de proyección, por medio del software Motic Image Plus 2.0.

Para la determinación del tamaño de partícula se calculó el diámetro volumen-superficie (d_{vs}) (210), según la Ecuación 3-1 en donde “ n ” es el número de partículas en el rango de diámetros definidos y d es la media del diámetro del rango definido (210).

$$d_{vs} = \frac{\sum nd^3}{\sum nd^2}$$

Ecuación 3-1

▪ Voluminosidad y densidad

Para este procedimiento se pesó una cantidad de material equivalente a un volumen entre 4 y 5 mL de una probeta certificada de 5 mL, dejándolo caer libremente y midiendo el volumen ocupado por el mismo. Posteriormente, al material colocado en la probeta, se apisonó dándole 1000 golpes con la ayuda del equipo Tap Density JV1000 Copley, finalmente, se midió el volumen ocupado por el mismo. Se efectuaron cinco repeticiones por triplicado para un total de quince datos (21, 210-212). A partir de esta información se determinaron la voluminosidad y la densidad, aparente o sin apisonar y apisonada.

Con los datos de densidades se determinó el índice de compresibilidad del material, mediante el cálculo el índice de Carr (IC) usando la Ecuación 3-2, donde D_A es la densidad apisonada y D_S es la densidad sin apisonar (23, 210).

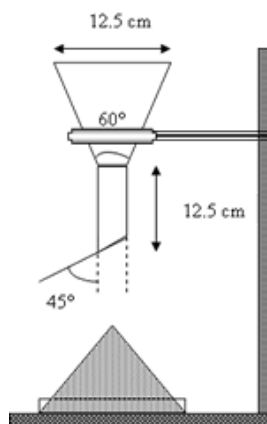
$$IC = \frac{(D_A - D_S)}{D_A} \times 100$$

Ecuación 3-2

▪ Propiedades de flujo

El flujo de los materiales se determinó por el método estático que se basa en la medida del ángulo de reposo. Se utilizó el método establecido por Martin et al. (210) y estandarizado por Rodríguez et al. (211-213). Se empleó el montaje representado en la Figura 3-2. Para esta determinación se pesaron 5 g de material y se colocaron dentro de la tolva, luego con ayuda de un vibrador en intensidad 1 se hizo fluir el material a través del embudo, permitiendo que este formara un cono; de forma cuidadosa se midió la altura y el diámetro del cono y se calculó el ángulo de reposo. Se efectuaron cinco repeticiones por triplicado para un total de quince datos.

Figura 3-2 Equipo para la determinación de la fluidez por el método del ángulo de reposo (215).



▪ Higroscopicidad

La higroscopicidad se determinó de acuerdo al método propuesto por Tonon et al. (198), adaptado por Gallo et al. (171). Se preparó una cámara con una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl), con el fin de tener una humedad relativa y controlada de 72% HR, a una temperatura de 20°C, en la que se colocaron viales destapados con el extracto seco previamente pesados. Se dejó transcurrir el tiempo hasta alcanzar el equilibrio (264 horas de exposición), para volver a pesar los viales mencionados. Con la variación del peso obtenido, se calculó la higroscopicidad del material, la cual se expresa como el porcentaje de ganancia de peso. La determinación se hizo por triplicado (216).

3.2.3.3 Análisis estadístico de los datos

▪ Tratamiento estadístico de las variables respuesta

Todos los datos de los resultados obtenidos para cada una de las variables se trataron estadísticamente para obtener un valor promedio de los datos y su respectiva variación o desviación estándar.

▪ Tratamiento estadístico del diseño experimental

La evaluación estadística de los resultados derivados del DEE se llevó a cabo por análisis de varianza (ANOVA), el efecto de cada factor principal, así como sus interacciones a dos factores se estimaron con el cálculo del coeficiente estimado. Si el signo del coeficiente estimado es positivo (+) indica un efecto directo y proporcional del factor sobre la variable respuesta evaluada, pero por el contrario si el signo del coeficiente es negativo (-), indica una proporcionalidad inversa del factor sobre la variable. La significancia estadística se establece a través del valor de p; valores inferiores a 0,05 indican que el factor de impacto es significativo con al menos 95% de confianza. Las respuestas se relacionaron con los efectos principales y las interacciones de dos factores mediante la Ecuación 3-3.

$$\gamma = b_0 + \sum_i b_i X_i + \sum_i \sum_{j>i} b_{ij} X_i X_j$$

Ecuación 3-3

Donde γ es la respuesta o su transformación matemática. El parámetro b_0 es la intersección, calculado como la media aritmética de la respuesta para todos los experimentos; b_i y b_{ij} son coeficientes del modelo de efectos principales y las interacciones de dos factores, respectivamente (217, 218). Para los efectos en general, un coeficiente positivo indica que la respuesta aumenta cuando aumenta el nivel de la variable, mientras que un coeficiente negativo muestra que la respuesta aumenta cuando el nivel de la variable disminuye. X_i representa el nivel de los factores a estudiar. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software Minitab® 17 en español (licencia # 1145461-127375 concedida a la Universidad Nacional de Colombia).

3.2.3.4 Evaluación final del proceso de secado

Basado en el DEE se eligieron las condiciones del secado por aspersión del extracto de frutos de *P. peruviana*. Al extracto seco obtenido aplicando estas condiciones de operación, se le realizaron los ensayos correspondientes a las variables respuesta, previamente explicados, para ser comparados con los resultados de los experimentos del DEE.

Adicionalmente al material obtenido bajo estas condiciones se le realizó la caracterización por calorimetría diferencial de barrido, por difracción de rayos X y la evaluación de la actividad de inhibición de α -amilasa, en las condiciones establecidas en el Anexo A.

- **Caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se evaluó el comportamiento térmico de las muestras, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Este análisis se realizó al extracto sólo seco en estufa, al coadyuvante de secado, a la mezcla física y al co-procesado del extracto seco con el coadyuvante de secado. El calentamiento inició a una temperatura aproximada de 25°C y se llevó hasta 200°C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min. Las muestras fueron colocadas en un porta muestras de aluminio con tapa y herméticamente cerradas bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 50 mL/min. Los resultados se analizaron usando el programa TA Analysis Software.

- **Caracterización por difracción de rayos X (DRX)**

Tanto al extracto, al coadyuvante de secado como al co-procesado obtenido por secado por aspersión se les realizó el análisis de DRX, en donde el tubo de rayos X anódico se operó a 45 kV y 40 mA, las medidas fueron tomadas en un rango de 0° - 100° sobre la escala de 2θ , con una velocidad de barrido de 0,0263°2 θ /s.

3.2.3.5 Ensayo *in-vitro* de inhibición de α -amilasa

El ensayo *in-vitro* de inhibición de α -amilasa, se realizó de acuerdo a la metodología de Remazol Brilliant Blue (148), descrita por Hansawasdi-Kawabata (149) y modificada por Rey et al. (150, 151), que se detalla en el Anexo A.

El ensayo se realizó con el fin de ver el efecto del secado por aspersión sobre la actividad del extracto evaluada mediante la prueba mencionada. Por lo tanto, este ensayo se realizó al extracto seco en estufa, al extracto seco por aspersión (co-procesado), a la mezcla física del extracto con el coadyuvante de secado y al coadyuvante sólo, los resultados fueron

comparados frente a acarbosa como control positivo.

Los resultados de los ensayos *in-vitro* de inhibición de α -amilasa fueron expresados como la media aritmética de los valores \pm la desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante el test de Bomferroni con el fin de evidenciar posibles cambios en la actividad del extracto de frutos de *P. peruviana*.

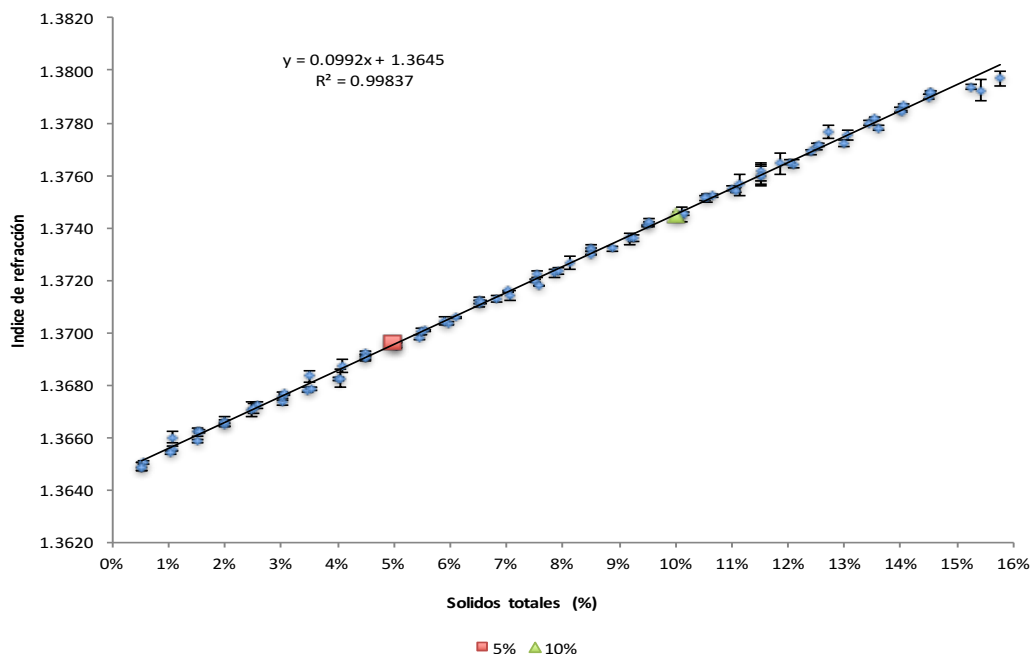
3.3 Resultados y discusión de resultados

3.3.1 Obtención del extracto fluido

La obtención del extracto fluido es la etapa previa al secado del mismo. Uno de los pasos más importantes en el proceso de obtención del extracto fluido es el control de la concentración (2, 219). A escalas piloto e industrial, donde los volúmenes de extracto que se obtienen son grandes resulta muy económico y factible la utilización del índice de refracción (IR) como parámetro de control de calidad, el cual da un criterio indirecto de la concentración del extracto. Para este fin se determinó la curva de índice de refracción contra sólidos totales (ST) del extracto de frutos de *P. peruviana*, y de esta manera se controló la concentración de sólidos totales del extracto.

La construcción de la curva inició con la obtención del extracto fluido de los frutos de *P. peruviana*, tal como se explicó en la metodología; una parte de este extracto se secó por rotaevaporación para llegar al extracto seco. De este último se pesaron por triplicado diferentes cantidades para conseguir concentraciones variables, que posteriormente se reconstituyeron en etanol para medirles el índice de refracción y así obtener la curva de calibración de la Figura 3-3.

Figura 3-3 Curva de calibración para la obtención del extracto fluido



El valor del coeficiente de determinación (0,99837), indica que el modelo lineal tiene una alta correlación entre las variables de sólidos totales e índice de refracción (219).

La ecuación definida para el modelo lineal, permite su uso en la obtención del extracto fluido con un contenido determinado de sólidos totales mediante la medición del índice de refracción (219). A partir de esta curva de calibración se pudo obtener el extracto fluido a las concentraciones de sólidos totales requeridas para el DEE, donde los índices de refracción al 5% y al 10% de sólidos totales fueron 1,3695 y 1,3745 respectivamente (Figura 3-3).

3.3.2 Establecimiento de las condiciones de secado

La estandarización de un proceso de secado por aspersión incluye el establecimiento de las condiciones de funcionamiento que favorezcan el aumento del rendimiento y que además generen un producto con especificaciones de calidad predefinidas (175, 220). Entre las propiedades más relevantes de los extractos secos están el tamaño y la distribución del tamaño de partícula, la densidad de las partículas, la forma de las partículas, la fluidez, la solubilidad y dispersabilidad, el contenido de humedad y la higroscopicidad, la apariencia y

la textura del material obtenido (178).

La composición del líquido de alimentación y las condiciones de secado pueden afectar considerablemente las propiedades previamente mencionadas (173, 203, 221, 222). Por tal motivo en el desarrollo del primer objetivo de este trabajo de investigación se buscó obtener las condiciones del proceso de secado observando la influencia que tienen diferentes factores relacionados con el equipo como: temperatura de inyección, velocidad de flujo del nitrógeno de inyección, ajuste de la bomba, ajuste del aspirador; y aquellos relacionados con el material de partida como: la concentración del extracto y la proporción del coadyuvante de secado, sobre diferentes variables respuesta evaluadas al material resultante: morfología, tamaño y distribución de tamaño de partícula; voluminosidad y densidad; propiedades de flujo; higroscopicidad; contenido de humedad y rendimiento del proceso.

Una vez obtenidos los resultados (Tabla 3-3), al aplicar cada combinación de niveles de los factores tal como se especifica en la Tabla 3-1, se procedió a desarrollar el análisis estadístico. Desde el punto de vista de la estadística existen particularidades asociadas a los tipos de respuesta, por lo que se proponen diferentes metodologías para tratar de la forma más adecuada cada una de estas (223). En todos los casos se realizó un análisis de varianza, (ANOVA), sin embargo para las respuestas con valores continuos (temperatura de salida, tamaño de partícula y voluminosidad aparente) se incluyó el análisis para las interacciones de los factores. En los otros casos no se realizó este análisis. De este análisis estadístico se deriva el coeficiente estimado y su respectivo valor p. Los análisis se realizaron en todos los casos con un nivel de significancia de 0,05, que se traduce en una confianza del 95%.

A continuación se realiza el análisis para cada una de las variables respuesta medidas; el establecimiento de las condiciones para el método de secado para el extracto estandarizado de *P. peruviana* requiere la identificación de la combinación de niveles de factores que aumentan o disminuyen dicha respuesta, por lo que se presenta un análisis detallado para cada caso. En todas las variables en las que se empleó el análisis de varianza se verificaron los supuestos de homocedasticidad con el Test de Bartlett y la distribución normal de los errores con varios Test como el de Pearson, Chi-cuadrado, Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Cramer-vo Mises y también mediante análisis gráficos. Los resultados de todas las variables se presentan en la Tabla 3-4.

Tabla 3-3 Respuestas del diseño estadístico experimental

Exp.	RP	CH	TS	TP	AR	VA	IC	HG
1	65,79 ± 1,04	1,94 ± 0,27	50 ± 2,08	2,35 ± 0,13	37,15 ± 1,14	6,52 ± 0,25	16,93 ± 0,85	13,73 ± 0,20
2	61,45 ± 2,16	1,27 ± 0,11	79 ± 1,15	4,43 ± 0,23	39,56 ± 0,56	4,35 ± 0,17	17,81 ± 0,65	14,98 ± 0,50
3	47,46 ± 6,18	1,50 ± 0,04	46 ± 2,08	3,95 ± 0,21	45,29 ± 0,52	9,01 ± 0,19	21,32 ± 0,47	8,84 ± 0,40
4	59,89 ± 6,07	0,90 ± 0,20	50 ± 2,52	3,93 ± 0,09	45,78 ± 0,48	7,89 ± 0,18	18,56 ± 0,87	8,66 ± 0,30
5	61,40 ± 0,97	0,68 ± 0,27	70 ± 2,52	3,05 ± 0,18	45,10 ± 0,50	5,91 ± 0,24	18,74 ± 1,46	13,88 ± 0,58
6	54,43 ± 4,25	0,21 ± 0,07	72 ± 2,52	4,37 ± 0,53	43,22 ± 3,47	4,86 ± 0,17	17,00 ± 1,71	14,20 ± 0,31
7	54,27 ± 1,16	0,77 ± 0,14	54 ± 1,15	5,79 ± 0,88	37,88 ± 8,22	5,88 ± 0,16	16,72 ± 0,20	9,74 ± 0,10
8	68,81 ± 1,03	0,82 ± 0,13	79 ± 2,08	5,30 ± 1,16	46,43 ± 0,85	7,33 ± 0,03	16,87 ± 0,28	10,23 ± 0,15
9	64,30 ± 1,64	0,14 ± 0,05	77 ± 1,15	4,54 ± 0,16	48,70 ± 0,72	4,94 ± 0,04	13,03 ± 0,78	15,11 ± 1,72
10	66,52 ± 3,46	0,96 ± 0,28	46 ± 2,65	3,36 ± 0,42	47,31 ± 1,54	5,18 ± 0,05	16,77 ± 0,49	13,98 ± 0,46
11	56,30 ± 4,18	1,65 ± 0,13	64 ± 4,00	3,76 ± 1,24	47,48 ± 1,25	9,01 ± 0,25	20,47 ± 2,02	9,37 ± 0,29
12	67,23 ± 3,73	1,45 ± 0,14	44 ± 3,46	3,45 ± 0,49	47,79 ± 0,29	8,05 ± 0,06	18,22 ± 1,88	10,20 ± 0,50
13	64,75 ± 10,27	1,11 ± 0,21	48 ± 0,58	3,50 ± 0,39	48,19 ± 0,32	5,01 ± 0,16	12,85 ± 1,16	13,00 ± 0,60
14	61,77 ± 0,45	0,75 ± 0,13	74 ± 3,79	2,97 ± 0,23	47,53 ± 1,48	6,22 ± 0,12	21,54 ± 0,54	15,61 ± 1,07
15	64,28 ± 0,06	1,14 ± 0,04	64 ± 1,00	3,95 ± 0,24	48,20 ± 0,97	8,23 ± 0,19	14,58 ± 1,87	9,38 ± 0,46
16	34,03 ± 10,67	0,79 ± 0,24	52 ± 0,58	8,58 ± 3,93	42,90 ± 6,16	5,61 ± 0,16	13,21 ± 0,64	10,49 ± 0,90

RP = Rendimiento del proceso; CH = Contenido de humedad; TS = Temperatura de salida; TP = Tamaño de partícula; AR = Angulo de reposo; VA = Voluminosidad aparente; IC = Índice de Carr; HG = Higroscopicidad. Promedio ± desviación estándar

Tabla 3-4 Coeficientes estimados del modelo y valores p para los factores principales y combinación de dos factores

Factor	RP		CH		TS		TP		AR		VA		IC		HG	
	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p	C. est.	Valor-p
A	0,0509	0,59	-0,35	0,0007 ***	11,16667	2,00E-16***	-0,046	0,69901	0,5845	0,7476	4,09052	0,042954*	0,088	0,48	0,06	0,0027**
B	0,1410	0,12	0,60	0,0000 ***	-3,75	5,46E-09***	-0,623	5,46E-09***	2,1694	0,338	1,76341	0,103551	0,082	0,50	-0,01	0,3377
C	0,0533	0,55	-0,19	0,067	-1,16667	0,01989*	-0,175	0,14678	8,7978	0,01292*	3,91863	0,022202*	-0,9207	0,000***	0,03	0,055
D	0,099	0,29	0,39	0,0002 ***	1,66667	0,001387**	0,062	0,60090	0,3211	0,8517	-0,99378	0,231707	-0,14147	0,28	0,04	0,021 *
E	-0,4179	0,0001 ***	-0,03	0,7806	0,66667	0,424695	-0,053	0,79387	-17,2899	0,000176***	-2,83401	0,000169***	-0,0772	0,60	0,04	0,003 *
F	-0,4732	0,00004 ***	0,178	0,2199	-2,75	0,052398	-0,247	0,45543	2,4519	0,2935	10,61939	3,08E-06***	-0,3005	0,04 *	-0,42	0,0000 ***
A:B	-	-	-	-	-0,58333	0,22932	0,033	0,78212	-	-	-3,33946	0,001223**	-	-	-	-
A:C	-	-	-	-	1,33333	0,008567**	-0,049	0,66911	-	-	0,08775	0,926308	-	-	-	-
A:D	-	-	-	-	0,25	0,603047	0,155	0,18409	-	-	5,80839	6,63E-07***	-	-	-	-
A:E	-	-	-	-	0,08333	0,920118	-0,466	0,03001*	-	-	2,80178	0,09536	-	-	-	-
A:F	-	-	-	-	1,91667	0,164222	-0,341	0,30511	-	-	-9,16145	0,001632**	-	-	-	-
B:C	-	-	-	-	0,83333	0,089571	-0,095	0,42213	-	-	-2,33178	0,018708**	-	-	-	-
B:D	-	-	-	-	-0,91667	0,06305	-0,159	0,18445	-	-	2,74257	0,006466**	-	-	-	-
B:E	-	-	-	-	-0,75	0,369773	-0,229	0,26042	-	-	7,32078	8,68E-05***	-	-	-	-
C:D	-	-	-	-	3	0,000954***	0,125	0,53183	-	-	-6,43433	0,000407***	-	-	-	-

RP = Rendimiento del proceso; CH = Contenido de humedad; TS = Temperatura de salida; TP = Tamaño de partícula; AR = Angulo de reposo; VA = Voluminosidad aparente; IC =

Índice de Carr; HG = Higroscopicidad. *P<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001

3.3.2.1 Rendimiento del proceso

Los resultados del rendimiento del proceso de cada experimento se muestran en la Tabla 3-3. El rendimiento más bajo se obtuvo con el experimento 16 ($34,03 \pm 10,67\%$), mientras que el más alto fue en el experimento 8 ($68,81 \pm 1,03\%$). Debido a que la variable evaluada es un porcentaje, fue necesario realizar una regresión beta, ya que tenía un denominador desconocido. En el caso de la regresión beta no es posible trabajar con las interacciones segunda y tercera de las variables (223-225).

De acuerdo con el resultado del análisis del DEE (Tabla 3-4), se encontró un efecto significativo de la concentración del extracto (factor E) y la proporción del coadyuvante de secado (factor F) sobre el rendimiento del proceso, con un coeficiente de $-0,4179$, $p: 0,0001$ y $-0,4732$, $p: 0,00004$, respectivamente. Estas variables en su nivel superior (experimentos 7 y 16, Tabla 3-3) afectan negativamente el rendimiento del proceso. Esta disminución en el rendimiento podría deberse a que un mayor contenido de sólidos en el extracto y una mayor proporción de coadyuvante de secado generan un aumento de la viscosidad de la dispersión, como se puede ver en la Tabla 3-5 (experimentos 7 y 16), lo que daría lugar a un incremento de la cantidad de sólidos en la cámara de secado y de la masa sólida adherida a las paredes del cilindro de secado, impidiendo que el material seco llegara al vaso de recolección (198).

Tabla 3-5 Viscosidad de las suspensiones de partida para cada una de las dispersiones

Experimento	Concentración del extracto	Proporción del dióxido de silicio	Viscosidad Promedio a 20°C (cps)	Desv.
1	10,0	1:0,5	29	1,2
2	10,0	1:0,5	29	1,2
3	5,0	1:1	39	1,2
4	5,0	1:1	39	3,1
5	10,0	1:0,5	29	1,2
6	10,0	1:0,5	29	1,2
7	10,0	1:1	4960	124,9
8	5,0	1:1	39	5,0
9	5,0	1:0,5	19	1,2
10	10,0	1:0,5	24	0,0
11	5,0	1:1	33	1,2
12	5,0	1:1	30	0,0
13	5,0	1:0,5	21	1,2
14	10,0	1:0,5	33	1,2
15	5,0	1:1	34	2,0
16	10,0	1:1	4900	327,4

De manera similar, Tonon et al. (198) encontraron que el aumento en la concentración de maltodextrina (coadyuvante de secado) en un rango de 10 al 30%, tiene un efecto negativo sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión de la pulpa de la fruta de açaí.

3.3.2.2 Contenido de humedad

En general, los extractos secos resultantes de los diferentes experimentos mostraron un bajo contenido de humedad al final del proceso de secado, siendo el valor más bajo de 0,14%, para el experimento 9, y el más alto de 1,94%, para el experimento 1 (Tabla 3-3). El bajo contenido de humedad podría deberse a que el medio de dispersión del extracto es etanol, el cual en sí mismo tiene un bajo contenido de agua, por lo tanto, afecta directamente el contenido de humedad resultante de cada uno de los polvos. Considerando que la humedad muy baja afecta las propiedades de fluidez y la compresibilidad de los materiales sólidos (175, 226) y de acuerdo al DEE se busca tener una humedad residual mas alta.

Los análisis estadísticos mostraron un alto efecto de los factores A, B y D (temperatura de inyección, velocidad de flujo del nitrógeno de inyección y ajuste del aspirador), sobre el contenido de humedad del extracto seco, con unos coeficientes estimados de -0,35, 0,60 y 0,39, respectivamente (Tabla 3-4), lo que indica que el factor A en su nivel superior desfavorece la variable respuesta (signo -), mientras que los factores B y D, en el mismo nivel favorecen la variable respuesta (signo +). La temperatura de entrada es la temperatura del medio de secado (nitrógeno) en el momento del primer contacto con la suspensión que contiene el extracto. Como es de esperar, a una temperatura de entrada más alta se observa una disminución en el contenido de humedad del material resultante, es decir, se favorece la reducción de la humedad relativa en el gas de secado lo que genera una mayor energía para la evaporación del solvente y por consiguiente un menor contenido de humedad en el material sólido. La carga térmica del nitrógeno determina la habilidad para secar, debido a que esta temperatura influencia la cantidad de solvente que puede ser removido por unidad de tiempo (170, 171, 175, 208, 222, 226, 227).

En cuanto al aumento en el flujo del nitrógeno de pulverización (factor B) y la velocidad del aspirador (factor D), estos en su nivel superior contribuyen a que el contenido de humedad en el material sea mayor, lo cual puede deberse a que el tiempo de contacto entre el material a secar y el nitrógeno de secado se hace más corto y como consecuencia la

transferencia de calor disminuye resultando en una menor evaporación del agua presente en el solvente que contiene al extracto (171, 222, 227).

Estos resultados están en concordancia con lo encontrado por otros autores. Souza et al. (175) encontraron que la capacidad de evaporación en el secado por aspersion depende de la temperatura de entrada y la velocidad de alimentación del material (ajuste de la bomba) y son factores determinantes en la humedad resultante del extracto de *Bauhinia forficata*; por otro lado, varios autores han encontrado que la temperatura de entrada en su nivel superior tiene una influencia negativa sobre el contenido de humedad para diferentes extractos (170, 196, 198, 201, 205, 206, 208, 228).

3.3.2.3 Temperatura de salida

La temperatura de entrada se entiende como la temperatura del nitrógeno de secado ya caliente, esta se mide antes de que este fluya a través de la cámara de secado. Por otro lado, la temperatura del aire con las partículas sólidas antes de entrar en el ciclón se designa como la temperatura de salida. Esta temperatura es aquella que resulta del balance entre el calor y la masa de material que circula en el cilindro de secado y por lo tanto no se puede regular (227).

La diferencia entre la temperatura de entrada y la de salida es uno de los factores más importantes en el proceso de secado por aspersion ya que puede ser determinante en la humedad final del polvo, además de la eficiencia del proceso de secado, por lo que aunque no es posible controlarla es necesario tenerla en cuenta.

La temperatura de salida fue afectada por varios factores, los resultados comprueban dicha afirmación ya que el único factor que no presentó efecto sobre la variable respuesta en el análisis de varianza fue el E (concentración del extracto) y F (proporción del coadyuvante de secado), (Tabla 3-4). La temperatura media fue de 60,42°C y es evidente que aumenta con los niveles A+, B-, C- y D+. De acuerdo a los análisis estadísticos, se podría explicar la influencia de estos factores de la siguiente manera: un aumento en la temperatura de entrada del nitrógeno genera proporcionalmente una temperatura de salida mayor; un incremento de la velocidad de flujo del nitrógeno de secado afecta la variable respuesta disminuyéndola, debido a que se requiere una mayor energía para calentar el gas; un

aumento en el ajuste de la bomba, implica, un aumento en la cantidad de líquido para ser evaporado y por lo tanto una disminución en la temperatura de salida y una elevación en la velocidad del aspirador ofrece una mayor capacidad de secado lo que favorece el aumento de la temperatura de salida (171, 207, 222, 227).

Los análisis realizados sugieren un efecto sobre la temperatura de salida a partir de la interacción entre los factores A:C (temperatura de inyección : velocidad de alimentación) y C:D (velocidad de alimentación : ajuste del aspirador). Las dos combinaciones presentan interacciones, en particular $A+:C-$ y $C+:D+$ parecen incrementar la temperatura de salida. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por Gallo et al. (171) quienes reportaron que la temperatura de salida es afectada por los factores temperatura de inyección, velocidad de flujo aire de secado, ajuste de la bomba, ajuste del aspirador y concentración del material de partida, en el proceso de secado por aspersión de *Rhamnus purshiana*.

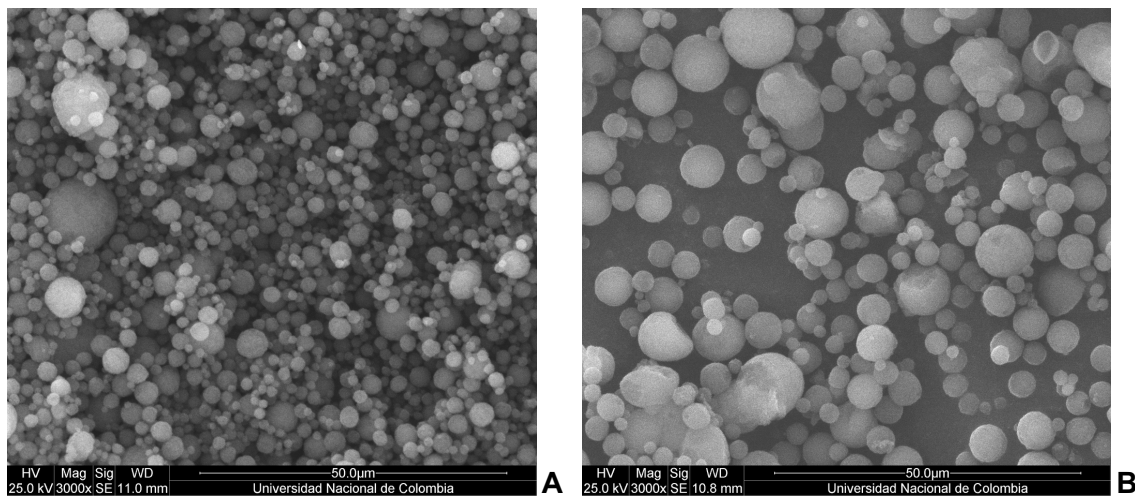
3.3.2.4 Tamaño y forma de partícula

La importancia del tamaño y forma de las partículas, radica en que estas variables son propiedades intrínsecas de las que dependen las demás propiedades farmacotécnicas como son la fluidez, la voluminosidad, la densidad y la compresibilidad (23). Según los resultados resumidos en la Tabla 3-3, el valor más bajo para el tamaño de partícula fue 2,36 μm y el valor más alto fue 8,58 μm correspondientes al experimento 1 y 16, respectivamente; dichos resultados se evidencian en las microfotografías que se muestran como ejemplo en la Figura 3-4. Esta información obtenida corresponde a tamaños de partícula pequeños como se esperaba, ya que en el proceso se utilizó etanol al 96%, lo que significa que se tienden a formar gotículas más pequeñas debido a la tensión superficial más baja de este solvente (22,75 mN/m a 20°C) (229), en comparación con un medio acuoso (72,75 mN/m a 20°C), resultando en partículas con un tamaño menor (227), por tal motivo se busca obtener un tamaño de partícula lo más grande posible.

Todas las muestras presentaron un comportamiento unimodal en su tamaño de partícula y forma esférica (Figura 3-4). En general, las partículas secadas por aspersión, son esféricas y presentan tamaños de partícula homogéneos, debido al tipo de proceso de secado (170, 172, 184, 194, 195, 199, 208). Este es un parámetro importante que influye en las fuerzas

que experimentan las partículas y que puede afectar directamente su flujo y su empaquetamiento (172, 210). Por lo general, los polvos secados por aspersión presentan partículas casi esféricas y generalmente huecas. La naturaleza hueca imparte una baja densidad aparente a estas. Los rangos de tamaño de partícula varían de unos pocos micrómetros hasta varias decenas de micrómetros con una distribución de tamaño relativamente estrecha (173, 222).

Figura 3-4 Microfotografías SEM.



A. experimento 1, 3000x; **B.** experimento 16, 3000x

En la Tabla 3-4 se presentaron los coeficientes estimados para el tamaño de las partículas y sus respectivos valores de p , con un nivel de significación de 0,05. Según estos resultados solamente la velocidad de flujo del nitrógeno de inyección (Factor B) tiene efecto sobre el tamaño de partícula con un valor p de $5,46E-09$ y un coeficiente de $-0,623$ lo que indica que una disminución en la velocidad de flujo del nitrógeno de atomización produce gotas más grandes en la boquilla de atomización, lo que permite la formación de partículas sólidas con un tamaño superior (173, 198, 222, 227). La atomización es una etapa decisiva del proceso de secado por aspersión ya que las condiciones iniciales de esta definen la distribución inicial de tamaños de gota y puede afectar a las características de las partículas producidas. En general, un aumento de la energía disponible para la atomización (es decir, la velocidad del atomizador, la presión de la boquilla, o la relación de nitrógeno-líquido en un atomizador neumático) producirá una reducción del tamaño de partícula (173, 222).

De la misma manera, se evidencia un efecto negativo sobre la variable respuesta (tamaño

de partícula) debido a las combinaciones de los factores: temperatura de inyección y concentración del extracto (A:E); se esperaba que con una alta concentración en el extracto, aumentara la cantidad de los sólidos en cada gota y por lo tanto, se obtuviera un tamaño de partícula mayor, sin embargo, debido al aumento de la temperatura se desfavorece la variable respuesta, haciendo el tamaño de partícula más pequeño, posiblemente debido a la evaporación del etanol antes que se formen de gotículas de mayor tamaño.

Gallo et al. (171), encontraron resultados similares al realizar el proceso de secado por aspersion del extracto de cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*). El factor que tuvo mayor efecto fue la velocidad de flujo del aire de secado, obteniéndose mayores tamaños de partícula cuando la velocidad de flujo se hacía menor. El segundo factor con mayor relevancia fue la concentración de sólidos en la mezcla, en el que el tamaño de partícula aumentó con el aumento de la concentración o de la viscosidad de la suspensión de alimentación. Tonon et al. (198) encontraron resultados similares en açai (*Euterpe oleraceae*), puesto que a una mayor viscosidad de la suspensión que contenía el extracto y la maltodextrina (como coadyuvante de secado), se producían gotas más grandes y por lo tanto un tamaño de partícula mayor. Por otro lado, Couto et al. (208) encontraron que la combinación entre los factores velocidad de flujo del aire de inyección y la temperatura del aire de secado favorecen el aumento del tamaño de partícula para el extracto de *Eugenia dysenterica*.

3.3.2.5 Voluminosidad

Los resultados de la voluminosidad aparente se muestran en la Tabla 3-3. Para el caso del DEE solamente se tuvo en cuenta la voluminosidad aparente del material. Como se mencionó previamente, cuando se utiliza un solvente orgánico en lugar de agua da como resultado partículas más pequeñas debido a la tensión superficial inferior del etanol; si el sólido tiene una gran cantidad de partículas finas, podría dar lugar a un polvo con una alta voluminosidad y pobres características de flujo (210). La voluminosidad global o aparente de los sólidos está relacionada directamente con el empaquetamiento que a su vez depende del tamaño de partícula, pues aquellas partículas con menor tamaño podrán acomodarse entre aquellas más grandes que dejan espacios entre sí. Estas propiedades son determinantes porque dan una idea de la compactabilidad del material (23, 210, 230), por lo que en el DEE se busca que esta variable sea disminuida.

La respuesta mínima de la voluminosidad aparente fue de 4,35 mL/g y la máxima fue de 9,01 mL/g, en los experimentos 2 y 11, respectivamente (Tabla 3-3). De acuerdo con el análisis estadístico se evidencia que la voluminosidad disminuye con los factores A-, C-, E+ y F- (temperatura de inyección, velocidad de la alimentación, concentración del extracto y proporción del coadyuvante de secado) (Tabla 3-4).

Una temperatura de entrada inferior (factor A) ofrece un producto más húmedo, favoreciendo las fuerzas de cohesión de las partículas, lo que al final implica que las partículas de tamaños pequeños como las que se obtienen en los diferentes experimentos, se unan y formen aglomerados que van a tender a comportarse como partículas más grandes, disminuyendo de esta manera la voluminosidad del sólido (23, 210, 227). Por otro lado, una tasa de alimentación inferior (factor C), disminuye el tamaño de las gotículas de líquido, ya que menos líquido tiene que ser dispersado, por lo tanto, pueden ser obtenidas partículas más pequeñas, resultando en una disminución de la voluminosidad hasta cierto punto, puesto que, cuando los tamaños de partícula son demasiado pequeños la voluminosidad puede aumentar, debido a que se pueden generar cargas que repelen las partículas formando espacios entre las partículas generalmente conocidos como puentes (23). Adicionalmente, una mayor concentración de extracto (factor E), resulta en una mayor cantidad de sólidos en una gota con aumentos del tamaño de partícula, lo que podría favorecer la disminución de la voluminosidad resultante (222, 227). Sin embargo, el uso de dióxido de silicio coloidal como coadyuvante de secado en una alta proporción (factor F), podría afectar negativamente la voluminosidad del polvo, dado a que dada la naturaleza de este material y la baja humedad resultante debido al alto contenido de sólidos a secar en las gotículas, producen un aumento de las fuerzas electrostáticas que en consecuencia aumentan la voluminosidad de las partículas (171, 198, 222, 227).

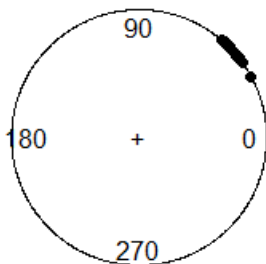
Según el análisis estadístico de las interacciones de los factores temperatura de inyección y proporción de coadyuvante de secado (A:F), se sugiere que la voluminosidad es menor cuando están en el nivel más bajo, lo que concuerda con lo previamente evaluado en el análisis conceptual realizado. Jangam y Thorat (205), encontraron resultados similares en el proceso de secado por aspersion del extracto de jengibre, en donde obtuvieron materiales más compactos (menos voluminosos), con una baja temperatura de inyección, baja velocidad de alimentación (ajuste de la bomba bajo) y alta presión de atomización.

3.3.2.6 Propiedades de flujo

La fluidez de un polvo es un parámetro de elevada importancia en el manejo tecnológico de polvos farmacéuticos, ya que predice si el material llenará continuamente y uniformemente las matrices de la máquina tableteadora o encapsuladora (23), por tal razón se busca que la fluidez del material obtenido sea lo mejor posible (ángulos de reposo bajos).

Al ser el ángulo de reposo una variable de tipo angular no permite la suposición de normalidad de los residuos, lo que implica que no es posible realizar un análisis estadístico de las interacciones de los factores (223, 231). En la Figura 3-5 se representan los ángulos de reposo, donde todas las respuestas están en el primer cuadrante; con un valor mínimo de $37,15^\circ$ y un valor máximo de $49,35^\circ$, es decir que para todos los experimentos realizados se obtuvieron materiales de poco flujo, de acuerdo a la clasificación existente (209). Este comportamiento en general se debe a que el tamaño de partícula obtenido en el proceso de secado es considerado como fino y el contenido de humedad al final del mismo es muy bajo, por lo que a pesar de tener un material con partículas esféricas su flujo se ve disminuido (23, 209, 210, 230). Al realizar el análisis estadístico se busca la combinación de factores que disminuyan esta variable respuesta, para obtener un flujo lo mejor posible.

Figura 3-5 Respuesta angular de fluidez

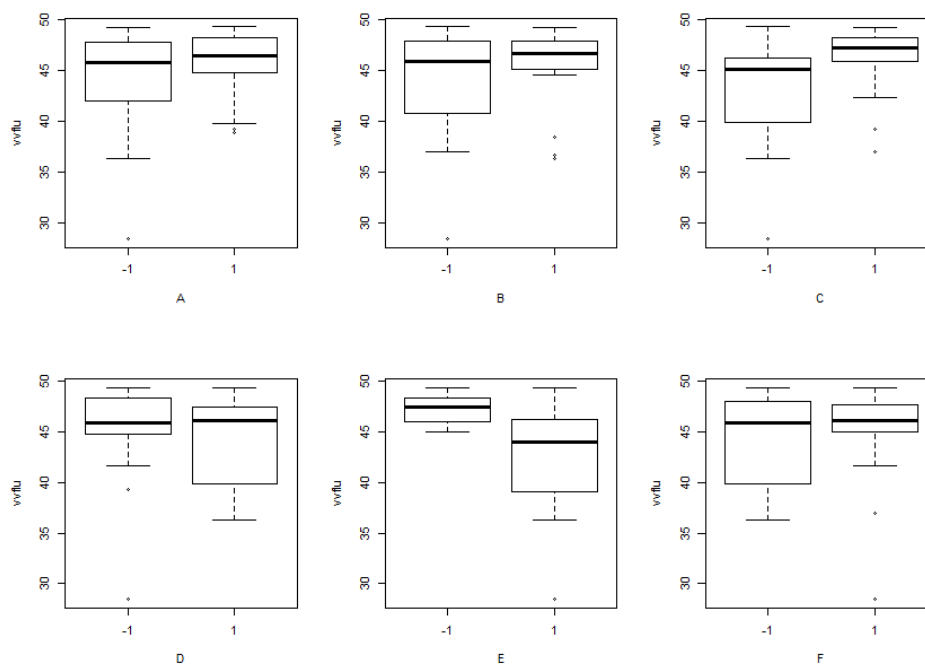


De acuerdo con los resultados del análisis estadístico, los factores C y E (ajuste de la bomba y concentración del extracto) muestran un efecto significativo sobre la respuesta angular de la capacidad de flujo (véase la Tabla 3-4). Para encontrar de qué manera se está afectando la variable con estos factores se requirió realizar el análisis gráfico por medio del diagrama de caja (Figura 3-6), donde el ángulo de reposo disminuye (mejora la fluidez del material) con una disminución de C y a su vez con un aumento del factor E.

Adicionalmente, se puede inferir que al aumentar la tasa de alimentación (Factor C) incrementa el líquido a evaporar durante el proceso, lo que genera una mayor humedad resultante en el sólido obtenido después del secado. Un mayor contenido de humedad mejora las propiedades de flujo del material (222, 227). Por otra parte, una concentración mayor de extracto (Factor E) significa menos líquido para evaporar en el secado y por lo tanto, más sólidos en una gota lo que produce un aumento del tamaño de partícula y un producto final con una fluidez del polvo más favorable (23, 172, 196, 209, 210, 230).

El efecto de los sólidos totales sobre la fluidez, está de acuerdo con los resultados reportados por Moreira et al. (196) para el extracto de *Acerola pomace* con maltodextrina como coadyuvante de secado en donde encontraron que la mejor proporción de extracto/coadyuvante fue de 4:1, obteniendo un material con excelentes propiedades de flujo. Por otro lado Gallo et al. (171), encontraron un comportamiento similar para el extracto de hojas de *Rhamus pурсiana*, con dióxido de silicio coloidal como coadyuvante de secado, en donde una concentración de sólidos en la suspensión de alimentación (7,32%, con una proporción 1:1 de extracto:coadyuvante) favorece la fluidez del material.

Figura 3-6 Diagrama de caja para cada factor de la respuesta angular.



A: Temperatura de inyección; B: Velocidad de flujo del nitrógeno de inyección; C: Ajuste de la bomba; D: Ajuste del aspirador; E: Concentración del extracto; F: Proporción del coadyuvante de secado; 1: El factor favorece la variable; -1: El factor desfavorece la variable

3.3.2.7 Índice de Carr (IC)

El índice de Carr (IC) relaciona las propiedades de cohesión de los materiales con su fluidez, siendo un indicativo de la compresibilidad del material (23, 210), por lo tanto, se busca que este índice sea lo más pequeño posible. De acuerdo con la Tabla 3-3 el valor más bajo y el más alto del IC fueron 12,85% y 21,54%, de los experimentos 15 y 14, respectivamente, los cuales corresponden a materiales con flujo bueno y aceptable de acuerdo con esta clasificación (23, 209); por consiguiente los valores de IC de los demás materiales resultantes de los ensayos se encuentran dentro de este rango. De acuerdo al análisis estadístico los factores con una influencia significativa fueron los factores ajuste de la bomba (Factor C) y proporción del coadyuvante de secado (Factor F), con unos coeficientes estimados de -0,9207 y -0,3005, respectivamente (Tabla 3-4), lo que quiere decir que para disminuir el IC se requiere que los factores que afectan esta variable estén en su valor superior.

De manera similar a lo explicado en las propiedades de flujo (ángulo de reposo), de acuerdo con los análisis estadísticos se puede decir que una velocidad de alimentación más alta (Factor C), resulta en una mayor concentración de sólidos en una gota y de esta manera aumenta el tamaño de partícula, lo cual podría favorecer a los valores de IC, lo que contribuye a un mayor flujo y a un mejor empaquetamiento de los polvos. El mismo comportamiento se observa cuando la concentración de extracto es mayor (208). Gallo et al. encontraron un comportamiento similar para el índice de Carr, en donde el factor con mayor efecto fue la concentración de sólidos, para el que una mayor concentración de sólidos permite una disminución del índice de Carr (171).

3.3.2.8 Higroscopicidad

La higroscopicidad es la capacidad de los materiales para absorber y/o adsorber humedad atmosférica (23, 169, 210). De acuerdo a estudios previos el extracto seco es moderadamente higroscópico, siendo clasificado como material clase III (26, 29, 169), por lo tanto, en el DEE se busca que este parámetro sea más bajo que el de clase III.

De acuerdo con el análisis estadístico, se encontró que los factores temperatura de inyección, ajuste del aspirador, concentración del extracto y proporción del coadyuvante (A,

D, E, y F) afectan la higroscopicidad, la cual disminuye con los factores temperatura de inyección, ajuste del aspirador y concentración del extracto en su valor inferior, y proporción del coadyuvante en su valor superior (A-, D-, E- y F +) (Tabla 3-4).

La higroscopicidad mostró valores entre 8,84% y 15,61%, Tabla 3-3. En donde los experimentos 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 y 16 presentaron los valores de higroscopicidad más bajos que corresponden a los que contienen una mayor proporción del coadyuvante dióxido de silicio coloidal, lo que concuerda con el análisis estadístico ya que este fue el factor con la mayor influencia en esta variable (Factor F) (Tabla 3-4). Debido a las características del dióxido de silicio coloidal, este es capaz de mantener grandes cantidades de extracto dentro de su volumen intersticial, evitando así la sorción de agua y por lo tanto una mejora en la variable evaluada (229).

Por otro lado, cuando se aplicó una temperatura de inyección inferior (Factor A-) y una tasa de aspiración más alta (Factor D+) se obtuvieron sólidos con contenido de humedad inicial superior ocasionando una disminución en la capacidad de incorporación de agua, lo que podría contribuir a disminuir la higroscopicidad del material (169).

Gallo et al. reportan el mismo comportamiento en donde una alta concentración de dióxido de silicio favorece la disminución de la higroscopicidad (171); de la misma forma, Tonon et al. encontraron que los valores más bajos de higroscopicidad fueron obtenidos con los valores más altos de concentración de maltodextrina (198).

3.3.3 Evaluación final del proceso de secado

En la Tabla 3-6 se presenta el resumen del análisis estadístico resultante que lleva a definir las condiciones más adecuadas (variables operacionales o factores) para el proceso de secado del extracto de frutos de *P. peruviana* considerando las variables respuesta evaluadas.

Tabla 3-6 Resumen general para el proceso de secado

Variable	Efecto deseado	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E	Factor F
Rendimiento del proceso	↑	No	No	No	No	-	-
Humedad	↑	-	+	No	+	No	No
Temperatura de salida	↑	+	-	-	+	No	-
Tamaño de partícula	↑	No	-	No	No	No	No
Voluminosidad	↓	-	No	-	No	+	-
Ángulo de reposo	↓	No	No	-	No	+	No
Índice de Carr	↑	No	-	No	No	No	+
Higroscopicidad	↓	-	No	No	-	-	+

↑: Aumento de la variable; ↓: Disminución de la variable; No: El factor no tiene efecto estadísticamente significativo; +: El factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor superior, favoreciendo la variable de acuerdo al efecto deseado; -: El factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor inferior, favoreciendo la variable de acuerdo al efecto deseado.

En la tabla anterior, se pueden ver cuáles son los niveles de los factores para obtener las mejores condiciones de secado para el extracto. Es de resaltar que a pesar de que existen efectos derivados de algunas interacciones entre factores, debido a que no siempre fue posible evaluarlos para todas las variables por los procedimientos estadísticos realizados, se opta por hacer una evaluación de los factores sin tener en cuenta las interacciones. En la Tabla 3-7 se resumen los niveles seleccionados para cada uno de los factores evaluados en el DEE.

Tabla 3-7 Condiciones seleccionadas para el secado del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*.

Factor	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)	Nivel seleccionado	Unidades
(A) Temperatura de inyección	80	120	80	°C
(B) Velocidad de flujo del nitrógeno de inyección	400	600	400	L/h
(C) Ajuste de la bomba de alimentación	5	15	5	%
(D) Ajuste del aspirador	80	100	100	%
(E) Concentración del extracto	5,00	10,00	7,50	% (p/p)
(F) Relación extracto: coadyuvante de secado	1:0,5	1:1	1:0,75	-

La selección de los niveles de los factores, se basó en los resultados del DEE, en donde, si el factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor superior favoreciendo la mayoría de las variables de acuerdo al resultado deseado, entonces se selecciona el nivel superior del factor. Por otro lado, si el factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor inferior favoreciendo la mayoría de las variables, entonces se selecciona el nivel

inferior del factor. Para los casos del factor E (concentración del extracto) y el factor F (relación extracto: coadyuvante de secado), que tienen efectos estadísticamente significativos tanto en su valor inferior como en su valor superior, se decidió tomar un valor intermedio del factor (Tabla 3-7).

Con los niveles de los factores seleccionados se llevó a cabo un ensayo adicional, en el que se evaluaron las mismas variables respuesta del DEE realizado. En la Tabla 3-8 se muestran los valores medios resultantes para este ensayo adicional, comparándolos con los valores mínimo y máximo obtenidos del DEE.

Tabla 3-8 Resultados del experimento final bajo las condiciones de secado seleccionadas

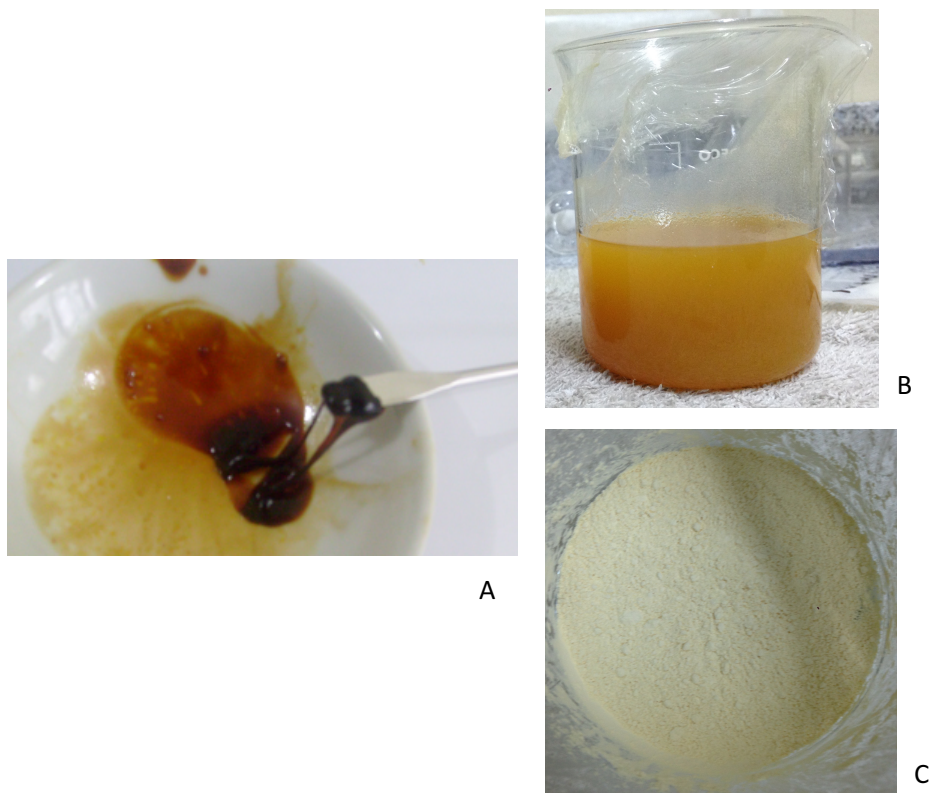
Variable	Efecto deseado	Valor mínimo	Valor máximo	Valor obtenido
Rendimiento del proceso	↑	34,03%	68,81%	68,12%
Humedad	↑	0,211%	1,939%	1,547%
Temperatura de salida	↑	44°C	79°C	74°C
Tamaño de partícula	↑	2,36 µm	8,58 µm	4,18 µm
Voluminosidad	↓	4,94 mL/g	9,01 mL/g	7,46 mL/g
Ángulo de reposo	↓	37,15°	48,70°	36,67°
Índice de Carr	↑	12,85%	21,54%	18,75%
Higroscopicidad	↓	8,84%	15,61%	10,58%

↑: Aumento de la variable; ↓: Disminución de la variable

De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que el DEE permitió establecer las condiciones del secado por aspersion del extracto y la proporción más adecuada de dióxido de silicio coloidal, para producir un material co-procesado con un rendimiento apropiado, y con unas características de humedad, tamaño de partícula, voluminosidad, fluidez e higroscopicidad adecuados para la formulación de una forma farmacéutica de compresión directa.

En la Figura 3-7 se presenta el co-procesado seleccionado, en comparación con el extracto fluido de partida y el extracto secado por estufa. De acuerdo a lo discutido en este estudio, se evidencia cómo la transformación al estado sólido mejora las propiedades farmacotécnicas del material.

Figura 3-7 Extracto de *Physalis peruviana*

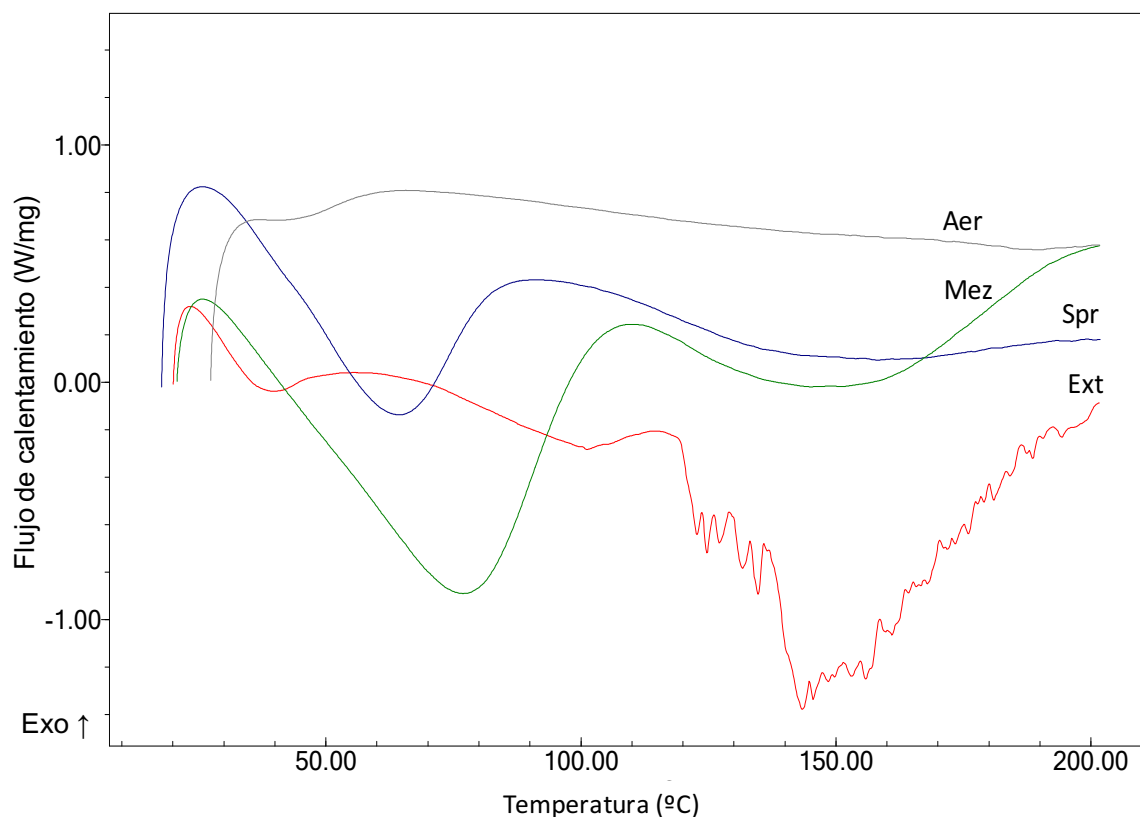


A. Extracto de *Physalis peruviana* secado en estufa; **B.** Extracto fluido de *Physalis peruviana*; **C.** Co-procesado de extracto de *Physalis peruviana* y dióxido de silicio secado por aspersión.

3.3.3.1 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que permite determinar la cantidad de energía que absorbe o libera un material cuando es calentado o enfriado a velocidad constante a un determinado intervalo de temperatura y se utiliza para analizar los eventos térmicos que se puedan estar presentando (232). Los resultados de la caracterización del extracto, dióxido de silicio, co-procesado y la mezcla física por calorimetría diferencial de barrido se muestran en la Figura 3-8.

Figura 3-8 Termogramas DSC



Aer: Dióxido de silicio; **Ext:** Extracto seco; **Spr:** Co-procesado de extracto + dióxido de silicio; **Mez:** Mezcla física entre el extracto seco y dióxido de silicio.

De acuerdo a los resultados de los termogramas, se puede observar que el extracto a temperaturas superiores de 120°C comienza un proceso de descomposición, esto está acorde con los resultados obtenidos en trabajos previos donde se encontró que el extracto es termolábil (26, 29); esta descomposición no se evidencia en el material co-procesado y en la mezcla física, probablemente gracias a la adición del dióxido de silicio coloidal como adyuvante de secado, que podría ejercer un efecto protector recubriendo al extracto dada su capacidad de formar puentes de hidrógeno y su alta área superficial (229). Por otro lado se observa una pérdida de agua en el extracto a una temperatura de aproximadamente de 40°C, esta temperatura se desplaza hacia 60 y 70°C en el material co-procesado y en la mezcla física, posiblemente debido a la capacidad del dióxido de silicio coloidal de adsorber moléculas de agua, que podría hacer necesario una mayor temperatura para poderlas retirar (229). De estos resultados también se puede inferir, que las condiciones del proceso

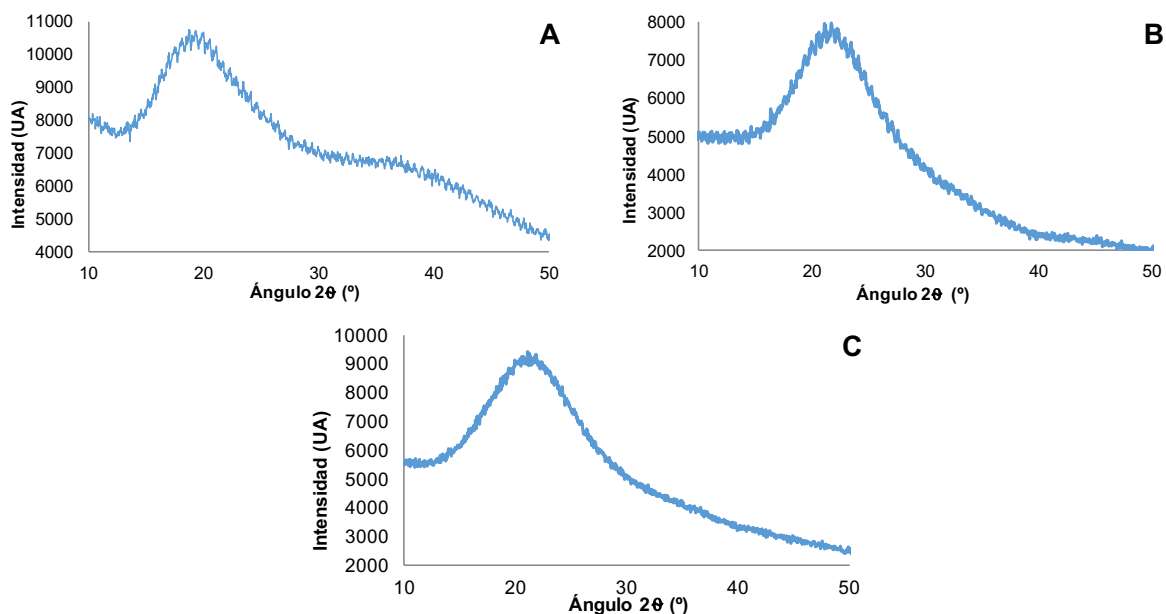
de secado establecidas no estarían afectando la estabilidad química del extracto.

3.3.3.2 Caracterización por difracción de rayos X (DRX)

La cristalografía de rayos X es una técnica experimental para el estudio y análisis de materiales, basada en el fenómeno de difracción de los rayos X para evaluar las formas cristalinas u amorfas de los sólidos obtenidos para la fabricación de las matrices hidrofílicas, evaluando este comportamiento en comparación con los componentes precursores.

Se realizaron mediciones de difracción de rayos X para el extracto seco, el dióxido de silicio coloidal y el co-procesado del extracto seco con dióxido de silicio coloidal secado por aspersión. Todas las muestras evaluadas revelaron un estado amorfo, que se caracteriza por la presencia de señales anchas no definidas con abundante ruido (Figura 3-9) (233).

Figura 3-9 Difractogramas de rayos X (DRX).



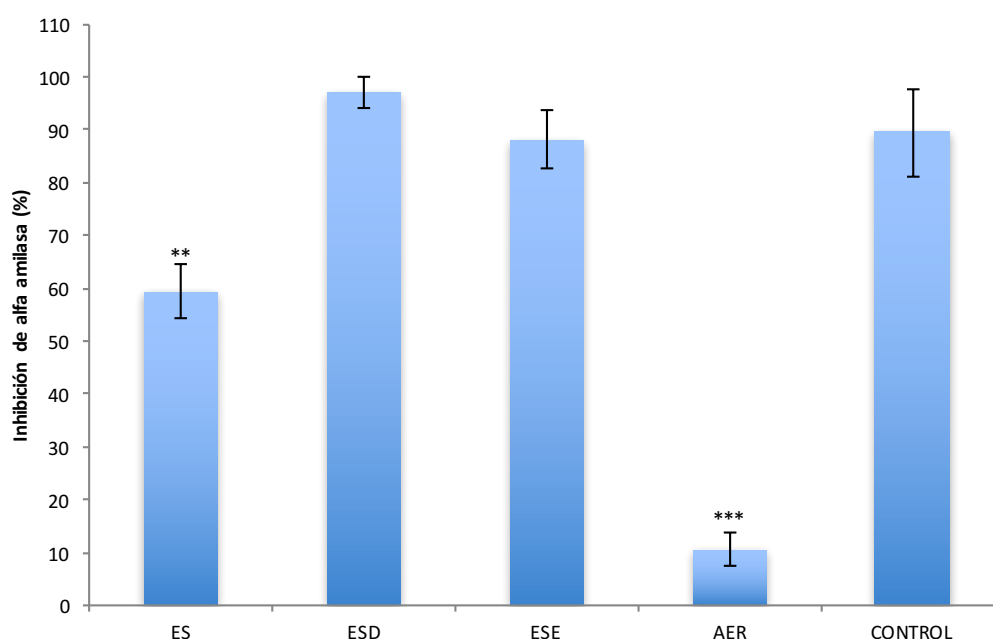
A: Extracto seco; **B:** Dióxido de silicio; **C:** Co-procesado extracto seco + dióxido de silicio

Un estado amorfo podría mejorar la velocidad de disolución del extracto (210) lo que podría ser favorable para el desarrollo del sistema de liberación modificada tipo matriz hidrofílica, en especial en los mecanismos de liberación por difusión que se pudieran dar.

3.3.3.3 Ensayo *in-vitro* de inhibición de α -amilasa

Los resultados del ensayo *in-vitro* de inhibición de α -amilasa aplicados al extracto seco en estufa, al co-procesado secado por aspersión (extracto + dióxido de silicio), al extracto sin coadyuvante secado por aspersión y al dióxido de silicio, utilizando como control positivo la acarbosa se muestran en la Figura 3-10.

Figura 3-10 Ensayo de actividad *in-vitro* de inhibición de α -amilasa.



ES= Extracto secado en estufa; **ESD=** Co-procesado secado por aspersión (Extracto + Dióxido de silicio); **ESE=** Extracto secado por aspersión; **AER=** Dióxido de silicio; **CONTROL =** Acarbosa. Promedio \pm S.D.; n= 3 por grupo. Test de Bonferroni, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

De acuerdo con estos resultados, al parecer el dióxido de silicio no presenta interferencias con el ensayo. Adicionalmente, se puede observar que el extracto que se secó en estufa tuvo una disminución en la actividad inhibidora posiblemente debido a una degradación del mismo durante el proceso (26). Los extractos que se secaron por aspersión con coadyuvante de secado y sin coadyuvante de secado no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el efecto inhibitorio, en comparación con la acarbosa. Por lo anterior, el secado por aspersión muestra que mantiene la actividad observada en el extracto etanólico de frutos *P. peruviana* L., aún en presencia del dióxido de silicio,

permitiendo así su empleo para el desarrollo de un producto fitoterapéutico de liberación modificada.

3.4 Conclusiones

El DEE permitió establecer las condiciones de secado por aspersión para el extracto etanólico de los frutos de *P. peruviana*, las cuales fueron: temperatura de inyección 80°C; velocidad de flujo del nitrógeno de inyección 400 L/h; ajuste de la bomba de alimentación 5%; ajuste del aspirador 100%; concentración del extracto 7,5% p/p; relación del extracto y el coadyuvante de secado 1:0,75.

Con las condiciones de secado establecidas se obtuvo un material con un rendimiento del 68,12%, con una humedad relativa al final del proceso de secado de 1,547%, un tamaño de partícula de 4,18 μm , una voluminosidad de 7,46 mL/g, un ángulo de reposo de 36,67°, un índice de Carr de 18,75% y una higroscopicidad de 10,58%, valores encontrados adecuados para las etapas siguientes del desarrollo del fitoterapéutico, de acuerdo al análisis realizado.

La caracterización por difracción de rayos X mostró que el co-procesado del extracto etanólico de los frutos de *P. peruviana* junto con el coadyuvante, presenta un estado amorfo. La caracterización por calorimetría diferencial de barrido, evidenció que el extracto presenta un proceso de descomposición por encima de 120°C y que el dióxido de silicio coloidal posiblemente genera un efecto protector para el extracto, frente a la descomposición por temperatura.

De acuerdo a los estudios *in vitro* de inhibición de α -amilasa, el extracto que se secó en estufa tuvo una disminución en la actividad inhibidora de la α -amilasa por posible degradación del mismo, en comparación con el co-procesado del extracto con el dióxido de silicio coloidal secado por aspersión. Los estudios de inhibición de α -amilasa permitieron establecer que el secado por aspersión del extracto no afectó significativamente su actividad inhibitoria, indicando que esta es una buena alternativa para llegar a un extracto en el estado sólido como producto intermedio que pueda ser empleado en el desarrollo de una forma farmacéutica tipo matriz hidrofílica.

Capítulo 4. Selección del polímero para el desarrollo de un sistema de liberación modificada

Una vez establecidas las condiciones de secado del extracto por el método de secado por aspersión y habiendo caracterizado este material co-procesado, que contiene el activo (extracto), se debe ahora seleccionar el polímero que permita formular un sistema de liberación modificada tipo matriz hidrofílica que module la liberación del extracto. Para este fin, se continuará empleando el método de secado por aspersión bajo las condiciones ya establecidas, con el fin de obtener un material co-procesado que incluya al polímero (extracto, coadyuvante de secado y polímero).

Este capítulo se centra en seleccionar el polímero en mención, partiendo de una revisión bibliográfica y ensayos preliminares de liberación del extracto a partir de diferentes composiciones de matrices hidrofílicas.

4.1 Marco conceptual

4.1.1 Sistemas de liberación modificada (SLM)

Desde hace algunos años la investigación en el campo de desarrollo de nuevos sistemas de liberación de activos, ha tenido grandes avances. Las ventajas sobre las formulaciones convencionales, incluyen el aumento de la solubilidad del activo en medios acuosos y por ende de la biodisponibilidad; la disminución de efectos adversos y el mejoramiento de la actividad farmacológica; el aumento de la estabilidad del sistema, mediante la protección del activo a las condiciones fisiológicas; la liberación directamente al órgano o célula diana; el control de la velocidad de liberación, que responde a un objetivo dado y la reducción del número de administraciones diarias, lo que mejora el cumplimiento de la terapia por parte

del paciente (23, 65, 210, 234).

El término liberación modificada define a las formas farmacéuticas que se han diseñado de tal manera que se ha variado el lugar o la velocidad a la que es liberado el activo (210, 235). Bajo la denominación liberación modificada se agrupan diferentes sistemas (209, 210) como son: liberación retardada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación dirigida, entre otras. La liberación prolongada, es el comportamiento que presentan los sistemas de tipo matricial hidrofílico que se propone desarrollar en el presente estudio.

Una liberación prolongada se caracteriza porque el activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir su efecto, y después de manera lenta, no necesariamente constante, manteniendo la concentración eficaz durante un tiempo mayor al de una forma farmacéutica convencional. Con este tipo de sistemas, se busca disminuir la frecuencia de administración, por lo que se espera que se mantenga el efecto por lo menos durante ocho horas. Los sistemas más empleados para conseguir este tipo de liberación son los matriciales, como son las matrices hidrofílicas, las inertes y las lipofílicas. De estas se destacan principalmente las matrices hidrofílicas, caracterizadas por tener en su composición, además del activo, uno o más polímeros hidrofílicos, el(los) cual(es) es (son) el(los) encargado(s) de modular la liberación (229, 236). Las matrices hidrofílicas pueden ser fabricadas por métodos convencionales para la obtención de tabletas, como la granulación por vía húmeda y la granulación por vía seca (210), sin embargo se prefiere la vía seca o compresión directa, ya que facilita la obtención de las matrices, disminuye los tiempos de fabricación, además de ofrecer una mayor estabilidad al activo (23, 210). En este contexto, últimamente se viene utilizando el co-procesamiento empleando el método de secado por aspersión, para obtener materiales de compresión directa para la fabricación de matrices hidrofílicas (237).

Para efectos del desarrollo de este trabajo se busca formular el extracto ya transformado tecnológicamente al estado sólido en combinación con polímeros hidrófilos, mediante el co-procesamiento empleando la metodología de secado por aspersión. La presencia del polímero, contribuye a obtener formulaciones con las propiedades deseadas para producir sistemas de liberación modificada, del tipo matriz hidrofílica que permitan mantener o incluso mejorar la actividad farmacológica del extracto de *Physalis peruviana* (31, 62).

4.1.2 Co-procesados

Un co-procesado se puede definir como la combinación de dos o más materiales, que podrían ser diferentes tipos de excipientes o combinaciones de excipiente con el principio activo, para este caso el extracto, mediante un proceso apropiado (237, 238).

Actualmente, para la obtención de un material co-procesado, se requieren los siguientes pasos (237, 238):

- Identificar el grupo de materiales que se van a co-procesar, evaluando cuidadosamente las características y requisitos de funcionalidad que se requieren.
- Seleccionar las proporciones de los diferentes materiales a co-procesar.
- Evaluar el tamaño de partícula requerido para el co-procesamiento. Esto es especialmente importante cuando uno o todos los componentes se procesan en una fase dispersa.
- Seleccionar el mejor proceso de secado, secado por aspersion o secado flash.
- Optimización del proceso.

El co-procesamiento podría conducir a la formación de materiales con propiedades superiores en comparación con las mezclas físicas de sus componentes. El objetivo principal de co-procesamiento es obtener un producto con valor agregado en relación con la relación de su funcionalidad / precio (237, 238).

Durante el co-procesamiento no se producen cambios químicos y todos los cambios se reflejan en las propiedades físicas de las partículas (237, 238). Varios excipientes co-procesados para compresión directa están disponibles comercialmente: Ludipress (α -lactosa monohidrato, polivinilpirrolidona y crospovidona), Cellactose y Microcelac (α -lactosa monohidratada y celulosa), Cel-O-Cal (celulosa y sulfato de calcio), Prosolv (celulosa microcristalina y dióxido de silicio), y F-Melt (manitol, xilitol, excipiente inorgánico, y agente de desintegración, desarrollado para formas de dosificación de disolución rápida) (229).

En cuanto a ejemplos de co-procesados entre excipientes y extractos se encuentra el trabajo realizado por Gallo et al. (62), quienes desarrollaron un sistema tipo matriz hidrofílica por co-procesamiento utilizando el método de secado por aspersión para el extracto de hojas de *Hamamelis virginiana*.

Como se mencionó, para la elaboración de matrices hidrofílicas el co-procesamiento mediante secado por aspersión es uno de los métodos que se puede emplear. Este método consiste en preparar una dispersión o una solución de los materiales (excipientes y activo) en agua o en el disolvente adecuado, para después ser secado por aspersión (62, 171, 237, 238); en el caso de las matrices hidrofílicas se incorpora un polímero, obteniendo materiales directamente compresibles, y que además, son excelentes vehículos para modular la velocidad de liberación del extracto (210). Existen diferentes tipos de polímeros que son empleados en la industria farmacéutica, sin embargo, no todos son adecuados para la elaboración de este tipo de matrices. Un polímero empleado para este fin debe caracterizarse por: tener un fuerte carácter hidrofílico, tener la capacidad de hincharse y de gelificarse por la formación de redes que se mantienen juntas debido a interacciones de tipo iónico, puentes de hidrógeno y/o fuerzas hidrofóbicas (239).

Estructuralmente los polímeros poseen cadenas que pueden ser lineales, ramificadas o reticuladas. Las características que determinan si un polímero se comportará de un modo u otro, son principalmente su peso molecular - es decir, el número total de monómeros por cadena - la estructura de la cadena (lineal o ramificado) y las cadenas laterales que puedan derivar de cada monómero (210).

Los polímeros más empleados en matrices hidrofílicas pueden dividirse en dos grupos: polímeros derivados de celulosa y polímeros no celulósicos (62, 65, 189, 213, 236, 240-256) (Tabla 4-1). La Tabla 4-1 muestra algunos ejemplos de los polímeros utilizados en este tipo de formulaciones, centrándose especialmente en los derivados de celulosa, que son los más ampliamente utilizados en formulaciones sólidas de liberación sostenida. Estos polímeros se componen de monómeros con un cierto grado de hidrofiliidad y tienen una estructura regular a lo largo de su cadena, en la que es posible establecer un elevado número de enlaces por puentes de hidrógeno, que se ven afectados por la entrada del agua (236).

Tabla 4-1 Polímeros utilizados en SLM tipo matriz hidrofílica (62, 65, 189, 213, 236, 240-256)

Polímeros hidrofílicos celulósicos
Metilcelulosa (MC)
Hidroxiopropilmetilcelulosa (Hypromellosa, HPMC)
Hidroxiopropilcelulosa (HPC)
Hidroxietilcelulosa (HEC)
Etilhidroxietilcelulosa (E-HEC)
Carboximetilcelulosa sódica (Na-CMC)
Polímeros hidrofílicos no-celulósicos
Alginato de sodio
Goma xantana
Carragenina
Quitano
Goma guar
Pectina
Amilosa de almidón altamente entrecruzada
Óxido de polietileno
Carbómero
Copolímero de metilmetacrilato

De los polímeros tipo celulosa el más utilizado es el HPMC, debido a que este es un polímero no iónico, por lo tanto no es reactivo (desde el punto de vista de la interacción por cargas), proporcionando estabilidad al producto; es útil en la preparación de formas farmacéuticas de liberación modificada que contienen fármacos solubles e insolubles en dosis altas y bajas; es de elección para su empleo en matrices de compresión directa y existen una diversidad de variaciones químicas que permiten obtener diferentes viscosidades para la modulación de la liberación del activo (257).

Químicamente el HPMC corresponde a un polímero semisintético, que presenta diferencias en el grado de sustitución de los radicales metoxilo e hidroxipropoxilo y su estructura se muestra en la Figura 4-1. Las diferencias en el grado de sustitución dan origen a las múltiples referencias comerciales existentes. En la Tabla 4-2 se presentan algunas de estas referencias (empleadas en esta investigación), en las que el tipo de sustitución se relaciona con la cantidad de grupos metoxilo e hidroxipropoxilo, por ejemplo, un tipo de sustitución 2910 quiere decir que contiene un 29% de grupos metoxilo y 10% de grupos hidroxipropoxilo. Adicionalmente, se presenta la viscosidad aparente de las soluciones al 2% en agua, que refleja el grado de polimerización de cada uno de ellos (257).

Figura 4-1 Configuración estructural de la HPMC

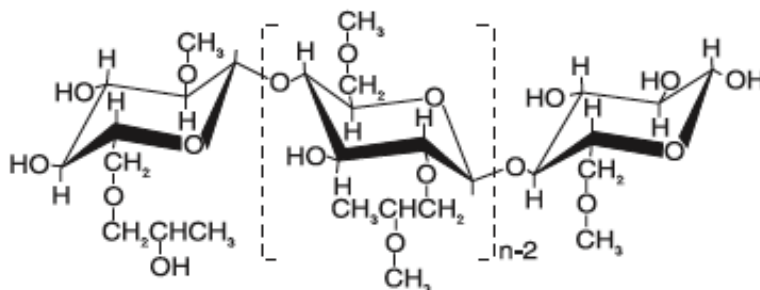
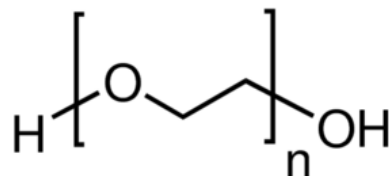


Tabla 4-2 Diferencias químicas de los polímeros derivados de celulosa utilizados (257).

HPMC	-	E10M	K4M	K15M	K100M
Metoxil (%)	USP	28-30	19-24	19-24	19-24
Hidroxiopropoxil (%)	USP	7-12	7-12	7-12	7-12
Tipo de sustitución	USP/BP	2910	2208	2208	2208
Viscosidad aparente, 2% en agua a 20°C (cP)	USP	7500-14000	3000-5600	11250-21000	80000-120000

Por otro lado, dentro del grupo de los polímeros no celulósicos existen varios de diferente origen (algunos de origen natural y otros sintéticos), uno de los más empleados es el óxido de polietileno comercialmente conocido como polyox® (Tabla 4-3) y cuya estructura química se presenta en la Figura 4-2. Este polímero corresponde a una resina hidrosoluble del tipo no iónico, con un alto peso molecular que puede estar aproximadamente entre los 100000 y 8000000 Daltons. Posee cadenas asociadas por medio de fuerzas de Van der Waals débiles (polietileno), interacciones fuertes dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. Por esta razón, estos polímeros presentan muchas propiedades que son típicas de otras clases de polímeros solubles en agua, tales como su afinidad con el agua, su capacidad de hinchamiento y de formación de geles (210, 258).

La mayoría de los demás polímeros no celulósicos presentan disociación por lo que, dependiendo de la aplicación, su uso puede verse limitado.

Figura 4-2 Estructura básica del óxido de polietileno**Tabla 4-3** Óxido de polietileno WSR NF para aplicaciones farmacéuticas (259)

Polaxámero	Peso molecular aproximado (Daltons)	Rango de viscosidad aparente, a 25°C (cP)		
		Solución al 5%	Solución al 2%	Solución al 1%
WSR N-10	100000	30-50		
WSR N-80	200000	55-90		
WSR N-750	300000	600-1200		
WSR-205	600000	4500-8800		
WSR-1105	900000	8800-17600		
WSR N-12K	1000000		400-800	
WSR N-60K	2000000		2000-4000	
WSR-301	4000000			1650-5500
WSR Coagulant	5000000			5500-7500
WSR-303	7000000			7500-10000

WSR: Resina hidrosoluble (water soluble resin)

Considerando la amplia gama de polímeros disponibles, a partir de la información bibliográfica existente y algunos ensayos realizados, se presenta a continuación el proceso seguido para la selección de algunos de ellos.

4.2 Metodología

4.2.1 Materiales

Los frutos de *P. peruviana* fueron colectados en Subia, Cundinamarca, Colombia en Enero de 2014. Para la preparación de los extractos se utilizó etanol (EtOH) 96% y como

coadyuvante de secado se utilizó dióxido de silicio coloidal (Aerosil 200®, Degussa AG, de Evonik industries), empleando las condiciones establecidas para el secado en el capítulo 3. Los polímeros evaluados fueron Hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) E10M, K4M, K15M y K100M y óxido de polietileno: Polyox WSR 303, proporcionados por Colorcon.

4.2.2 Equipos

Para el proceso de secado del extracto se utilizó el equipo de secado por aspersión Büchi B290, utilizando una boquilla con un orificio de 1,5 mm de diámetro y usando un deshumidificador e Inert loop B 295 para secado con solventes orgánicos.

Para la obtención del extracto fluido se utilizó una estufa de aire circulante Stokes, y el extracto se concentró en un rotavapor IKA RV210, para la determinación del índice de refracción se utilizó un refractómetro digital Mettler toledo 30PX. La determinación del peso del material seco se realizó en una balanza de precisión Ohaus modelo PA 3102.

Para mantener homogénea la mezcla del extracto, coadyuvante de secado y polímero se utilizó una plancha de agitación IKA C-MAG HS 7.

Para la cuantificación de los marcadores en los estudios preliminares de liberación del extracto se utilizó un UHPLC Thermo Dionex ultimate 3000 system, acoplado a un detector Light Scattering (ELSD) Sedex 85 (Sedere, Francia), detectando a una temperatura de 40°C y una ganancia de 10.

4.2.3 Métodos

4.2.3.1 Selección de los posibles polímeros a partir de la revisión bibliográfica.

La importancia de seleccionar adecuadamente el polímero, radica en que al ser parte de la formulación y de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, permitirá o no modular la liberación del extracto. Esta selección inicial se basó en la revisión bibliográfica de los diferentes polímeros celulósicos y no celulósicos (Tabla 4-1), empleados en diferentes estudios para la elaboración de matrices hidrofílicas. (65, 210, 236). El primer criterio para

la selección del polímero fue que no tuviera cargas que pudieran generar algún tipo de incompatibilidad con el extracto. Posteriormente, luego de la preselección de los polímeros, se escogieron aquellos derivados de celulosa y no celulósicos más utilizados dentro de cada categoría. Con estos polímeros preseleccionados se realizó la evaluación preliminar, cuya parte experimental se presenta a continuación (62).

4.2.3.2 Elaboración del material co-procesado

El material co-procesado, que como se mencionó, comprende la combinación del extracto fluido, el dióxido de silicio coloidal y el polímero a seleccionar, es obtenido mediante la metodología de secado por aspersion. Este material constituye el eje del sistema de liberación modificada que después de comprimir se presenta como un sistema matricial. El extracto fluido se obtuvo de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo anterior (numeral 3.2.3.1) y se concentró hasta un 7,5% de sólidos totales.

Para la elaboración del material co-procesado se prepararon seis formulaciones partiendo de dispersiones etanólicas de diferentes combinaciones del extracto fluido de frutos de *P. peruviana* con un contenido de sólidos totales de 7,5%, el dióxido de silicio y los diferentes polímeros preseleccionados a partir de la revisión bibliográfica, de acuerdo a lo que se muestra en la Tabla 4-4. Para garantizar la incorporación completa de los excipientes y la homogeneidad de la mezcla, esta se agitó durante 60 min antes de la atomización y durante todo el proceso de secado por pulverización a 1000 rpm.

Tabla 4-4 Formulaciones elaboradas para la selección del polímero

Formulación	Extracto (%)	Coadyuvante de secado (%)	Polímero	Proporción del polímero (%)
1	57,1	42,9	-	0
2	50,0	37,5	HPMC K4M	12,5
3	50,0	37,5	HPMC K15M	12,5
4	50,0	37,5	HPMC K100M	12,5
5	50,0	37,5	HPMC E10M	12,5
6	50,0	37,5	Poliox WSR 303	12,5

El proceso de secado por aspersion se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones seleccionadas en el capítulo 3 para la obtención del extracto seco. Las condiciones fueron:

temperatura de inyección 80°C; velocidad de flujo del nitrógeno de inyección 400 L/h; ajuste de la bomba de alimentación 5%; ajuste del aspirador 100%; concentración del extracto 7,5%; relación del extracto / coadyuvante de secado / polímero 1:0,75:0,25 (50% : 37,5% : 12,5%). La proporción del polímero se fijó basándose en estudios previos realizados por otros investigadores (62, 181, 236, 245, 260).

Cada una de las formulaciones presentadas en la Tabla 4-4, fueron caracterizadas, antes y después de procesadas. Previo al secado se evaluó la viscosidad y al material sólido después del proceso, se le evaluó el rendimiento.

▪ **Viscosidad**

Se determinó la viscosidad de las dispersiones por triplicado a 20°C utilizando un viscosímetro Brookfield DV-E, a 50 RPM y con una aguja SP06.

▪ **Rendimiento del proceso**

El rendimiento se calculó como la relación entre el peso del polvo seco obtenido y el contenido inicial de sólidos presentes en la dispersión a secar, de manera similar a lo realizado en el capítulo 3.

4.2.3.3 Preparación de las matrices y evaluación preliminar del comportamiento de liberación.

Las matrices fueron elaboradas a partir del material co-procesado, teniendo en cuenta que estas contuvieran 500 mg de extracto seco. Para este fin, se pesaron 1000 mg de cada uno de los materiales co-procesados mediante la metodología de secado por aspersión, de acuerdo a la Tabla 4-4 y se comprimieron con la ayuda de una tableteadora hidráulica Carver C, a una fuerza de 5 kN durante 10 segundos (62, 181, 236, 245, 260), empleando una matriz de 14 mm de diámetro.

A las matrices se les realizaron ensayos de liberación preliminares con el fin de seleccionar el polímero que permitiera modular la liberación del extracto a partir de las diferentes

formulaciones elaboradas. Para tal fin, se empleó un vaso de precipitados de 150 mL, con una paleta de rotación a una velocidad de 100 rpm, utilizando 100 mL de agua destilada como medio de liberación, durante 4 horas; la temperatura se mantuvo a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. El muestreo se hizo a intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 min, tomando 1 mL de alícuota y reemplazándola inmediatamente con el mismo volumen de medio acondicionado a la temperatura de trabajo. Inmediatamente después de tomada la muestra esta se pasó por un filtro de $0,45 \mu\text{m}$, para retirar las partículas que pudieran estar presentes.

Este mismo procedimiento se aplicó para el material co-procesado obtenido sin polímero, (formulación 1, Tabla 4-4), para lo cual se hicieron tabletas de 875 mg.

Con el fin de evidenciar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles de liberación de las formulaciones con polímero y la formulación 1, sin polímero, se realizó la comparación mediante el factor de similitud, f_2 , calculado por la Ecuación 4-1.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^q (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} 100 \right\}$$

Ecuación 4-1

Donde n es el número de disolución a diferentes tiempos, R_t y T_t son porcentajes de liberación de extracto en cada tiempo. Si el valor de f_2 está entre 50 y 100 indica similitud entre los perfiles de liberación comparados y por ende que el polímero no tendría influencia en la modulación de la liberación (261).

▪ **Cuantificación del extracto**

La cuantificación del extracto se realizó en un equipo de UHPLC-ELSD, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex Luna NH_2 100 Å ($3 \mu\text{m} - 150 \times 2\text{mm}$), con una temperatura del horno de 30°C , como fase móvil MeCN/ H_2O (82,5:12,5) por 20 minutos y con un flujo de 0,2 mL/min. Las condiciones del detector ELSD fueron: ganancia: 10; temperatura: 82°C y una presión de nitrógeno de 72,5 psi.

La cuantificación del extracto se hizo en función de los marcadores fructosa y glucosa. Para

esto se determinó el contenido inicial de estos marcadores en el extracto y en los materiales obtenidos después del secado por aspersión (cada una de las formulaciones obtenidas) y en cada una de las alícuotas tomadas durante el ensayo de liberación.

▪ **Análisis cinético**

Por tratarse de un estudio preliminar para la selección del polímero, se realizó el análisis cinético básico de la liberación del extracto para las formulaciones que contenían el polímero HPMC-K4M, HPMC-K15M y HPMC-K100M, a partir de los datos de concentración del extracto (marcador) liberado, expresado en porcentaje, en cada intervalo de muestreo en función del tiempo. Los datos de liberación fueron evaluados suponiendo un ajuste a las cinéticas de orden 0 y 1.

4.3 Resultados y discusión de resultados

4.3.1 Selección de los posibles polímeros a partir de la revisión bibliográfica

Debido a que el extracto se trata de un sistema multicomponente, (26), el primer criterio para la selección del polímero fue que este no tuviera cargas que pudieran generar algún tipo de incompatibilidad o inestabilidad en el extracto. Por tal motivo, se seleccionaron los polímeros no iónicos metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa y etilhidroxietilcelulosa como polímeros celulósicos y óxido de polietileno como polímero no celulósico.

De los polímeros preseleccionados se escogieron aquellos más utilizados de cada categoría, esto con el fin de facilitar su consecución. Por tal razón, fueron escogidos para elaborar las matrices hidrofílicas la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como polímero derivado de celulosa y el óxido de polietileno como polímero no celulósico.

El óxido de polietileno, posteriormente se descartó ya que este posee una temperatura de transición vítrea (T_g) relativamente baja (65–70°C (229)). La T_g , es la temperatura a partir de la cual el material sufre un marcado cambio de sus propiedades físicas. A temperaturas

por encima de la T_g segmentos relativamente grandes de 10 o 50 unidades de repetición se pueden mover con libertad en movimientos conjuntos, logrando modificar su conformación, mientras que por debajo de esta temperatura los movimientos quedan limitados a segmentos muy pequeños, impidiendo una reorganización. Por encima de esta temperatura el óxido de polietileno tiene un comportamiento termoplástico y puede ser fácilmente calandrado, extrudido, moldeado por inyección o fundido (262), lo que quiere decir que a la temperatura establecida para el secado por aspersion del extracto (80°C), definida en el capítulo 3, este polímero se vuelve deformable o flexible (210, 232), impidiendo su incorporación a la formulación (formulación 6), como se observa en la Figura 4-3.

Figura 4-3 Comportamiento de la formulación 6 frente al secado por aspersion



De los polímeros celulósicos se seleccionó la Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) debido a que es ampliamente utilizada para la elaboración de sistemas de liberación modificada tipo matriz hidrofílica (257, 263), debido a su alta capacidad de hinchamiento, una de sus características más importantes que influencia de manera significativa la cinética de liberación de principios activos (257, 263). De este polímero se escogieron varias referencias que se caracterizan por poseer diferentes viscosidades, con el fin de ver el efecto que esta propiedad podría tener sobre la liberación del extracto. De esta manera se seleccionaron HPMC K100, K15M, K4M y E10M, las cuales se presentaron en la Tabla 4-2.

4.3.2 Elaboración del material co-procesado

Como se mencionó en la metodología, para la obtención del material co-procesado se utilizaron las mismas condiciones de secado por aspersión que para el extracto de frutos de *P. peruviana* junto con el coadyuvante de secado.

Se realizó un ensayo preliminar verificando que se pudiera, en estas condiciones, obtener el material co-procesado que incluyera el polímero, obteniendo resultados satisfactorios.

Una vez elaboradas las formulaciones presentadas en la Tabla 4-4, se evaluaron el rendimiento y la viscosidad según lo explicado en la metodología; los resultados correspondientes se ilustran en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5 Evaluación del rendimiento del proceso en términos de variaciones en la formulación (relación extracto / coadyuvante / polímero) y viscosidad de las formulaciones.

Formulación	Rendimiento del proceso (%)		Viscosidad a 20°C (cps)	
	Promedio	Desv.	Promedio	Desv.
Formulación 1	68,1	2,0	45	4
Formulación 2	82,2	6,4	133	31
Formulación 3	74,0	1,7	167	12
Formulación 4	77,7	0,8	240	20
Formulación 5	30,4	4,9	2787	306

Formulación 1: Extracto : SiO₂ 57,1%:42,9%; **Formulación 2:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K4M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 3:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 4:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K100M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 5:** Extracto : SiO₂ : HPMC-E10M 50,0%:37,5%:12,5%.

La diferencia más notoria en la viscosidad, respecto a la formulación 1, se presenta para la formulación 5, lo que posiblemente se deba al alto porcentaje de metoxilos que contiene el HPMC E10M en comparación con los polímeros HPMC K4M, K15M y K100M (Tabla 4-2). De acuerdo a Dahl et al. (264) las variaciones relativas al contenido de grupos metoxilo en el polímero, pueden generar un aumento en la viscosidad de sus dispersiones, lo que también podría explicar las diferencias presentadas en el rendimiento del proceso aquí evaluado.

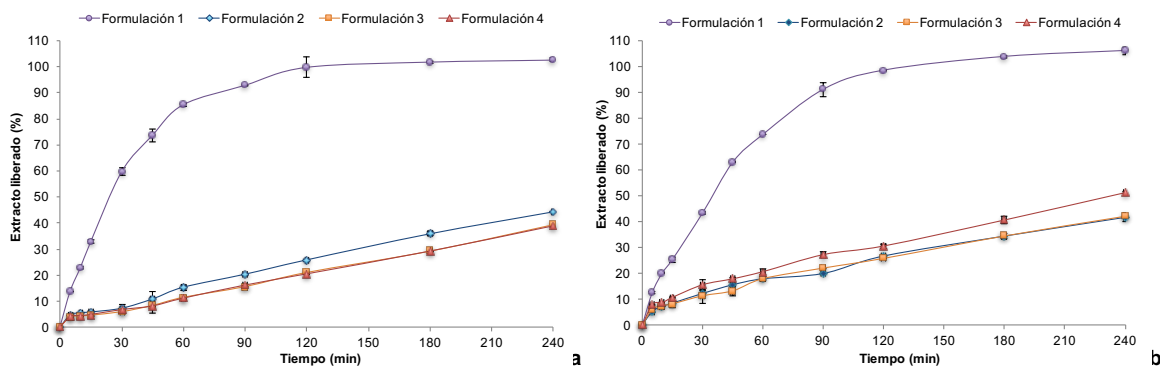
Los rendimientos resultantes para cada caso evidencian que bajo las condiciones de secado previamente establecidas, es necesario descartar el polímero HPMC E10M ya que este tiene un rendimiento de apenas el 30,4%. Al comparar este resultado con la viscosidad

obtenida para esta dispersión, se aprecia que es la que presenta mayor viscosidad (2787 cps). Esta viscosidad alta puede generar una mayor adherencia del material en el cilindro de secado, produciendo un rendimiento más bajo, similar a lo reportado por otros autores (98, 194).

4.3.3 Preparación de las matrices y evaluación preliminar del comportamiento de liberación

Después de elaboradas las matrices con cada una de las formulaciones (Tabla 4-4) y habiendo descartado la formulación 5 por lo ya explicado, se realizaron los experimentos de liberación *in-vitro*, de manera preliminar durante 4 horas en agua destilada, cuyos resultados se presentan en la Figura 4-4.

Figura 4-4 Liberación del extracto (% de fructosa y glucosa liberada) a partir de tabletas de Extracto:SiO₂ y sistemas matriciales con diferentes tipos de HPMC, empleando como medio de liberación agua.



a. Perfil de liberación del extracto cuantificando fructosa; **b.** Perfil de liberación del extracto cuantificando glucosa. **Formulación 1:** Extracto : SiO₂ 57,1%:42,9%; **Formulación 2:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K4M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 3:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 4:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K100M 50,0%:37,5%:12,5%. Promedio ± desv. est.

Como se puede observar, la formulación 1 (Extracto/SiO₂ 57,1%:42,9%), la cual no posee polímero, libera rápidamente el extracto (cuantificado en función de fructosa y glucosa), ya que a los 60 minutos del estudio ha liberado cerca del 80% y a las dos horas cerca del 100% del extracto. Este resultado se esperaba, ya que, si no hay polímero presente, la formulación no está en capacidad de modular la liberación del extracto. Esto contrasta con lo observado para las formulaciones 2 a 4, las cuales poseen polímero y no permitieron

una liberación completa del extracto en el mismo periodo de tiempo evaluado, lo que significa que dichas formulaciones son capaces de modular dicha liberación.

Al comparar los perfiles de liberación del extracto se observa que las formulaciones de las matrices hidrofílicas (Formulación 2: Extracto/SiO₂/HPMC-K4M (50,0%:37,5%:12,5%); Formulación 3: Extracto/SiO₂/HPMC-K15M (50,0%:37,5%:12,5%) y Formulación 4: Extracto:SiO₂:HPMC-K100M (50,0%:37,5%:12,5%) son similares entre sí, con valores del factor de similitud f_2 por encima de 63,95 (Tabla 4-6), mientras que al compararlos con la formulación que no contiene polímero (Extracto/SiO₂ 57,1%:42,9%), se observan valores del factor de similitud f_2 por debajo de 17,65, mostrando que los perfiles de liberación no son similares. Estos valores indican que no hay diferencias en los perfiles de liberación, de las formulaciones 2, 3 y 4 independientemente de la referencia de polímero utilizado (Formulación 2 HPMC-K4M; Formulación 3: HPMC-K15M; Formulación 4: HPMC-K100M), al nivel de concentración utilizado en la formulación (12,5%) y a pesar de que en las mezclas iniciales se encuentren diferencias en la viscosidad (Tabla 4-5). Esto puede deberse al relativamente alto porcentaje de polímero en la matriz hidrofílica (12,5% P/P).

Tabla 4-6 Factor de similitud para comparación de perfiles de liberación preliminar en la selección del polímero

Comparación	f_2 fructosa	f_2 glucosa
Formulación 1 : Formulación 2	13,67 ^b	15,64 ^b
Formulación 1 : Formulación 3	12,34 ^b	15,63 ^b
Formulación 1 : Formulación 4	12,32 ^b	17,65 ^b
Formulación 2 : Formulación 3	96,18 ^a	91,82 ^a
Formulación 2 : Formulación 4	71,00 ^a	65,86 ^a
Formulación 3 : Formulación 4	98,33 ^a	66,31 ^a

Formulación 1: Extracto : SiO₂ 57,1%:42,9%; **Formulación 2:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K4M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 3:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 4:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K100M 50,0%:37,5%:12,5%; a. Perfiles similares ($f_2 = 50-100$); b. Perfiles no similares ($f_2 = 0-50$).

Gallo et al. obtuvieron un comportamiento similar en la liberación del extracto de *Hamamelis virginiana* a partir de las matrices hidrofílicas de carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na), en donde no se encuentran diferencias significativas en los perfiles de liberación de dichas matrices que contienen este polímero en una concentración de 13% p/p (62). Por otro lado, Escudero et al. y Campos-Aldrete et al. mostraron que cuando los porcentajes de HPMC estaban alrededor de 20% p/p, la variación en el grado de viscosidad no genera cambios importantes en el comportamiento de liberación del fármaco (265, 266).

Por otro lado, se realizó la evaluación cinética preliminar de la liberación del extracto de las diferentes formulaciones que contenían polímero (Tabla 4-7), encontrándose que la liberación del extracto en las formulaciones 2 a 4 se ajustan mejor a una cinética de orden 0, tanto para el marcador de fructosa como para el de glucosa. Estos resultados sugieren que la velocidad de liberación del marcador es constante en el tiempo y por lo tanto independiente de su concentración. Como ya se había indicado, este comportamiento estaría relacionado con la alta concentración de polímero en las formulaciones evaluadas, produciendo una baja velocidad de liberación del extracto.

Tabla 4-7 Análisis cinético de liberación de extracto a partir de las matrices formuladas con los diferentes polímeros de HPMC

Formulación	Orden 0						Orden 1					
	Fructosa			Glucosa			Fructosa			Glucosa		
	R ²	A	B	R ²	A	B	R ²	A	B	R ²	A	B
2	0,9972	3,64	0,175	0,9868	6,28	0,151	0,8956	1,79	0,0098	0,8465	2,11	0,0079
3	0,9974	2,23	0,153	0,9841	6,87	0,151	0,9239	1,54	0,0102	0,8838	2,11	0,0079
4	0,9979	2,48	0,149	0,9907	8,74	0,181	0,9234	1,58	0,0099	0,8781	2,38	0,0076

Formulación 2: Extracto : SiO₂ : HPMC-K4M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 3:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **Formulación 4:** Extracto : SiO₂ : HPMC-K100M 50,0%:37,5%:12,5%. **R²:** Correlación; **A:** Intercepto **B:** Pendiente.

De acuerdo a estos resultados, se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas (según el factor de similitud, f_2) entre los perfiles de liberación de las matrices hidrofílicas de HPMC, con las tres diferentes referencias de polímero (Tabla 4-5), lo que implicaría el poder escoger cualquiera de ellas. Así, se seleccionó la formulación 3 (Extracto : SiO₂ : HPMC-K15M 50,0% : 37,5% : 12,5%) para la realización del estudio detallado del mecanismo y comportamiento fisicoquímico de la liberación del extracto (resultados que se presentan en el siguiente capítulo), considerando que esta formulación presenta un valor intermedio de velocidad de liberación, cuando se cuantifica fructosa. Esta formulación seleccionada contiene el polímero HPMC-K15M y los resultados encontrados para la velocidad de liberación resultan lógicos si se considera que este polímero posee una viscosidad intermedia (15000 cps), en comparación de los otros dos polímeros evaluados. Un valor intermedio de viscosidad permite observar cambios más visibles en la liberación, al realizar ajustes de la proporción del polímero en una formulación, a diferencia

de lo que ocurre con polímeros de mayor viscosidad y se dificulta con uno de menor viscosidad.

4.4 Conclusiones

De los polímeros de HPMC, se seleccionaron las referencias K100, K15M y K4M para elaborar los materiales co-procesados extracto-dióxido de silicio-polímero; se descartaron las formulaciones 5 y 6, correspondientes a HPMC E10M y óxido de polietileno, respectivamente, debido al bajo rendimiento en el proceso de secado por aspersión, para el primer caso y la imposibilidad de obtener un polvo, cuando se emplea el óxido de polietileno.

Se elaboraron las matrices hidrofílicas a partir del material co-procesado con las formulaciones 2, 3 y 4 que contenía el extracto de frutos de *P. peruviana* y los polímeros de HPMC con referencias K100, K15M, K4M, evidenciando en los tres casos la modulación en la liberación del extracto en comparación con la matriz hidrofílica formulada sin polímero (Formulación 1), que presentó un comportamiento similar al de un sistema de liberación inmediata.

Al comparar los perfiles de liberación de las matrices hidrofílicas a partir de las formulaciones 2, 3 y 4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas a la misma concentración del polímero (12,5%), lo que podría estar relacionado con la alta concentración del mismo, como lo han reportado otros autores.

Se seleccionó el polímero HPMC-K15M para el estudio detallado del mecanismo de liberación del extracto a partir de formulaciones de matrices hidrofílicas, debido a su comportamiento intermedio en velocidad de liberación, asociado a la viscosidad intermedia que presentan sus dispersiones en comparación con los otros polímeros evaluados.

Capítulo 5. Estudio del mecanismo y comportamiento fisicoquímico de la liberación del extracto a partir de un sistema tipo matriz hidrofílica

El objetivo de esta parte del estudio fue desarrollar una forma farmacéutica sólida de liberación modificada tipo matriz hidrofílica, que contiene el extracto de frutos de *Physalis peruviana*, como principio activo. Para este propósito se utilizó el co-procesamiento por el método de secado por aspersión, cuyas condiciones fueron previamente establecidas, empleando en la formulación el dióxido de silicio como coadyuvante de secado y el HPMC-K15M, seleccionado previamente, como polímero para modular la liberación del extracto. Se elaboraron cuatro formulaciones variando la proporción del polímero con el fin de determinar la influencia de este excipiente sobre el comportamiento de la liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas, en diferentes condiciones de pH, simulando el tracto gastrointestinal; adicionalmente, a la formulación seleccionada a partir de este ensayo, se le realizaron otras pruebas como estudios de erosión, captación de agua y frentes de movimiento, que complementaron la evaluación detallada del mecanismo de liberación.

5.1 Marco conceptual

5.1.1 Sistemas de liberación modificada (SLM): Matrices hidrofílicas

En las últimas décadas se ha incrementado el desarrollo de sistemas o dispositivos que permiten que un activo pueda liberarse de manera controlada o bien dirigirse a un blanco específico del organismo (210, 236, 245). Sin embargo, este tipo de desarrollos que se

realiza en su mayoría con fármacos (moléculas obtenidas por síntesis química o aisladas a partir de fuentes naturales), son menos comunes en el campo de los medicamentos que incluyen extractos como principios activos. Por otra parte, hay que considerar que muchos de estos SLM emplean tecnologías sofisticadas en su elaboración, difícilmente alcanzables en países en desarrollo y en muchos casos que generan resultados importantes a escala laboratorio, pero no fácilmente escalables a un nivel industrial. Esta consideración hace que el desarrollo de formulaciones como sistemas matriciales ofrezca ventajas teniendo en cuenta que se pueden elaborar empleando los equipos propios de la tecnología de fabricación de tabletas convencionales, lo que hace que los costos asociados a estos medicamentos no sean altos en comparación de otros SLM (236, 245).

Los sistemas matriciales se caracterizan por llevar el ingrediente activo (fármaco o extracto) uniformemente disperso (a nivel molecular o como partículas) en un soporte (matriz), cuya composición varía dependiendo del tipo al que corresponda. De acuerdo a la composición de la matriz y de si el principio activo está disperso a nivel molecular o particular los mecanismos por los que se da la liberación del activo pueden variar, siendo los más importantes los de difusión, disolución, erosión e hinchamiento (2, 245, 267).

Según su composición, se pueden distinguir tres tipos de sistemas matriciales: inertes, lipídicos e hidrofílicos, siendo estos últimos los más empleados por su versatilidad para modular la liberación del ingrediente activo y eje de la presente investigación, por lo que se hablará de ellos con mayor detalle.

➤ Matrices inertes, plásticas o insolubles.

Las matrices inertes son una forma farmacéutica de liberación modificada en donde el fármaco se mezcla con un polímero inerte o hidrófobo y de ser necesario algunos otros excipientes, para luego ser comprimidos. La liberación del fármaco, se da por la penetración del agua, que lo disuelve, haciendo posible su difusión a través de una red de canales que existen entre las partículas de polímero compactado. Algunos ejemplos de excipientes que han sido utilizados como matrices inertes o hidrófobas incluyen: polietileno, cloruro de polivinilo, acetato de celulosa y polímeros de acrilato y sus copolímeros (268).

➤ Matrices lipídicas

Estas matrices se preparan a partir de materiales como glicéridos, principalmente

saturados (mono-, di- y triglicéridos), ácidos y alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y de alcoholes de bajo peso molecular y por ceras, constituidas principalmente por ésteres de alcoholes y de ácidos grasos superiores. La liberación a partir de estas matrices se produce por difusión del activo a través de los poros y erosión de la matriz. Este tipo de matrices pueden ser afectadas por lipasas e inclusive por variaciones en el pH, por lo tanto, la liberación del fármaco es más sensible a la composición del fluido digestivo y a la erosión de la matriz la cual es totalmente insoluble (269).

➤ Matrices hidrofílicas

Las matrices hidrofílicas, son ampliamente utilizadas en la administración de activos por vía oral debido a su flexibilidad para obtener el perfil de liberación deseable y el bajo costo de fabricación. Para la formulación de este tipo de matrices, se utilizan polímeros hidrófilos con alta capacidad de gelificación (269).

Los tamaños de las matrices pueden ir desde micrones (por ejemplo, las microcápsulas) a milímetros (minitables) y tamaños más grandes como tabletas y cápsulas. Su forma ha evolucionado desde una esfera clásica de gránulos y tabletas a una serie de formas geométricas que modulan la liberación del fármaco de acuerdo al área superficial de contacto con el medio (210, 236, 245).

En las ciencias farmacéuticas las matrices hinchables para administración oral son comúnmente fabricadas en forma de tabletas obtenidas por la compresión de polvos de micropartículas hidrofílicas. Su composición, para el caso en el que el activo es un extracto, comprende este a un nivel alto (60-80% w/w), junto con un polímero hidrófilo, además de excipientes solubles (245, 267).

Los factores más importantes que deben tenerse en cuenta en el desarrollo de una formulación de este tipo son la solubilidad del activo; el tipo de polímero o polímeros que hace(n) parte de la matriz, la viscosidad y el tamaño de la partícula del polímero; el porcentaje de activo incorporado; la proporción de activo/polímero y las dimensiones del sistema (210, 236). Estos factores mencionados van a incidir en el comportamiento de la liberación del activo, que se deben caracterizar para definir la composición de la formulación.

5.1.2 Mecanismo de liberación del principio activo a partir de matrices hidrofílicas

Como se mencionó, una de las características más importantes que debe tener el polímero o polímeros hidrofílico(s), es poseer un alto grado de hinchamiento, ya que esta capacidad va a ser determinante en la cinética de liberación del activo a partir de la matriz hidrofílica.

Según varios autores (236, 245-247, 256, 257, 260, 261, 267, 270-275), la liberación de un activo, a partir de la matriz hidrofílica se puede resumir en varias etapas que siguen una secuencia, como se explica a continuación:

- Al comienzo del proceso, el comprimido entra en contacto con el medio, generando una interfase polímero / medio, resultando en la imbibición parcial de agua por parte de la matriz. La liberación del activo en este punto se basa en la disminución de la temperatura de transición vítrea del polímero (T_g), causada por el efecto plastificante que ejerce el agua proveniente de los fluidos fisiológicos al ingresar en la matriz. La presencia del agua genera un cambio en la movilidad de las cadenas del polímero, modificando la flexibilidad del material, que pasa del estado vítreo a un estado parecido al de una goma, produciendo así una liberación inmediata del activo que yace en la superficie de la matriz.
- Transcurrido el tiempo, el agua entra en mayor proporción a la matriz y La interacción polímero / agua, ocasiona coalescencia o unificación de las diferentes partículas del polímero que se están hidratando sobre la superficie de la matriz, con la consecuente disminución del T_g y formación de una capa de gel.
- En la medida que pasa más tiempo se evidencia un mayor espesor de la capa gel a través de la cual difunden, el medio de disolución o fluido biológico hacia el interior del comprimido o el activo y excipientes solubles hacia el exterior del sistema, generando un gradiente de concentración y un alto grado de hinchamiento que conlleva a una variación en las dimensiones de la matriz. Con el aumento de contenido de agua, el coeficiente de difusión del activo aumenta sustancialmente. Es de aclarar, que dentro de la matriz polimérica coexisten el activo disuelto y el no disuelto dependiendo del grado de hidratación del sistema y de la solubilidad que tenga este. El activo que no esté disuelto no está disponible para difundir.

- Posteriormente, el polímero se puede erosionar, permitiendo la liberación del activo, se encuentre disuelto o no.

De acuerdo a lo explicado las interacciones entre el agua, el polímero y el activo son los factores que principalmente influyen sobre el control de la liberación, resaltando que la formación de la capa gel constituye el elemento central del mecanismo por la que esta se da, puesto que previene la desintegración de la matriz y modula la penetración del agua (257, 260, 263, 266, 276). De esta manera, aspectos como la penetración del agua, el hinchamiento del polímero, la disolución, la difusión del activo y la erosión de la matriz son los fenómenos que determinan la liberación (246, 247, 263, 267, 277).

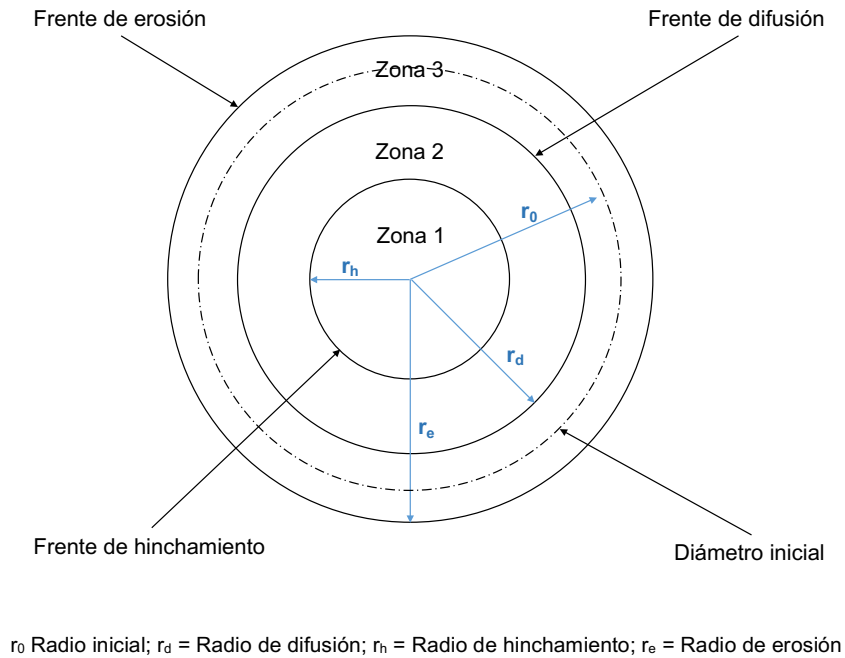
Con el fin de seguir la dinámica de la capa de gel durante la liberación del activo en las matrices hidrofílicas hinchables, se deben definir los límites de cada una de las zonas formadas o frentes de movimiento. Es bien conocido que una capa de gel está delimitada físicamente por dos frentes que separan los estados de la matriz, es decir, los límites que separan la matriz hinchada con solvente (agua) y la parte vítrea del polímero (matriz seca sin hinchar). Sin embargo, puede existir la posibilidad de la presencia de un tercer frente de movimiento al interior de la capa de gel, debido a la precipitación del activo disuelto o a su no disolución. Este frente adicional se denomina frente del activo no disuelto o frente de difusión y depende de su solubilidad en el medio. Su presencia puede crear condiciones en el sistema tales que la liberación sea más controlada por la disolución del activo que por el hinchamiento del polímero (246, 247, 263, 267, 277). Así, podría encontrarse tres frentes de movimiento bien definidos, los cuales se representan en la Figura 5-1, y se describen a continuación, teniendo en cuenta que la zona de la línea punteada corresponde al diámetro inicial de la matriz antes de ser expuesta al medio de disolución:

Zona 1: Es aquella comprendida desde el centro de la matriz hasta el frente de hinchamiento y representa el límite entre el polímero todavía vítreo y su estado gelificado (gomoso).

Zona 2: Compreendida desde el frente de hinchamiento hasta el frente de difusión y representa el límite en la capa de gel entre el activo, hasta ahora no disuelto y disuelto.

Zona 3: Comprende la zona ubicada entre el frente de difusión y el frente de erosión, representa el límite entre la capa de gel y el medio de disolución.

Figura 5-1 Representación esquemática de una matriz hidrofílica después de determinado tiempo de hinchamiento, en donde se señalan las diferentes zonas.



Considerando los diferentes aspectos que involucra la liberación de un activo, para este caso el extracto de *P. peruviana*, a partir de un sistema tipo matriz hidrofílica, ensayos de laboratorio como la evaluación del comportamiento de sorción, la determinación de la evolución de los frentes de movimiento, la erosión, la liberación y las relaciones que se puedan plantear entre ellos, se vuelven fundamentales a la hora de explicar el mecanismo por el que se da esta liberación (246, 247, 263, 267, 277).

5.2 Metodología

5.2.1 Materiales

Los frutos de *P. peruviana* fueron colectados en Subia, Cundinamarca (Colombia), en enero de 2014. Para la preparación de los extractos se utilizó etanol (EtOH) 96% (proporcionado por la Empresa de Licores de Cundinamarca-Colombia, grado farmacéutico) y como coadyuvante de secado se utilizó dióxido de silicio coloidal (Aerosil 200®, Degussa AG, de Evonik industries). Para la elaboración de las matrices hidrofílicas

se utilizó Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) K15M (Methocel, proporcionado por Colorcon).

5.2.2 Equipos

Para el proceso de secado del extracto se utilizó el equipo de secado por aspersión Büchi B290, utilizando una boquilla con un orificio de 1,5 mm de diámetro y usando un deshumidificador e Inert loop B 295 para secado con solventes orgánicos.

Para la obtención del extracto fluido se empleó una estufa de aire circulante Stokes y el extracto se concentró en un rotavapor IKA RV210; la determinación del índice de refracción se realizó en un refractómetro digital Mettler toledo 30PX; la determinación del peso del material seco se realizó en una balanza de precisión Ohaus modelo PA 3102.

La evaluación de la liberación del extracto, a partir de las matrices elaboradas, se llevó a cabo en un Aparato 2 de la USP, Nova Ética modelo 299, con vasos disolutores de 150 mL y paletas adaptadas al tamaño del vaso.

La determinación de la morfología de las partículas se realizó en un microscopio electrónico de barrido FEI-Quanta 200, bajo un voltaje de aceleración de 30 kV en alto vacío, las muestras fueron metalizadas con una capa de oro mediante pulverización catódica utilizando un equipo Quorum Q150R ES. En cuanto al tamaño de las partículas se utilizó un equipo mastersizer Malvern 2000.

La voluminosidad y la densidad de las partículas se determinaron con ayuda del equipo Tap Density JV1000 Copley.

Para la determinación de la humedad de los materiales se utilizó una balanza de humedad Geheka IV-2000.

La caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se hizo en un equipo Shimadzu DSC-60.

La caracterización por difracción de rayos X (DRX) se realizó utilizando un difractómetro PANalytical's X'Pert PRO MRD, con un tubo de rayos X anódico PW3373/00 Cu LFF

DK332001.

Para la elaboración de los comprimidos se utilizó una prensa hidráulica Carver y para la elaboración de la curva de compactabilidad se empleó un durómetro Kraemer HC-6.2.

La cuantificación del extracto en el estudio de liberación se realizó en un equipo HPLC (Agilent Technology modelo 9100) con detector de IR.

5.2.3 Métodos

5.2.3.1 Preparación de diferentes materiales co-procesados y condiciones del secado por aspersión

De manera similar a lo explicado en el capítulo anterior, el material co-procesado se elaboró a partir de las dispersiones etanólicas del polímero seleccionado (HPMC-K15M), el extracto etanólico de frutos de *P. peruviana* con un contenido de sólidos totales de 7,5% y el dióxido de silicio. La incorporación completa de los excipientes y la homogeneidad de la mezcla, se logró agitando magnéticamente durante 60 min antes de la atomización y durante todo el proceso de secado por pulverización, a 1000 rpm. El proceso de secado se realizó de acuerdo a las condiciones seleccionadas en el capítulo 3 y verificadas para el material co-procesado con el polímero, en el capítulo 4.

En la Tabla 5-1 se presentan las composiciones del material co-procesado, en la que se varió la proporción del polímero seleccionado, partiendo de la formulación 3, que fue escogida previamente.

Tabla 5-1 Formulaciones para la elaboración de las diferentes matrices hidrofílicas

Formulación	Extracto (%)	Dióxido de silicio coloidal (%)	HPMC-K15M (%)
3-1	50,0	37,5	12,5
3-2	53,3	40,0	6,7
3-3	55,2	41,4	3,4
3-4	56,1	42,1	1,8

5.2.3.2 Caracterización de los materiales co-procesados

Las dispersiones fueron caracterizadas en cuanto a su viscosidad y a los materiales sólidos obtenidos posterior al secado. Se les evaluó el rendimiento del proceso, el contenido de humedad, el tamaño y distribución de tamaño de partícula, la voluminosidad, la densidad, las propiedades de flujo del material, las características de higroscopicidad y el comportamiento frente a la compresión. La metodología de caracterización fue similar a la empleada en los capítulos 3 y 4, y se presenta de manera resumida a continuación. Para todas las variables se calculó el promedio y la desviación estándar.

▪ Determinación de la viscosidad

Se evaluó a las dispersiones presentadas en la Tabla 5-1, antes del secado, utilizando el viscosímetro Brookfield DV-E con un vástago Spin-05, a una temperatura constante de 20°C. La evaluación se realizó por triplicado.

▪ Rendimiento

El rendimiento se calculó como la relación entre el peso del polvo seco obtenido y el contenido inicial de sólidos presentes en la dispersión a secar.

▪ Contenido de humedad

El contenido de humedad de los polvos se determinó en una balanza de humedad. Las determinaciones se hicieron inmediatamente después de terminar el proceso de secado por aspersión.

▪ Morfología, tamaño y distribución de tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se realizó utilizando un equipo Mastersizer Malvern 2000, cuya técnica de difracción láser está basada en que las partículas dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad, que es dependiente del tamaño

de la partícula (210), para esta determinación se pesó aproximadamente 1 gramo de material y se utilizó como índice de refracción 1,46, el cual corresponde al del dióxido de silicio coloidal (229).

La descripción de la morfología de las partículas se realizó por microcopia electrónica de barrido, siguiendo el procedimiento que se explicó en el capítulo 3 (209).

▪ Índice de Carr

Para este procedimiento se pesó una cantidad de material equivalente a un volumen entre 4 y 5 mL de una probeta de certificada de 5 mL, dejándolo caer libremente y midiendo el volumen ocupado por el mismo. Posteriormente, al material colocado en la probeta, se apisonó dándole 1000 golpes con la ayuda del equipo Tap Density. Finalmente, se midió el volumen ocupado por el mismo. Se efectuaron cinco repeticiones por triplicado para un total de quince datos (21, 210-212).

▪ Propiedades de flujo

Se utilizó el método establecido por Martin et al. (210) y estandarizado por Rodríguez et al. (211-213). Para esta determinación se pesaron 5 g de material y se colocaron dentro de la tolva, luego con ayuda de un vibrador en intensidad 1 se hizo fluir el material a través del embudo, permitiendo que este formara un cono; de forma cuidadosa se midió la altura y el diámetro del cono y se calculó el ángulo de reposo. Se efectuaron cinco repeticiones por triplicado para un total de quince datos.

▪ Higroscopicidad

La higroscopicidad se determinó de acuerdo al método propuesto por Tonon et al. (198) y adaptado por Gallo et al. (171). Se preparó una cámara con una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl), con el fin de obtener una humedad relativa y controlada de 72% HR, a una temperatura de 20°C, en la que se colocaron viales destapados con el extracto seco previamente pesados. Se dejó transcurrir el tiempo hasta alcanzar el equilibrio (264 horas de exposición), para volver a pesar los viales mencionados. Con la variación del peso

obtenido, se calculó la higroscopicidad del material, la cual se expresa como el porcentaje de ganancia de peso. La determinación se hizo por triplicado (216).

▪ **Curva de compactabilidad**

Con el fin de estudiar la capacidad de compactación de las formulaciones, estas fueron comprimidas en una prensa hidráulica (Carver) a diferentes fuerzas (2,5, 5,0, 7,5 y 10,0 kN) durante 5 s. Se utilizaron punzones planos de 14 mm de diámetro. La dureza de cada compacto se determinó como la media de 3 mediciones usando un durómetro.

▪ **Caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se evaluó el comportamiento térmico de las muestras, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Este análisis se realizó al extracto sólo, al coadyuvante de secado, al polímero, a la mezcla física y al extracto seco co-procesado con el coadyuvante de secado. El calentamiento inició a una temperatura aproximada de 25 °C y se llevó hasta 200 °C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min. Las muestras a ser analizadas fueron colocadas en porta muestras de aluminio con tapa y herméticamente cerradas bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 50 mL/min. Los resultados se analizaron usando el programa TA Analysis Software.

▪ **Caracterización por difracción de rayos X (DRX)**

Tanto al extracto, al coadyuvante de secado, al polímero, así como a los co-procesados obtenidos por secado por aspersión se les realizó el análisis de DRX, en donde el tubo de rayos X anódico se operó a 45 kV y 40 mA. Las medidas fueron tomadas en un rango de 0°-100° sobre la escala de 2θ , con una velocidad de barrido de 0,0263° 2θ /s.

▪ **Ensayo *in-vitro* de la inhibición con alfa amilasa**

El ensayo *in-vitro*, se realizó de acuerdo a la metodología de inhibición de alfa amilasa

(Remazol Brilliant Blue) (148), descrita por Hansawasdi-Kawabata (149) y modificada por Rey et al. (150, 151), que se detalla en el Anexo A. El ensayo se realizó con el fin de ver el efecto del secado por aspersión y la inclusión del polímero sobre la actividad del extracto, por lo tanto, este ensayo se le aplicó al extracto seco por aspersión; al co-procesado, obtenido por secado por aspersión, que incluye el extracto y el coadyuvante de secado; al co-procesado del extracto, coadyuvante de secado y polímero; al coadyuvante sólo y al polímero solo, los resultados fueron comparados con un patrón de acarbosa.

Los resultados de estos ensayos *in-vitro* fueron expresados como la media aritmética de los valores \pm la desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante el test de Bomferroni. Para procesar los datos se utilizó Excel 2016.

5.2.3.3 Evaluación del comportamiento y mecanismo de liberación

Para evaluar el comportamiento de liberación y su mecanismo, se elaboraron las tabletas de manera similar a lo explicado en el capítulo 4, partiendo de las formulaciones de los materiales co-procesados de la Tabla 5-1. Cada una de estas formulaciones fue comprimida en una tableteadora hidráulica Carver C, a una presión de 5 kN durante 10 segundos, empleando punzones de 14 mm de diámetro. Se les evaluó la liberación del extracto, la sorción o captación de agua, los frentes de movimiento y la erosión, como se presenta a continuación.

▪ Estudio de liberación del extracto

La evaluación de la liberación del extracto, a partir de las tabletas elaboradas, se realizaron utilizando el aparato de disolución 2 de la USP38 (209), empleando vasos de 150 mL, una velocidad de 100 rpm y 100 mL de medio de disolución a pH de 1,2 durante 2 horas y 6,8 por 6 horas más, simulando las condiciones de pH del tracto gastrointestinal, con muestreos a intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 min. La composición de los medios de disolución se presenta en la Tabla 5-2. La temperatura se mantuvo a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Tabla 5-2 Composición de los medios de disolución a emplear en los ensayos de liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas (209).

Componente	pH 1,2	pH 6,8
KH₂PO₄ (g)	-	6,8
HCl 37% (mL)	7,0	-
NaOH 0,2 N (mL)	-	77,0
NaCl (g)	2,0	-
Agua destilada c.s.p. (L)	1,0	1,0

Para la cuantificación se siguió la metodología analítica validada para los marcadores analíticos fructosa y glucosa, presentes en el extracto de frutos de *P. peruviana*, mediante detección IR; como fase estacionaria se utilizó una columna Aminex® HPX 87H 300 mm x 7,8 mm, 9 µm con una temperatura del horno de 60°C. Para el método se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 0,05 mM. El volumen de inyección fue de 10 µL y el flujo se mantuvo constante a 0,6 mL/min. Cada solución fue filtrada a través de una membrana de 0,45 µm antes de inyectar en el equipo de HPLC.

El análisis cinético del proceso de liberación del extracto se evaluó a partir de los datos de concentración del extracto (marcador) liberado, expresado en porcentaje, en cada intervalo de muestreo en función del tiempo. Los datos de liberación fueron evaluados suponiendo un ajuste a las cinéticas de orden 0 y 1 y a los modelos cinéticos de Higuchi (278), Korsmeyer y Peppas (272) y Peppas y Sahlin (273).

A partir de este tratamiento matemático se determinó él o los modelos de liberación que presentaron mejor ajuste de los datos y se establecieron las constantes de velocidad de liberación correspondientes. El análisis gráfico además buscó detectar y cuantificar posibles tiempos de latencia, alteraciones de velocidad e incluso establecer probables cambios cinéticos ocurridos durante el proceso de liberación del extracto.

A continuación (Tabla 5-3) se presentan los modelos de liberación de Higuchi (278), Korsmeyer et al. (272), Peppas y Sahlin (273), además de las clásicas cinéticas de orden cero y uno, a las que se ajustaron los datos experimentales.

Tabla 5-3 Modelos aplicados para la liberación del extracto a partir de las matrices hidrofílicas

Modelo	Ecuación
Orden cero	$Q_t = Q_0 + k_0 t$
Orden uno	$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 t$
Higuchi	$Q_t = k_H t^{1/2}$
Korsmeyer y Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k' t^n$ $\frac{M_t}{M_\infty} = k_d t^m + k_r t^{2m}$
Peppas y Sahlin	$\frac{R}{F} = \frac{k_r}{k_d} t^m$ $F = \frac{1}{1 + \frac{k_r}{k_d} t^m} \times 100$

Q_t cantidad de marcador liberado en tiempo t ; Q_0 Cantidad inicial de marcador en la matriz; k_0 , k_1 , k_H , k' , k_d y k constantes de velocidad de liberación; n exponente de liberación; m exponente de difusión de Fick; R contribución a la liberación del mecanismo relajacional; F contribución a la liberación del mecanismo difusional.

Con el fin de evidenciar las posibles diferencias o similitudes entre los perfiles de liberación de los sistemas con polímero a las diferentes concentraciones y de estas frente al co-procesado sin polímero, se realizaron comparaciones empleando el factor de diferencia f_1 y el factor de similitud, f_2 , calculados por la Ecuación 5-1 y la Ecuación 5-2, respectivamente.

$$f_1 = \left\{ \frac{\left[\sum_{i=1}^p |R - T| \right]}{\left[\sum_{i=1}^p R \right]} \right\} \times 100$$

Ecuación 5-1

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^q (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} 100 \right\}$$

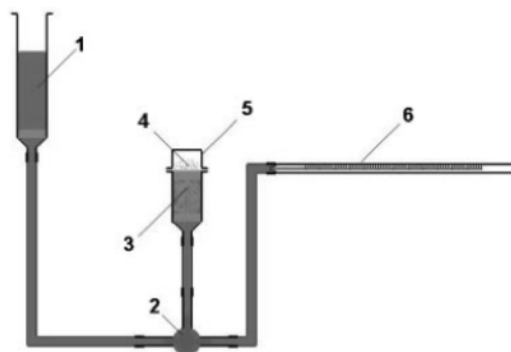
Ecuación 5-2

Donde n es el número de disolución a diferentes tiempos, R_t y T_t son porcentajes de liberación de extracto en cada tiempo. Si el valor de f_2 está comprendido entre 50 y 100 indica similitud entre los perfiles de liberación comparados (261).

▪ Evaluación de la captación de agua

La determinación del comportamiento de captación o sorción de agua se realizó por el método propuesto por Nogami et al., empleando un equipo Enslin modificado, como se presenta en la Figura 5-2 (279).

Figura 5-2 Aparato de Enslin utilizado para la evaluación de la captación de agua (279)



1. Alimentación de agua; 2. Canal de tres vías; 3. Frita; 4. Matriz hidrofílica; 5. Tapón; 6. Pipeta graduada.

El aparato consiste en un sistema de recarga (Figura 5-2, 1) por donde se alimenta al sistema con agua; un canal de tres vías (Figura 5-2, 2); en un extremo una celda que incluye una frita de vidrio (Figura 5-2, 3), sobre la que se pone la tableta o sistema a evaluar (Figura 5-2, 4), que posteriormente se cubre con un tapón de vidrio (Figura 5-2, 5), y en el otro extremo una pipeta graduada (Figura 5-2, 6), colocada horizontalmente al mismo nivel de la base del soporte. Para iniciar el sistema se llenó con agua desde 0 mL (posición de inicio). Posteriormente, la matriz fue puesta sobre la frita en el tiempo 0. La matriz comenzó a capturar agua por capilaridad; el volumen absorbido de agua por la tableta fue medido a intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 300, 360, 420 y 480 minutos. El ensayo se realizó por triplicado en un cuarto a temperatura controlada entre los 20 y 25°C. El cálculo de captación de agua a cada intervalo de tiempo se hizo dividiendo el volumen de agua captado por el peso de la matriz, los datos se presentan como el

promedio y la desviación estándar de cada medida.

▪ Evaluación de la erosión de la matriz

Los estudios de erosión de la matriz fueron realizados de acuerdo al método reportado por Bhise et al. (280), como indican Rao y Devi (281), utilizando el aparato 2 de disolución de la USP38 (209). Las matrices fueron pesadas en una balanza de precisión y colocadas en el aparato de disolución, utilizando 100 mL de medio a pH de 1,2 durante 2 horas y 6,8 en las 6 horas restantes, manteniendo la temperatura a $37 \pm 0,5$ °C y la velocidad de rotación a 100 rpm. Los sistemas matriciales fueron removidos de los vasos de disolución a intervalos de tiempo de 30, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos y secados hasta peso constante en una estufa de aire caliente a 40 °C. El porcentaje de erosión de la matriz fue calculado para los diferentes tiempos (t) mediante la Ecuación 5-3.

$$\text{Erosión de la matriz (\%)} = \frac{W_i - W_t}{W_i} \times 100$$

Ecuación 5-3

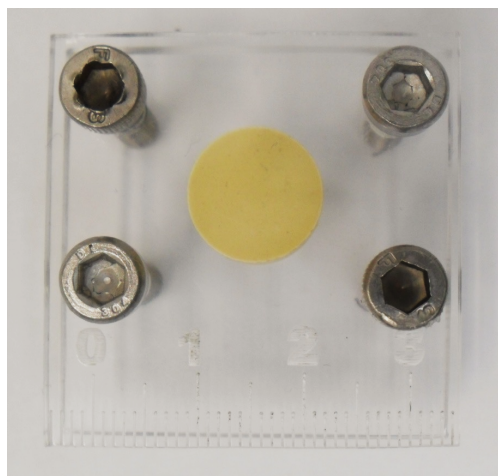
Donde W_i es el peso inicial de la matriz y W_t es el peso de la matriz sujeta a erosión por un tiempo (t) dado.

▪ Estudio de los frentes de movimiento

El estudio de los frentes de movimiento se realizó mediante la fijación de la matriz hidrofílica (Tableta) entre dos placas de acrílico (Figura 5-3), que fueron introducidas en el aparato 2 de disolución de la USP 38 (209), empleando 900 mL de medio de disolución a pH 1,2 durante 2 horas y 6,8 en las 6 horas restantes, a 37°C, con una velocidad de agitación de 100 RPM, como fue reportado por Colombo et al. (246). A diferentes intervalos de tiempo (10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos), las matrices fueron fotografiadas, manteniendo una distancia de la cámara de 15 cm durante la medición. Se utilizó una cámara digital, configurada en modo "Smart" y con una calidad de imagen de 2,0 megapíxeles; el montaje se hizo fuera el equipo de disolución, manteniendo la misma distancia focal en todas las fotografías. Para medir los frentes de movimiento se utilizó el

software Motic Image Plus 2.0, trazando una circunferencia sobre cada uno de los frentes de movimiento, el software arroja los datos del diámetro de la circunferencia dibujada (282).

Figura 5-3 Dispositivo de acrílico utilizado para la medición de los frentes de movimiento



La posición de los frentes de hinchamiento (r_h), de difusión (r_d) y de erosión (r_e) se determinaron a partir de la diferencia entre el límite del frente de movimiento correspondiente (r_h , r_d y r_e) y el radio inicial de la tableta en el tiempo 0 (r_0), es decir, $r_h - r_0$, $r_d - r_0$ y $r_e - r_0$, respectivamente, de acuerdo a la Figura 5-1.

5.3 Resultados y discusión de resultados

5.3.1 Preparación y caracterización de los materiales co-procesados

Los materiales co-procesados con el polímero HPMC K15M en las diferentes concentraciones, corresponden a sólidos de color amarillo claro, con un olor característico a uchuva. Los resultados de las propiedades evaluadas, de acuerdo a lo planteado en la metodología, se resumen en la Tabla 5-4 y se compararon con el extracto seco, sin polímero, obtenido y caracterizado en el capítulo 3.

Tabla 5-4 Propiedades de los diferentes materiales co-procesados obtenidos por secado por aspersión para el polímero HPMC K15M.

F	VM (cps)		RP (%)		CH (%)		TP (µm)		IC (%)		AR (°)		HG (%)	
	Prom.	Desv.	Prom.	Desv.	Prom.	Desv.	Prom.	Desv.	Prom.	Desv.	Prom.	Desv.	Prom.	Desv.
1	35	4,6	68,1	2,0	1,5	0,3	2,45	0,07	18,8	0,4	36,67	1,35	10,6	1,9
3-1	167	11,6	64,8	2,7	1,5	0,4	2,85	0,20	22,3	2,1	33,88	1,33	14,3	0,4
3-2	59	4,6	68,3	0,3	1,9	0,4	2,64	0,06	23,0	1,8	36,57	1,02	14,1	0,8
3-3	45	4,6	69,5	1,5	1,7	0,1	2,56	0,02	25,0	2,6	36,69	1,27	14,1	0,1
3-4	39	2,3	74,0	1,7	1,5	0,1	2,33	0,10	23,6	2,3	34,55	2,04	14,6	0,3

Formulación: **1.** Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%; **3-1.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **3-2.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 53,3%:40,0%:6,7%; **3-3.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%; **3-4.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%; **VM** : Viscosidad de las muestras; **RP** : Rendimiento del proceso; **CH** : Contenido de humedad; **TP**: Tamaño de partícula; **IC** : Índice de Carr; **AR** : Angulo de reposo; **HG** : Higroscopicidad. Promedio ± desviación estándar.

De los resultados de la Tabla 5-4 se pueden derivar los siguientes análisis, de acuerdo a los diferentes parámetros evaluados.

5.3.1.1 Viscosidad y rendimiento

Al observar la Tabla 5-4, se encuentra que a medida que aumenta la concentración del polímero hay un aumento de la viscosidad de la mezcla, produciendo una ligera disminución en el rendimiento del proceso. Esta disminución, de manera similar a la presentada en el capítulo 3, se debe a que a una mayor viscosidad de la dispersión se presenta un aumento de la cantidad de sólidos depositados en las paredes del cilindro de secado, disminuyendo la proporción de material seco que llega al vaso de recolección (198). Comparando el resultado de viscosidad y rendimiento de las formulaciones 3-1 a 3-4 con el obtenido para la formulación 1, la cual no contiene polímero (Rendimiento: 68,1%), se puede observar que las formulaciones con polímero tienen un rendimiento entre 64,8 y 74,0% que son muy próximos al valor de rendimiento de la formulación 1, lo que sugiere que la adición del polímero aumenta la viscosidad, pero no afecta aparentemente el rendimiento del proceso ya que se obtienen valores no tan diferentes.

5.3.1.2 Contenido de humedad

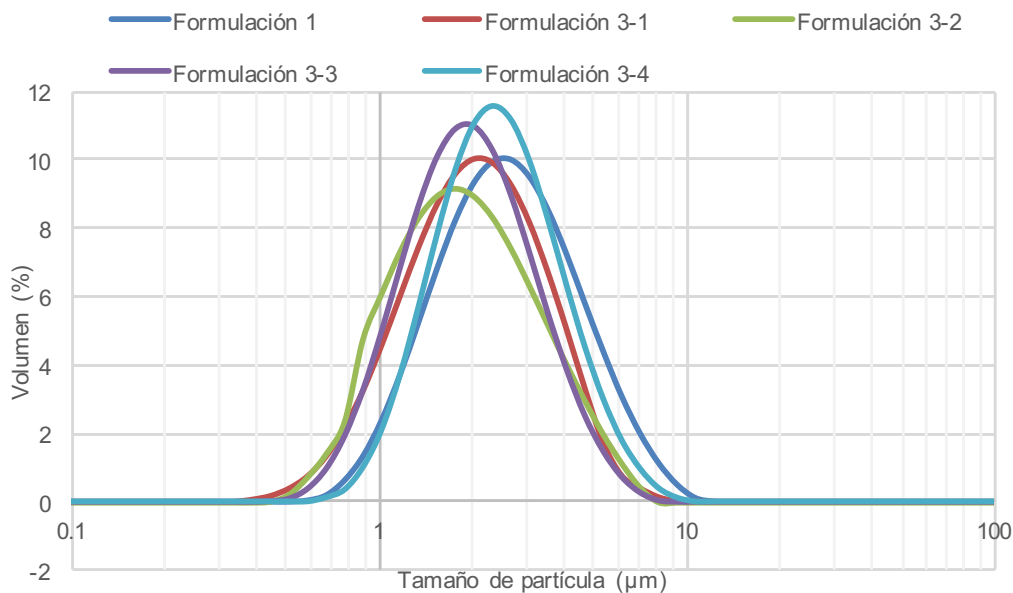
El contenido medio de humedad de los materiales sólidos oscilaron entre 1,5 y 1,9%, que aunque es un valor bajo, que podría afectar las propiedades de fluidez y la compresibilidad de los materiales obtenidos (175, 226), es un valor esperado dadas las condiciones de secado y en especial a que el medio dispersión del extracto es alcohol USP, que tiene un bajo contenido de agua. Bajo las condiciones de evaluación, no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa, si se comparan estos resultados con los obtenidos para la formulación 1, que no contiene el polímero.

5.3.1.3 Morfología, tamaño y distribución de tamaño de partícula

Los resultados para cada material mostraron una distribución de tamaño de partícula normal en escala logarítmica, unimodal (Figura 5-4) y un diámetro medio de partícula entre 2,33 y 2,85 μm (Tabla 5-4). Al tratarse de una distribución unimodal indica que sólo hay un tamaño de partícula que corresponde al de mayor frecuencia, como se observa en la Figura 5-4. Las formulaciones evaluadas presentaron valores del coeficiente de dispersión de tamaño de partícula (Span) entre 1,285 y 1,604, siendo la formulación 3-4 la que presentó una menor dispersión.

En este estudio, las condiciones de funcionamiento del equipo de secado por aspersión son las mismas para todos los experimentos, por lo que las diferencias en el tamaño de partícula obtenido se atribuirían a las condiciones iniciales de concentración del polímero. Al subir su concentración se genera una elevación de la viscosidad de la suspensión por el aumento de los sólidos dispersos en cada gota, observándose una clara tendencia a la obtención de partículas de tamaños mayores. Sin embargo, los valores de tamaño de partícula son pequeños para todas las muestras (2,33 – 2,85 μm), lo que podría deberse al uso de etanol como solvente orgánico en la dispersión atomizada, que como se explicó antes, tiende a formar gotículas pequeñas debido a su baja tensión superficial (22,75mN / m a 20°C; etanol / vapor) (227).

Figura 5-4 Distribución del tamaño de partícula para las diferentes formulaciones.

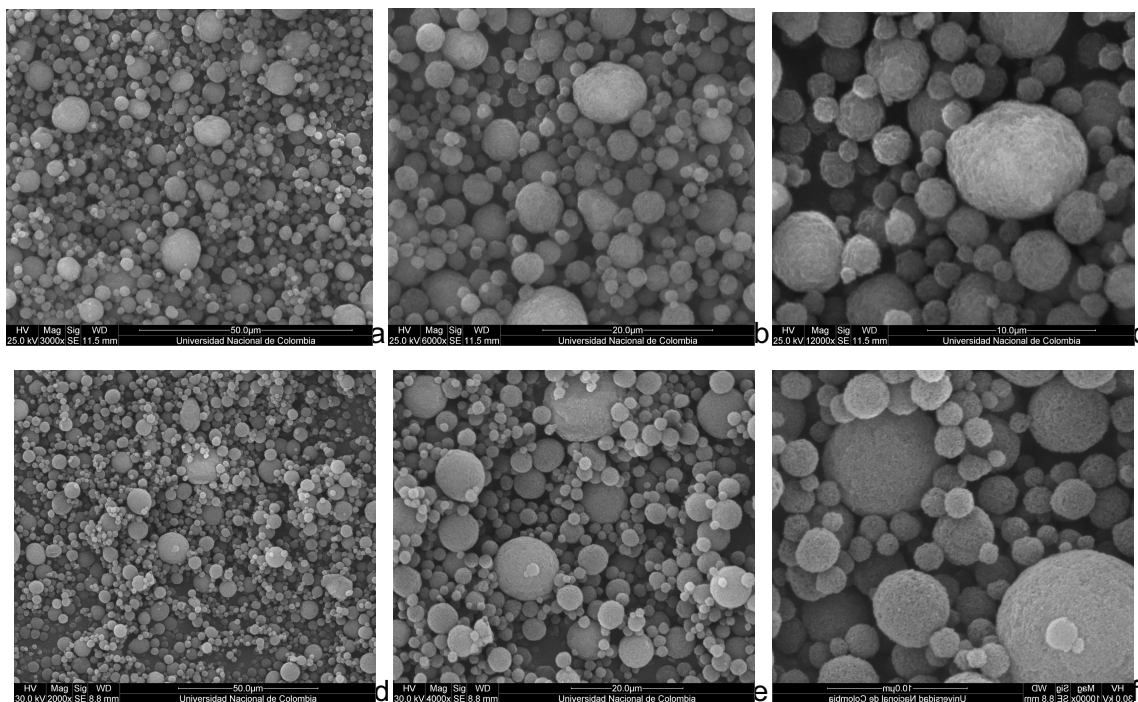


Formulación: 1. Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%: 3-1. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50%:37,5%:12,5%; 3-2. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 53,3%:40%:6,7%; 3-3. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%; 3-4. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%. Span Formulación 1: 1,604; Formulación 3-1: 1,426; Formulación 3-2: 1,612; Formulación 3-3: 1,350 y Formulación 3-4: 1,285.

En cuanto a la morfología de las partículas y características de superficie, en la Figura 5-5 se muestran las microfotografías de SEM de la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%) y de la formulación 1 (Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%), a manera de ejemplo, ambas muestran que la forma de las partículas son esféricas y en términos generales, no se observan diferencias relacionadas con la influencia de la presencia del polímero.

La forma esférica de las partículas es característica de los productos obtenidos a través de secado por aspersión (62, 171, 175, 222). Las partículas exhiben una superficie rugosa, asociada a la presencia de pequeñas partículas de SiO₂ que se encuentran en suspensión sobre la superficie de las gotículas que se forman durante el proceso de secado, siendo más esféricas y menos rugosas aquellas formulaciones que contienen polímero, posiblemente debido a la menor proporción de dióxido de silicio en estas últimas.

Figura 5-5 Microfotografías SEM.



a. Ex:SiO₂ 57,1%:42,9% 3000x; b. Ex:SiO₂ 57,1%:42,9% 6000x; c. Ex:SiO₂ 57,1%:42,9% 12000x; d. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% 3000x; e. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% 6000x; f. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% 12000x

Resultados similares han sido reportados en varios estudios (62, 283, 284). De acuerdo con Gallo et al. (62), las formas corrugadas están generalmente asociadas con partículas menos cohesivas y más dispersables, por lo que una superficie más lisa, sumado a la forma esférica, podría constituir una ventaja a la hora de tener procesos de compresión directa, como los requeridos en este trabajo. Esta característica y la posible presencia de SiO₂ en la superficie de las partículas podrían ser responsables de la buena fluidez encontrada para polvos co-procesados (178).

5.3.1.4 Propiedades de flujo

De acuerdo con la USP 38-NF 33 (209), un material con ángulo de reposo entre 25° y 30° indica que posee un excelente flujo, entre 31° y 35° el flujo se puede considerar bueno, y dentro del rango de 36° a 40° el flujo es regular. Para valores superiores a 41°, el polvo tiene malas propiedades de flujo. El ángulo de reposo obtenido para los diferentes

materiales, estuvo entre 33,88° y 36,69°, lo que indica que estos poseen un flujo entre bueno y regular.

En cuanto al índice de Carr (IC) (Tabla 5-4), los valores de 10% indican un excelente flujo, entre el 11 y el 15% indican una buena fluidez, entre el 16 y el 20% denotan flujo favorable, entre el 21 y el 25% indican flujo aceptable, y entre el 26 y el 31% son una indicación de mala fluidez. Según los resultados obtenidos, los materiales poseen un flujo aceptable (22 al 25%). Este comportamiento de las propiedades de flujo de las formulaciones evaluadas puede deberse a la forma y el tamaño de partícula, ya que aunque una forma esférica favorece el flujo, este puede verse disminuido por el exceso de tamaños de partícula pequeños, que aumentan las fuerzas rozamiento del material generando este detrimento en el flujo (23, 210). Si se comparan los resultados de las formulaciones con polímero respecto al co-procesado del extracto con el dióxido de silicio coloidal (Formulación 1), la fluidez medida por ángulo de reposo, muestra algunos resultados ligeramente menores a los presentados por la formulación 1, las diferencias no son estadísticamente significativas, mostrando que aparentemente no cambia este comportamiento al incluir el polímero. El IC, por el contrario, aumentó ligeramente su valor, presentando una desmejora en la fluidez. Es de aclarar que si bien ambas medidas son una evaluación de la cohesión de las partículas, como medida indirecta de la fluidez, el fundamento de cada una es diferente y la información que brindan es complementaria. Sin embargo, aunque no se tienen las mejores propiedades de flujo en los materiales, estas resultan adecuadas para un procesamiento por compresión directa (285, 286), como se presenta más adelante.

5.3.1.5 Higroscopicidad

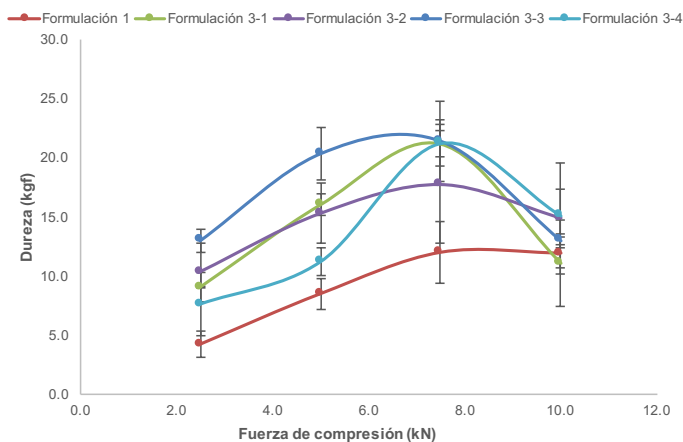
Una de las características del extracto de *P. peruviana* es que este posee una alta higroscopicidad (tipo III), dificultando su manejo tecnológico (26). Los resultados de higroscopicidad de las formulaciones que incluyen el polímero se encuentran entre 14,00 y 14,56%, que son mayores a la del co-procesados sin el polímero (formulación 1: Ex:SiO₂ 57,1% : 42,9%), que posee una higroscopicidad de 10,58%. Esta diferencia es debida a la adición del HPMC, que le confiere una mayor hidrofiliidad a la mezcla, dado que, en su estructura molecular cuenta con gran cantidad de grupos metoxilo e hidroxipropoxilo, aspecto que le permite generar puentes de hidrógeno en presencia de agua (229). Es de aclarar que aunque hay un aumento en la higroscopicidad debido a la adición del polímero,

se pueden considerar que todos los materiales evaluados se clasifican como de clase II (ligeramente higroscópicos), de acuerdo a la escala de Callahan (169), lo cual resulta adecuado para la aplicación aquí buscada, pues una baja higroscopicidad favorece el comportamiento de fluidez del material y la estabilidad del extracto.

5.3.1.6 Evaluación de la compactabilidad

Las formulaciones fueron sometidas al test de compactabilidad, en donde se evalúa la dureza de los comprimidos en función de la fuerza de compresión. De acuerdo a estos resultados (Figura 5-6), se puede observar que para las formulaciones que incluyen el polímero (3-1 a 3-4), para todas las fuerzas de compresión ensayadas, se encontró una dureza que estaba por encima de 5 kgf (mínima dureza requerida para una tableta), lo que indica que el material co-procesado con el polímero es adecuado para la compresión directa (170, 234, 287, 288).

Figura 5-6 Curva de compactabilidad



Formulación: 1. Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%; 3-1. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50%:37,5%:12,5%; 3-2. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 53,3%:40%:6,7%; 3-3. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%; 3-4. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%.

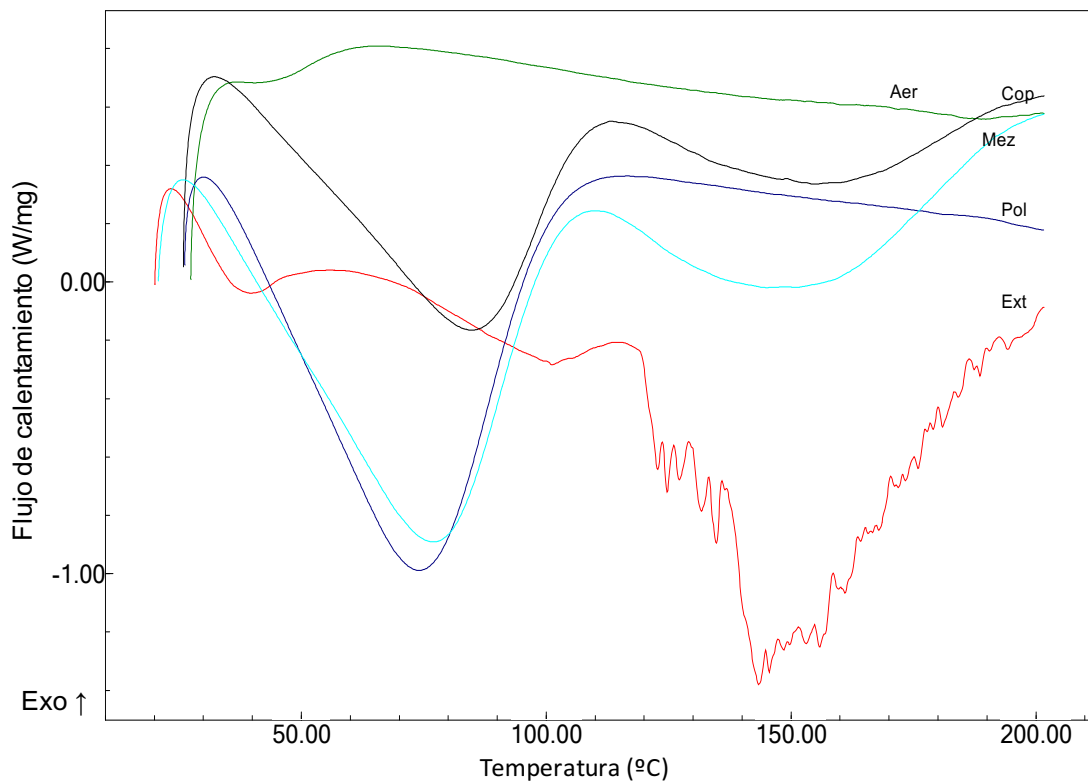
La formulación 1, que no tiene el polímero, requiere de fuerzas de compresión mayores a 7 kN para obtener comprimidos con una dureza deseada (10 kgf). Las formulaciones con polímero (HPMC) presentan un mejor comportamiento frente a la compresión, puesto que con una fuerza de compresión baja alcanzan la dureza requerida, llegando incluso a valores por encima de 20 kgf. Se destaca la Formulación 3-3, la cual exhibe un

comportamiento en donde se destaca que a menor fuerza de compresión se alcanzan valores de dureza más altos. Sin embargo, es importante señalar que para todas las formulaciones se obtuvieron las tabletas por compresión directa, sin presentar problemas de laminación o adherencia a la matriz y a los punzones.

5.3.1.7 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

De manera similar a lo explicado en el capítulo 3, se realizó este ensayo con el fin de evidenciar las transiciones térmicas del co-procesado (Formulación 3-3, a manera de ejemplo), en comparación con cada uno de los materiales constituyentes de este (HPMC K15M, dióxido de silicio coloidal y el extracto), cuyos resultados se muestran en la Figura 5-7.

Figura 5-7 Termogramas DSC



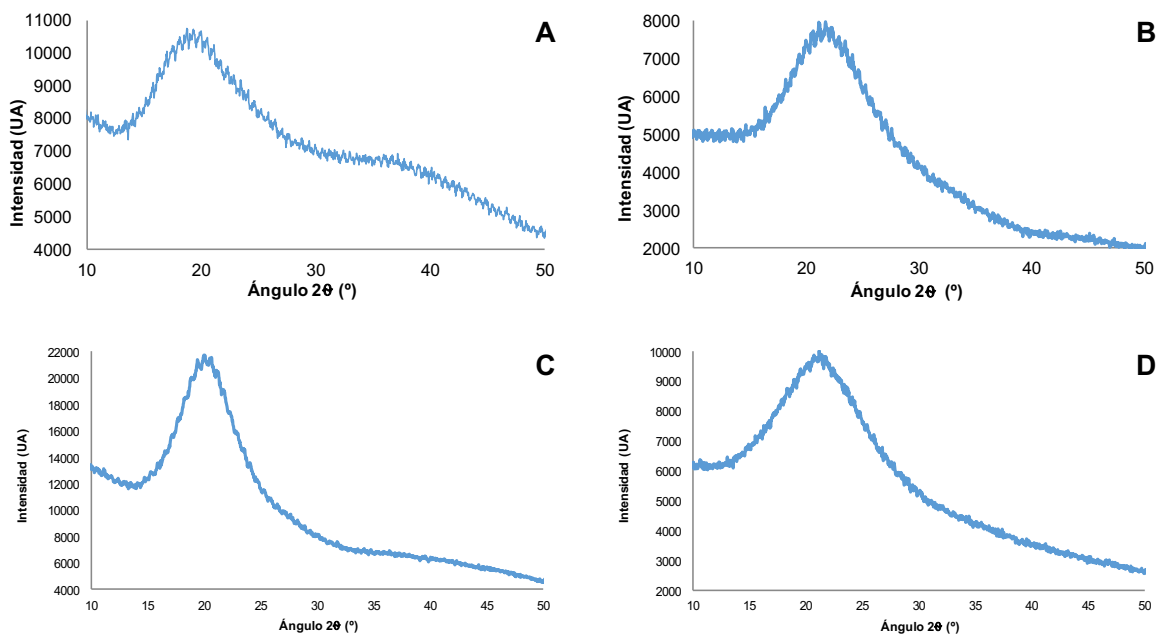
Ext: Extracto; **Aer:** Dióxido de silicio; **Pol:** Polímero HPMC-K15M; **Mez:** Mezcla física entre el extracto y dióxido de silicio; **Cop:** Co-procesado de extracto + dióxido de silicio + HPMC-K15M (formulación 3-3).

De acuerdo al termograma, se observa que el extracto a temperaturas superiores de 120°C comienza un proceso de descomposición y presenta una pérdida de agua alrededor de los 40°C, como ya se explicó en el Capítulo 3. En el polímero la temperatura de pérdida de agua (humedad del polímero) se da entre 70°C y 80°C, posiblemente debido a la formación de puentes de hidrógeno agua - polímero. La mezcla física, corresponde a la suma de los termogramas de cada uno de los componentes que hacen parte del co-procesado (extracto seco + dióxido de silicio + HPMC-K15M), evidenciando la compatibilidad entre estos materiales. En el material co-procesado (extracto + dióxido de silicio + HPMC-K15M), se da un desplazamiento de la temperatura de pérdida de agua a un valor entre 80 y 90°C. Este comportamiento podría deberse a que durante el secado, el extracto queda rodeado, además de las partículas de dióxido de silicio, del polímero, que como se dijo al ser hidrofílico podría generar puentes de hidrógeno más fuertes con el extracto, requiriendo mayores temperaturas para que se dé la pérdida de agua (229). Este comportamiento fue similar para las demás formulaciones evaluadas.

5.3.1.8 Caracterización por difracción de rayos X (DRX)

Los resultados de la caracterización por DRX se muestran en la Figura 5-8. En este ensayo, de manera similar a lo explicado en el capítulo 3, se llevaron a cabo las mediciones de difracción de rayos X para el extracto seco, el dióxido de silicio coloidal, el polímero de HPMC-K15M y el co-procesado correspondiente a la Formulación 3-3, a manera de ejemplo (extracto seco + dióxido de silicio + HPMC-K15M), con el fin de evaluar su cristalinidad. Todas las muestras evaluadas revelaron un estado amorfo, que se caracterizó por la presencia de señales anchas no definidas con abundante ruido. Un estado amorfo podría aumentar la velocidad de disolución del extracto (210) lo que es favorable para el desarrollo del sistema de liberación modificada tipo matriz hidrofílica, en especial en lo que se refiere al mecanismo de liberación por difusión que se puedan estar dando, lo que se explica de manera más detallada en el siguiente apartado.

Figura 5-8 Difractogramas de rayos X (DRX).



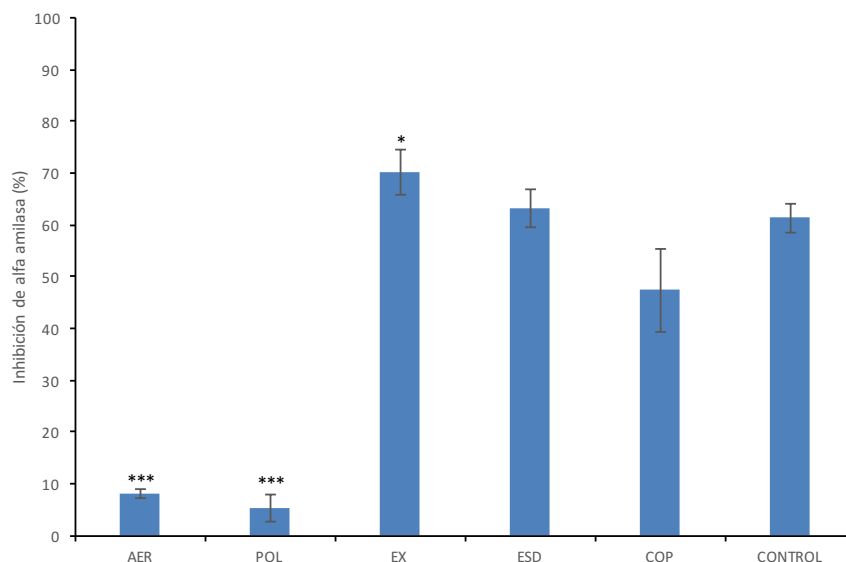
A: Extracto; B: Dióxido de silicio; C: Polímero HPMC-K15M; D: Co-procesado extracto seco + dióxido de silicio + HPMC-K15M (formulación 3-3).

5.3.1.9 Ensayo *in-vitro* de la inhibición con alfa amilasa

Los resultados del ensayo *in-vitro* de inhibición de alfa amilasa se muestran en la Figura 5-9, donde el efecto inhibitorio del extracto se comparó con acarbosa como control positivo.

De acuerdo con estos resultados, al parecer el dióxido de silicio y el polímero de HPMC-K15M no presentan interferencias con el ensayo. Los extractos que se secaron por aspersión con coadyuvante de secado y sin coadyuvante de secado y el co-procesado para la formulación de matrices hidrofílicas, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el efecto inhibitorio, en comparación con la acarbosa. Lo anterior es indicativo de que el co-procesamiento por el método de secado por aspersión y la presencia de excipientes, como el HPMC, no afectan la actividad observada en el extracto etanólico de frutos *P. peruviana*.

Figura 5-9 Ensayo de actividad inhibición de alfa amilasa *in-vitro*.



AER: Dióxido de silicio (SiO₂); **POL:** HPMC-K15M; **EX:** Extracto seco por aspersión; **ESD:** Co-procesado de extracto + dióxido de silicio coloidal seco por aspersión; **COP:** Co-procesado de extracto + dióxido de silicio coloidal + HPMC-K15M seco por aspersión; **CONTROL:** Acarbosa como control positivo. Promedio ± S.D.; n= 3 por grupo. test de Bonferroni, * p<0,05; ***p<0,001

5.3.2 Evaluación del comportamiento y mecanismo de liberación

Los resultados de los estudios de liberación, de captación de agua, de evaluación de frentes de movimiento y de erosión de la matriz realizados a las matrices hidrofílicas elaboradas a partir Ex:SiO₂:HPMC-K15M, se explican detalladamente a continuación. Para tal fin, se mantuvo constante la proporción del extracto etanólico de frutos de *P. peruviana* (Ex) y del dióxido de silicio (SiO₂) y se varió la proporción del polímero de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC-K15M).

5.3.2.1 Estudio de liberación del extracto

En la Figura 5-10, se presentan los perfiles de liberación del extracto de *P. peruviana* (expresado como el marcador analítico cuantificado, glucosa o fructosa). De acuerdo a estos resultados, se puede decir que la formulación 3-1, correspondiente a la proporción

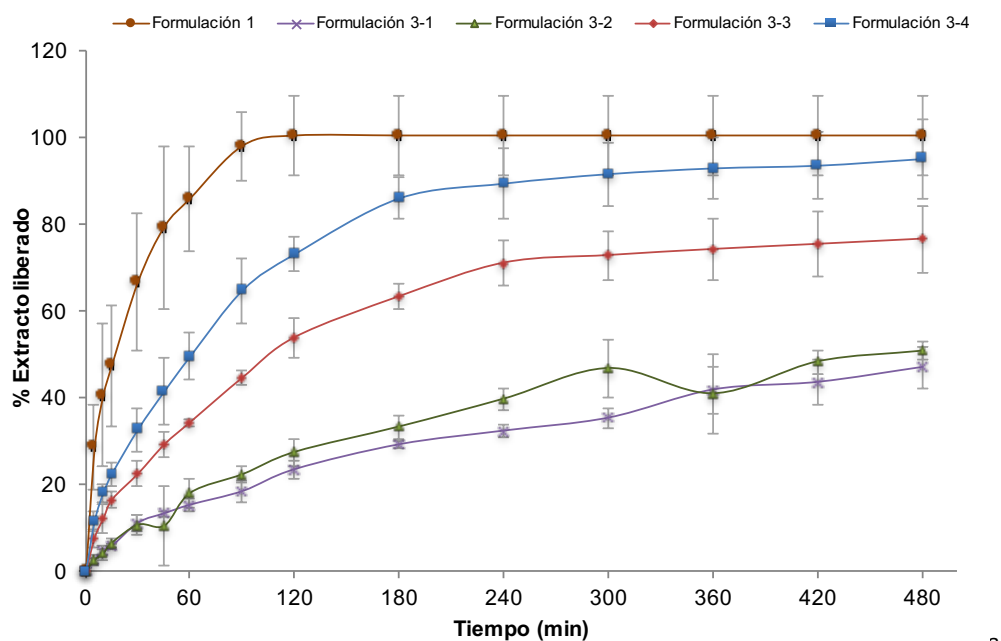
Ex:SiO₂:HPMC-K15M (50%:37,5%:12,5%), no permite la liberación completa del extracto en el lapso de tiempo evaluado (8 horas), mientras que la formulación 1, que no contiene polímero (Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%) no controla la liberación, permitiendo la liberación completa del extracto antes de los 120 minutos de estudio. Adicionalmente, se puede evidenciar en la misma figura que el porcentaje de extracto liberado disminuye al aumentar la concentración del polímero, lo que podría atribuirse a un aumento de la viscosidad de la capa de gel que se forma durante el proceso de liberación (245, 255, 257, 266). Algunos autores han encontrado que un aumento en el porcentaje de polímero (de 3,5% a 19,2%) en la matriz corresponde a una disminución en la velocidad de liberación de principios activos (289, 290). En estos estudios se explica que un aumento en el porcentaje de polímero provoca un mayor grado de reticulación de las cadenas laterales del polímero, que a su vez aumenta la viscosidad y por lo tanto la concentración de la capa gel y su tortuosidad, que son las características principales que disminuyen la difusión del activo a través de esta (290).

En la Tabla 5-5 se muestran los parámetros para cada modelo de liberación evaluado, junto con el coeficiente de determinación (R^2) empleado para evaluar el grado de ajuste a cada uno de ellos. Es necesario aclarar que, los modelos de Higuchi, de Korsmeyer y Peppas y de Peppas y Sahlin son aplicables teniendo en cuenta los datos hasta un 60% del total del extracto liberado (272). Sin embargo, para la formulación 3-4 este valor se alcanza en los primeros 15 minutos del estudio de liberación (comportándose casi como un sistema de liberación inmediata), por lo que los resultados de aplicar estos modelos serían parcialmente confiables para este caso (272, 273, 278).

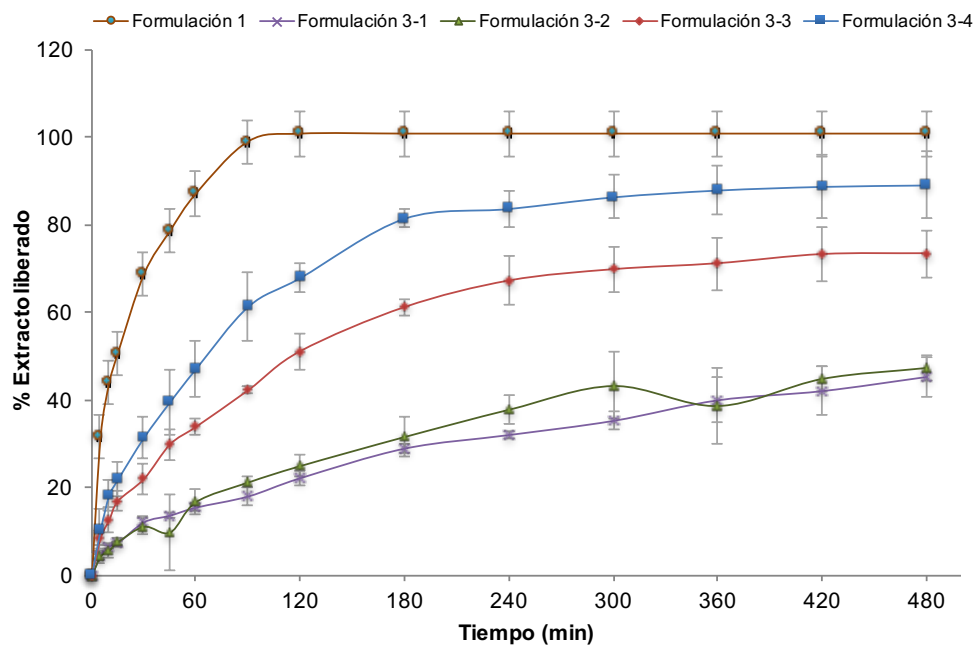
Las formulaciones 3-1 y 3-2 alcanzan un 45% de liberación durante el tiempo de estudio, lo que significaría que requiere de un mayor tiempo para alcanzar el cien por ciento de la liberación y dentro de los parámetros de este estudio estas formulaciones no cumplirían con lo requerido para el producto que se pretende desarrollar. Por el contrario, la formulación 3-3, presenta un comportamiento intermedio en cuanto a modulación de la liberación, por lo que se analizará en detalle los resultados correspondientes.

Los resultados de liberación de la formulación 3-3, presentan un mejor ajuste a los modelos de Korsmeyer y Peppas y Peppas y Sahlin ($R^2 = 0,9986$ y $0,9987$ para la fructosa y $R^2 = 0,9975$ y $0,9971$ para la glucosa).

Figura 5-10 Gráficas del perfil de liberación del extracto de frutos de *P. peruviana* a partir de las diferentes formulaciones evaluadas



a



b

a. Perfil de liberación del extracto cuantificando a partir de fructosa; b. Perfil de liberación del extracto cuantificando a partir de glucosa. Promedio \pm dev. est. **Formulación: 1.** Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%: **3-1.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **3-2.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 53,3%:40,0%:6,7%; **3-3.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%; **3-4.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%.

Tabla 5-5 Parámetros y coeficientes de determinación para cada uno de los modelos cinéticos de liberación estudiados en las diferentes formulaciones de las matrices hidrofílicas

Modelo	Parámetro	Formulación 3-1		Formulación 3-2		Formulación 3-3		Formulación 3-4	
		Fructosa	Glucosa	Fructosa	Glucosa	Fructosa	Glucosa	Fructosa	Glucosa
Orden 0	k_0 (%/min)	0,090	0,084	0,1000	0,0920	0,1700	0,1800	0,1700	0,1600
	R^2	0,9479	0,9559	0,9025	0,9107	0,8219	0,8252	0,7680	0,7688
Orden 1	k_1 (min ⁻¹)	0,0012	0,0011	0,0014	0,0013	0,0041	0,0046	0,0063	0,0047
	R^2	0,9758	0,9793	0,9348	0,9376	0,9376	0,9561	0,9400	0,9056
Higuchi	k_H (min ^{-1/2})	2,0511	0,0210	0,0220	0,0211	0,0443	0,0436	0,1300	0,1400
	R^2	0,9781	0,9933	0,9268	0,9530	0,9877	0,9947	0,9920	0,09982
Korsmeyer-Peppas	k' (min ⁻ⁿ)	1,264	0,0022	0,0079	0,0127	0,0312	0,0268	0,1600	0,1500
	n	0,6065	0,4812	0,7423	0,6198	0,5892	0,5428	0,4200	0,4600
	R^2	0,9946	0,9939	0,9832	0,9705	0,9986	0,9975	0,9996	0,9993
Peppas and Sahlin	K_d (min ^{-0,43})	1,524	0,0231	0,0070	0,01432	0,0339	0,0401	0,1600	0,1500
	K_r (min ^{-0,86})	0,179	0,0060	0,0036	0,0022	0,0044	0,0031	0,00063	0,0035
	R^2	0,9922	0,9936	0,9832	0,9734	0,9987	0,9971	0,9996	0,9993

Formulación 3-1. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50,0%:37,5%:12,5%; **3-2.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 53,3%:40,0%:6,7%; **3-3.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%; **3-4.** Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%; k_0 ; k_1 ; k_H ; K_P , K_{H-P} , K_d , K_r constantes de velocidad de liberación; R^2 coeficiente de determinación, n ; exponente

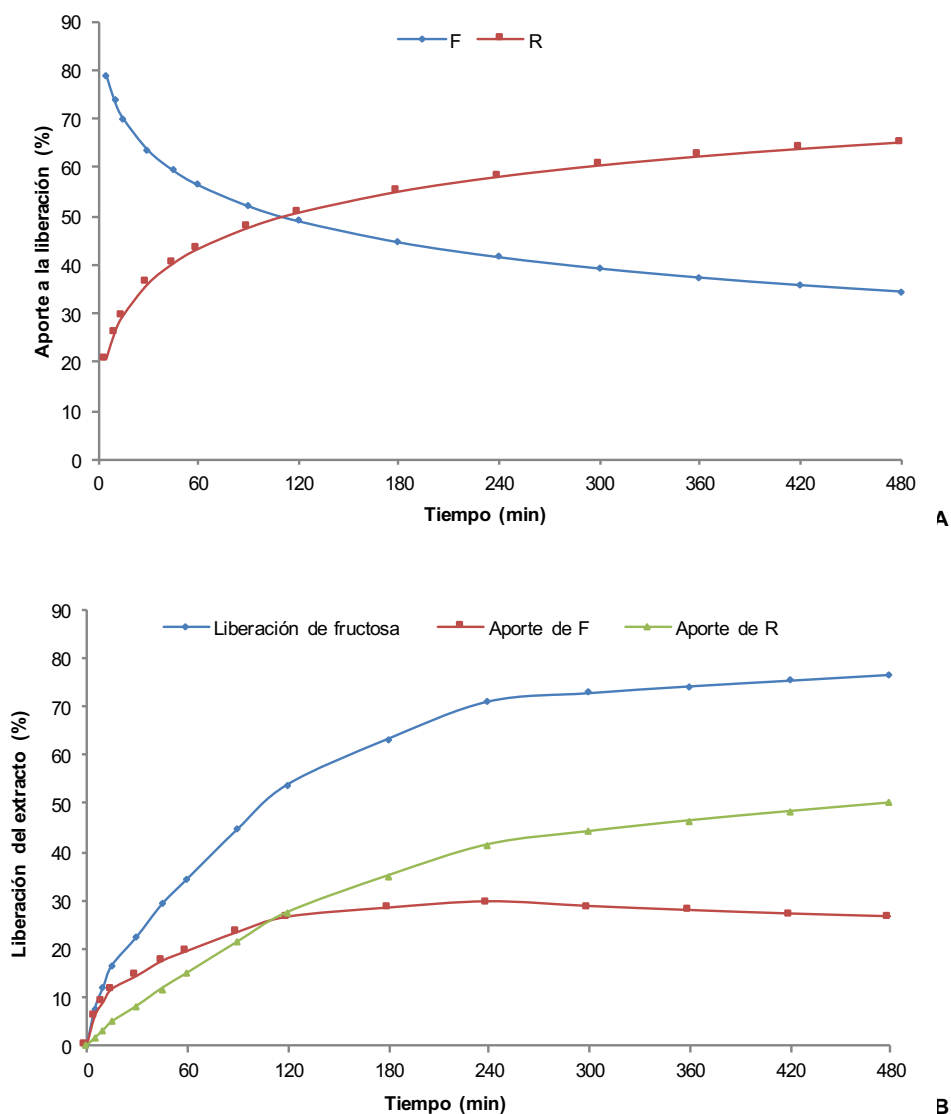
Para la formulación mencionada, considerando el modelo de Korsmeyer y Peppas el valor de n obtenido fue de 0,5892 y 0,5428 para fructosa y glucosa, respectivamente. Valores de n entre 0,5 y 1,0 pueden ser considerados como un indicador de liberación por transporte anómalo en donde hay superposición de dos fenómenos, liberación del extracto por difusión de Fick y relajación-erosión del polímero (245, 257, 272, 291).

Esto se confirma con el modelo Peppas y Sahlin; tomando como ejemplo la liberación de la fructosa, se construyó una gráfica del aporte de la difusión de Fick y de la erosión-relajación del polímero a la liberación del extracto (Figura 5-11), aplicando la Ecuación 5-4. En esta ecuación, F es el aporte de la difusión, k_r es la constante de velocidad de erosión-relajación, k_d es la constante de velocidad de difusión, t el tiempo y m el exponente de difusión de Fick, el cual corresponde a 0,43 de acuerdo a la geometría de la matriz estudiada (273).

$$F = \frac{1}{1 + \frac{k_r}{k_d} t^m} \times 100$$

Ecuación 5-4

Figura 5-11 Gráficas del modelo de Peppas y Sahlin aplicado a cada uno de los tiempos de muestreo del perfil de liberación de fructosa de la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2 : 41,4 : 3,4)



A: Aporte de la liberación por fenómenos de difusión y erosión-relajación para la fructosa; **B:** Perfil de liberación para la fructosa incluyendo el aporte de los fenómenos de difusión y erosión-relajación; **F:** Contribución a la liberación del extracto por difusión de Fick; **R:** Contribución a la liberación de la relajación-erosión del polímero

Conforme a estos resultados, se encontró que al iniciar el proceso de liberación, este es predominantemente dominado por la difusión de Fick la cual es responsable de cerca del 80% de la liberación de fructosa. Al transcurrir el tiempo, la erosión-relajación del polímero va tomando mayor importancia en la liberación total del extracto, hasta que a los 120

minutos aproximadamente, alcanza el 50% del aporte de la liberación de este. Hacia el final del estudio de liberación, el mecanismo por erosión-relajación del polímero se hace más importante, en donde es el encargado del 65% de la liberación de fructosa, mientras que la difusión de Fick solo es responsable del 35% de la liberación. Esto es acorde al proceso de liberación que se da en matrices hidrofílicas explicado en el marco conceptual de este capítulo (245).

De acuerdo a lo mencionado en la metodología, con el objetivo de evidenciar si los perfiles de liberación son estadísticamente diferentes o no, se determinó el factor de diferencia, f_1 , y el factor de similitud, f_2 , cuyos resultados se presentan en la Tabla 5-6.

Tabla 5-6 Factor de similitud para comparación de perfiles en el estudio de liberación del extracto

Comparación	f_1 fructosa	f_1 glucosa	f_2 fructosa	f_2 glucosa
Formulación 1 : Formulación 3-1	69,05 ^b	67,43 ^b	20,04 ^d	11,06 ^d
Formulación 1 : Formulación 3-2	66,32 ^b	65,76 ^b	22,90 ^d	11,66 ^d
Formulación 1 : Formulación 3-3	45,00 ^b	43,26 ^b	34,87 ^d	20,61 ^d
Formulación 1 : Formulación 3-4	29,81^a	29,00^a	64,01^c	64,99^c
Formulación 3-1 : Formulación 3-2	9,41^a	5,62^a	61,93^c	73,28^c
Formulación 3-1 : Formulación 3-3	45,89 ^b	44,44 ^b	34,15 ^d	31,50 ^d
Formulación 3-1 : Formulación 3-4	40,68 ^b	41,37 ^b	22,01 ^d	33,48 ^d
Formulación 3-2 : Formulación 3-3	56,80 ^b	54,90 ^b	40,62 ^d	21,73 ^d
Formulación 3-2 : Formulación 3-4	52,85 ^b	52,52 ^b	25,26 ^d	22,97 ^d
Formulación 3-3 : Formulación 3-4	31,99 ^b	30,37 ^b	39,44 ^d	43,47 ^d
Formulación 3-1 Fructosa vs. Glucosa	4,77^a			78,02^c
Formulación 3-2 Fructosa vs. Glucosa	2,69^a			80,60^c
Formulación 3-3 Fructosa vs. Glucosa	3,74^a			80,11^c
Formulación 3-4 Fructosa vs. Glucosa	0,35^a			72,90^c

Formulación: 1. Ex:SiO₂ 57,1%:42,9%; 3-1. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50%:37,5%:12,5%; 3-2. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 53,3%:40%:6,7%; 3-3. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%; 3-4. Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%; a. Perfiles no diferentes ($f_1 = 0-30$); b. Perfiles diferentes ($f_1 = 30-100$); c. Perfiles similares ($f_2 = 50-100$); d. Perfiles no similares ($f_2 = 0-50$).

Comparando las formulaciones que contienen el polímero (Formulaciones 3-1 a 3-4) frente al co-procesado con el extracto sin polímero (Formulación 1), se observa que la formulación 3-4, correspondiente a la composición Ex:SiO₂:HPMC-K15M (56,1 : 42,1 : 1,8), presenta valores de f_1 de 29,81 y 29,00 y de f_2 de 64,01 y 64,99 para fructosa y glucosa,

respectivamente. Estos resultados son indicativos de una similitud entre estos perfiles, por lo que podría considerarse que la concentración de polímero en esta formulación no es suficiente para ejercer un control en la liberación del extracto. Por otro lado, se encuentra que los perfiles de liberación de las formulaciones 3-1, 3-2 y 3-3 presentan diferencias al compararlas con la formulación sin polímero, lo que podría indicar que concentraciones superiores a 3,4% de HPMC-K15M en la formulación de las matrices producen una modulación en la liberación del extracto.

Adicionalmente, para las formulaciones 3-1 y 3-2 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 50%:37,5%:12,5% y 53,3%:40,0%:6,7% respectivamente), se obtienen valores de f_1 de 9,41 y 5,62 y de f_2 de 61,93 y 63,04 para fructosa y glucosa, respectivamente, indicando que los perfiles son similares. Teniendo en cuenta el comportamiento de la liberación del extracto previamente explicado, en donde se encontró que estas formulaciones no alcanzan concentraciones de fructosa o glucosa superiores al 45%, y la similitud que presentan los perfiles de dichas formulaciones, se puede inferir que concentraciones superiores a 6,7% y hasta el 12,5% del polímero, que corresponden a los valores más altos estudiados, ocasionan una baja liberación del extracto al final del estudio.

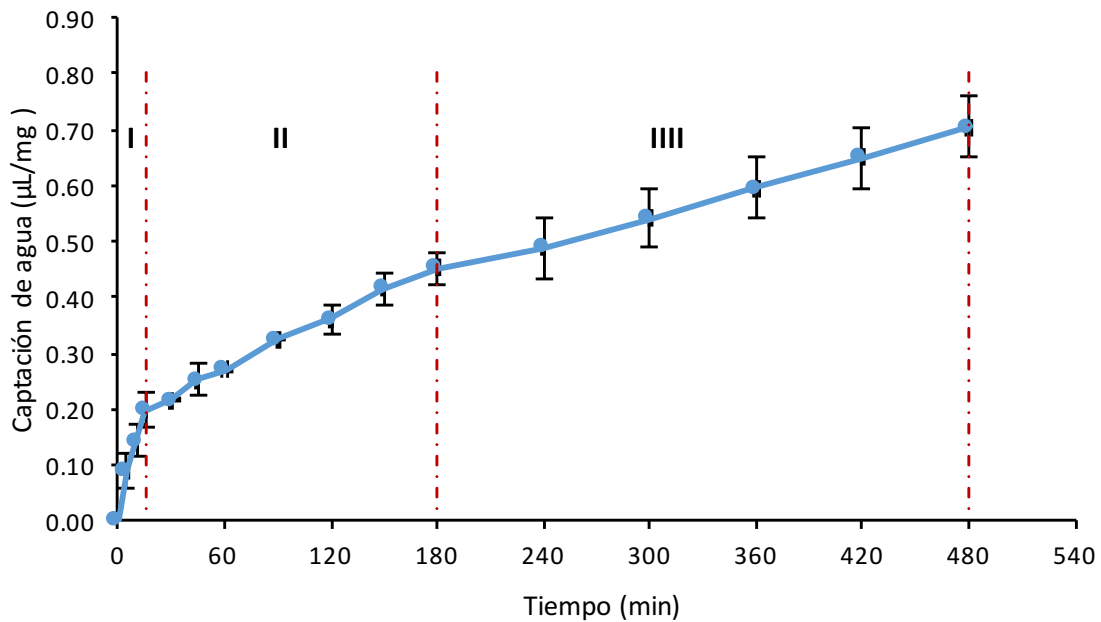
En este contexto se considera que la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%) es la más adecuada para la liberación controlada del extracto de frutos de *P. peruviana*, en las condiciones de estudio, pues como se mencionó, modula la liberación del extracto y de acuerdo al cálculo de f_1 y f_2 presenta diferencias con las demás formulaciones, lo que implica que no se comporta como un sistema de liberación inmediata y tampoco controla en exceso la liberación. Por esta razón, la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%), se seleccionó para realizar los estudios complementarios que permitan profundizar en el mecanismo de liberación del extracto.

Adicionalmente, se hizo una comparación de los perfiles de liberación entre el marcador fructosa y el marcador glucosa (Tabla 5-6), encontrando que los perfiles de todas las formulaciones son estadísticamente similares, por lo que cualquiera de los dos marcadores podría utilizarse para el seguimiento de la liberación del extracto.

5.3.2.2 Evaluación del comportamiento de captación de agua

La captación de agua es una medida importante en la evaluación de matrices hidrofílicas, ya que el hinchamiento del polímero depende de la velocidad de penetración del agua dentro del sistema (257). En la Figura 5-12 se presentan los resultados del ensayo de sorción de agua realizado según lo expuesto por Rassa et al. (292).

Figura 5-12 Comportamiento de sorción de agua de la matriz hidrofílica a partir de la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%).



I. Etapa I; II. Etapa II; III. Etapa III.

A partir del perfil obtenido se determinó la velocidad de captación de agua. En la Tabla 5-7, se presentan las constantes de velocidad de sorción asociadas a cada una de las fases del proceso. Al analizar el perfil de sorción y los valores de las constantes de velocidad frente al agua, se presenta un comportamiento en tres etapas, caracterizado por una fase inicial de mayor velocidad que va disminuyendo en función del tiempo. A los quince minutos la matriz ya ha tomado un peso de agua equivalente al 20% de su peso inicial. El comportamiento de esta etapa puede explicarse por las características hidrofílicas del extracto, del dióxido de silicio y del polímero utilizado (236, 257).

Tabla 5-7 Comportamiento del proceso de captación de agua de la matriz hidrofílica correspondiente a la formulación 3-3

Etapa	K ($\mu\text{L}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	r^2	Ecuación de la recta
1	0,013	0,982	$y = 0,013x + 0,018$
2	0,0015	0,9955	$y = 0,0015x + 0,1784$
3	0,0009	1	$y = 0,0009x + 0,2708$

Transcurrido unos minutos, se genera una capa gelificada en la superficie del comprimido lo que retarda el ingreso del agua, reflejado en la disminución de la velocidad de sorción, en las siguientes etapas (II y III), en comparación con la inicial.

A medida que transcurre el tiempo, la capa de gel se hace mayor, lo que genera una mayor distancia a recorrer por parte del agua que está ingresando hacia el interior de la matriz. Una vez que el espesor de esta capa de gel se hace constante, también la velocidad de sorción de agua se hace constante en la fase final del proceso, lo que no se alcanzó a evidenciar en este estudio.

Aunque el extracto y el dióxido de silicio coloidal contribuyen al carácter hidrofílico de la matriz, es el polímero el que ejerce una mayor influencia. La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en contacto con el agua, interactúa con esta, dando lugar a tres tipos de agua, de acuerdo con la clasificación propuesta por John y Andrade (293): el agua libre (sin unión), el agua de interfaz (débilmente unida al polímero) y el agua ligada (fuertemente unida al polímero). El agua libre no interactúa con el polímero y es capaz de disolver el extracto, y por tanto, es en la que presumiblemente se llevará a cabo la difusión, que predomina en los primeros 120 minutos del estudio. Las proporciones en que se da lugar a estos tres tipos de agua dependen de la hidrofiliidad y del número de los grupos sustituyentes del polímero (236).

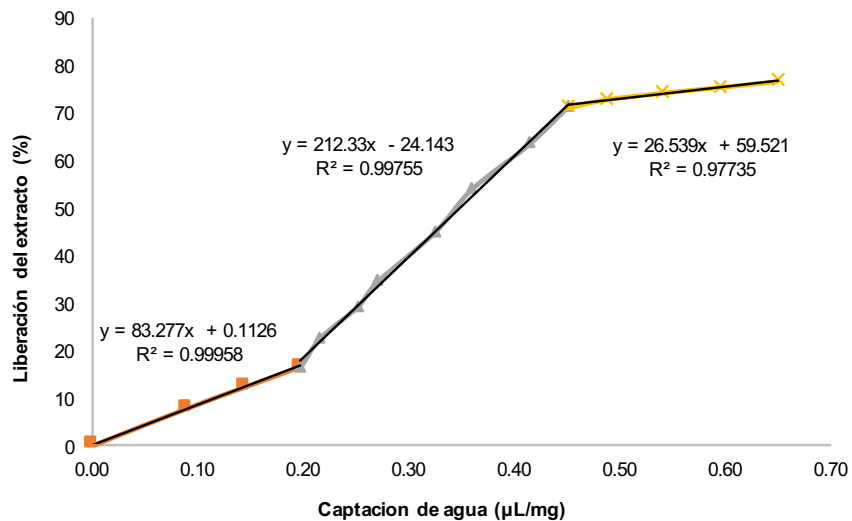
Lo anterior corrobora la importancia del proceso de sorción de agua en la liberación del extracto en solución a partir de las matrices hidrofílicas. Diferentes autores han establecido una relación entre la entrada de agua en la matriz y el extracto en disolución para matrices hidrofílicas, lo que confirma la importancia del espesor de la capa de gel y la presencia del extracto en la cinética de liberación de este (62, 182, 245-247, 255, 257, 267, 277, 291,

294).

Al relacionar la captación de agua con la liberación del extracto (Figura 5-13), de manera similar a lo observado para el comportamiento de sorción, se evidencian tres fases con coeficientes de determinación de 0,9996, 0,9976 y 0,9774, respectivamente.

En primer lugar, se encuentra una fase inicial con una pendiente de $83,28 \text{ \%} \cdot \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ (liberación / captación), que corresponde a la primera etapa de liberación del extracto, en donde el comprimido entra en contacto con el agua. Esto se da como consecuencia de la imbibición del agua dando lugar a la disminución en la temperatura de transición vítrea del polímero (T_g), que es causada por el efecto plastificante que ejerce el agua al ingresar en la matriz. La disminución de la T_g provoca un cambio en las cadenas del polímero que adquieren mayor movilidad produciendo así la liberación inmediata del extracto que está en la superficie de la matriz.

Figura 5-13 Correlación entre la captación de agua y la liberación del extracto



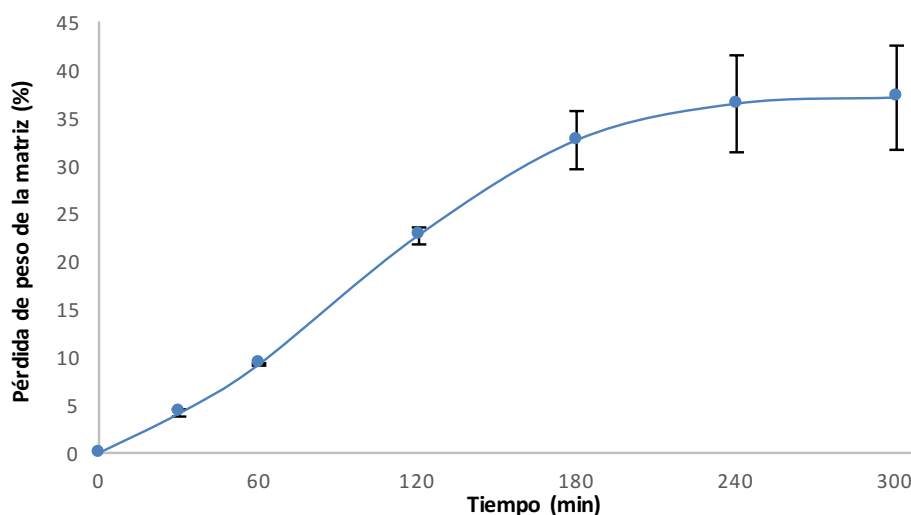
Posteriormente, en una fase intermedia, se observa un cambio drástico de pendiente, $212,3 \text{ \%} \cdot \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ (aumento de la liberación y/o disminución de la captación de agua), debido a que la imbibición de agua en la matriz en mayor cantidad ocasiona que esta se hinche, generando la formación de la capa gel, como resultando de la coalescencia de las partículas de polímero, a través de la cual se difunde el extracto hacia el exterior del sistema y el agua hacia el interior del comprimido, favoreciendo el proceso de liberación y dificultando ligeramente la entrada del agua en comparación con la etapa inicial.

Finalmente, en la última fase, se observa una menor pendiente ($59,2 \text{ \%}\cdot\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$), influenciada principalmente por la disminución en la velocidad de liberación, asociado a que en esta etapa el porcentaje de extracto que se libera de la matriz hidrofílica es muy bajo, si se considera que se está acercando al 100% de extracto liberado. Adicionalmente, la capa de gel se ha hecho mayor, dificultando la entrada del agua al sistema.

5.3.2.3 Evaluación de la erosión de la matriz

La erosión de la matriz se evaluó como la pérdida de peso de esta en función del tiempo (246). En la Figura 5-14 se muestra que la pérdida de peso de la matriz fue rápida, alcanzando a erosionarse cerca del 25% después de 120 minutos, evidenciando la importancia de este mecanismo en el proceso de liberación del extracto. Como se explicó previamente para iniciar el proceso de erosión de la matriz hidrofílica, se requiere en primer lugar, de la hidratación del polímero, para formar así la capa de gel a nivel superficial. Esta fase es secuencialmente seguida por la hidratación interna, hinchamiento y erosión de la matriz, por lo que el proceso de erosión está estrechamente relacionado con la capacidad de captación de agua hacia el interior de la matriz.

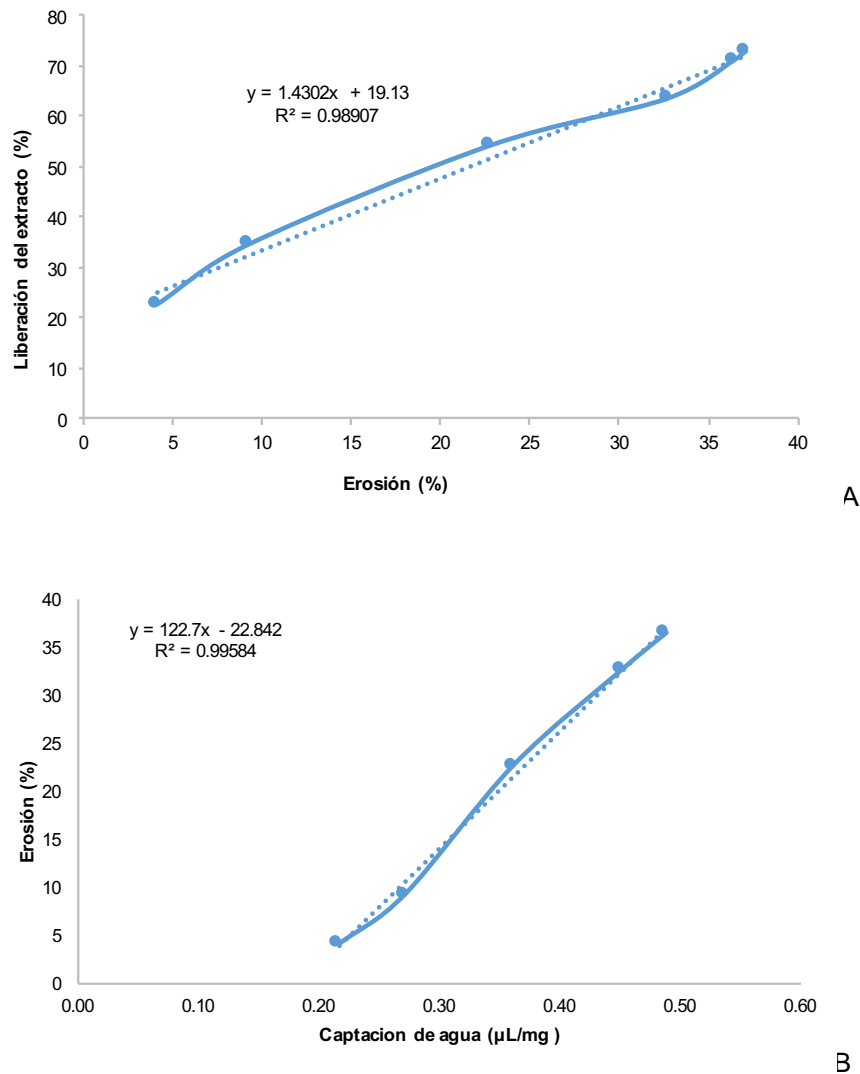
Figura 5-14 Perfil de erosión para la matriz Ex:SiO₂:HPMC-K15M 1:0,75:0,0625 en función del tiempo.



Con el fin de complementar este análisis del mecanismo de liberación, de acuerdo a lo mencionado, se evaluó la relación que podría existir entre el porcentaje de extracto liberado

y el comportamiento que tuvo la matriz hifrofílica frente a la erosión, así como entre la captación de agua y la erosión de la matriz. Se encontró una alta correlación entre estas variables con coeficientes de 0,9891 y 0,9958, respectivamente (Figura 5-15). Este resultado sugiere que la liberación del extracto está altamente influenciada por la erosión del sistema, que se presenta posterior a la formación de la capa gel y que se mantiene durante el tiempo de estudio. Como era de esperarse el proceso de captación de agua tiene una influencia muy marcada en el comportamiento de erosión.

Figura 5-15 Correlaciones de la erosión de la matriz con la liberación del extracto y de la captación de agua con la erosión

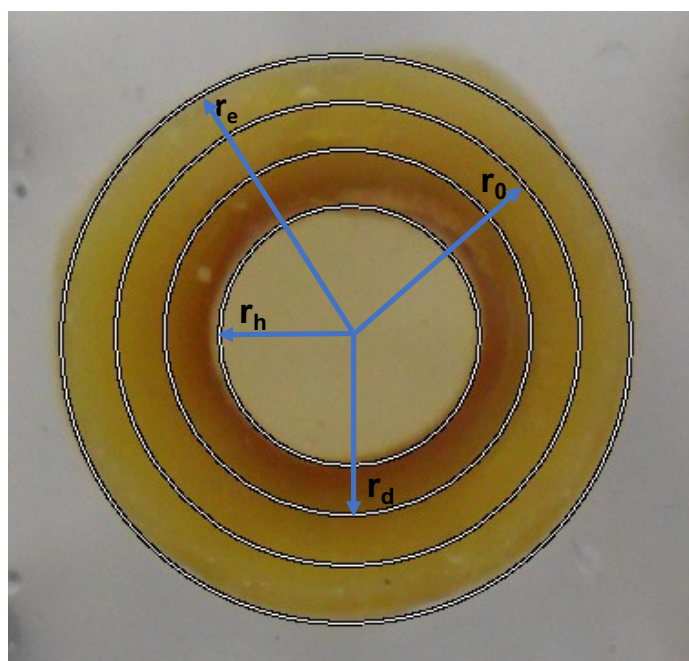


A: Correlación entre la erosión de la matriz y la liberación del extracto; **B:** Correlación entre la captación de agua y la erosión de la matriz.

5.3.2.4 Estudio de los frentes de movimiento

En la Figura 5-16 se presenta el resultado de la visualización de los diferentes frentes de movimiento en la matriz hidrofílica seleccionada. En esta figura se pueden identificar: el frente de hinchamiento (en el radio r_h) que separa la zona de la matriz que presenta este comportamiento de la que no lo presenta; el frente de difusión (en el radio r_d) que constituye el límite dentro de la matriz que ha sufrido hinchamiento, separando la que contiene extracto disuelto (color amarillo intenso), de la que contiene extracto no disuelto (color café); finalmente, el frente de erosión (en el radio r_e) indica el límite entre la matriz y el medio de disolución, de acuerdo a lo descrito por Colombo et al. (246, 247, 267, 277) y explicado en el marco conceptual de este capítulo.

Figura 5-16 Imagen de la matriz que contiene la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%), después de 240 minutos de hinchamiento.



r_0 Radio inicial; r_d = Radio de difusión; r_h = Radio de hinchamiento; r_e = Radio de erosión

Los resultados de la evaluación de los diferentes frentes en función del tiempo se muestran en la Figura 5-17, basados en una serie de imágenes de la matriz, tomada en tiempos secuenciales (Figura 5-18).

Figura 5-17 Frentes de movimiento de la matriz que contiene Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% en función del tiempo.

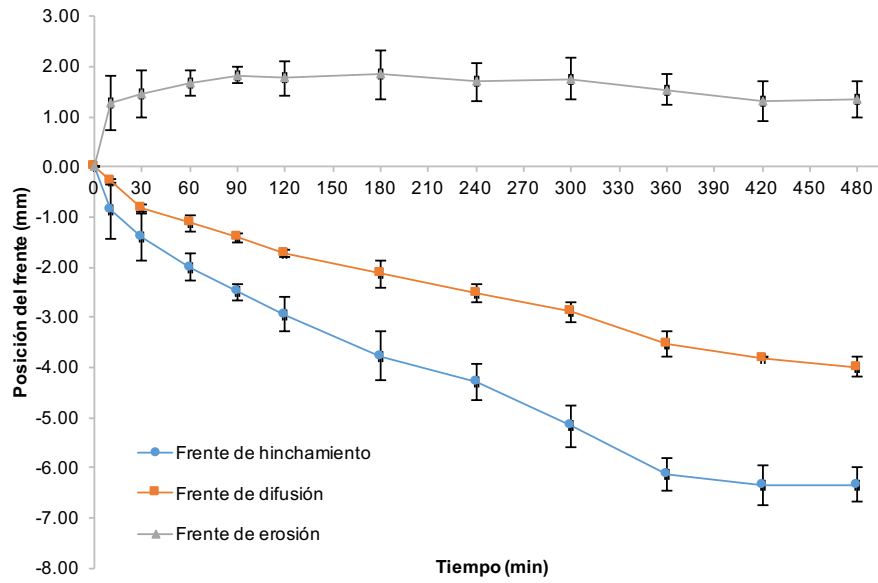
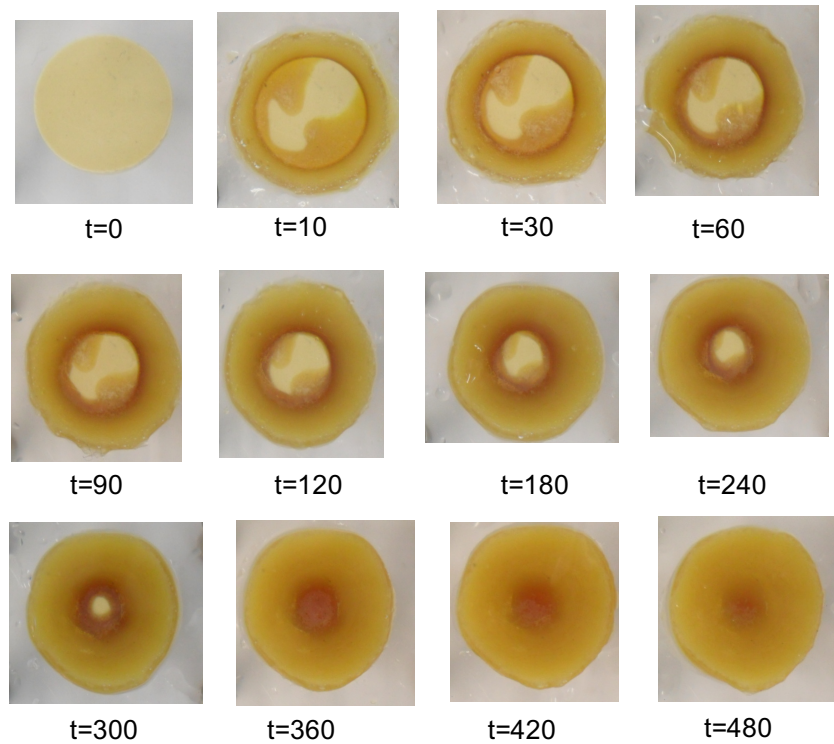


Figura 5-18 Imágenes de los frentes de movimiento de la matriz Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4% en función del tiempo.



t = tiempo (minutos)

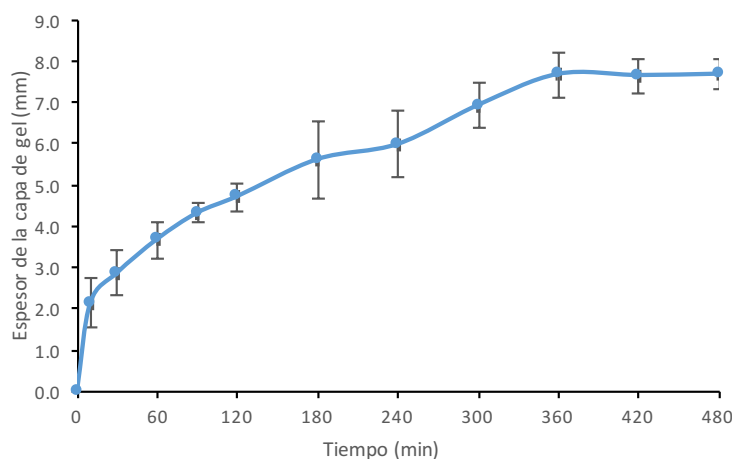
La serie de imágenes de la matriz de la Figura 5-18 muestran las diferencias de coloración mencionadas. La superficie de la matriz presenta signos de erosión, lo cual es una característica típica de las matrices basadas en HPMC (245, 255, 257).

Los resultados muestran que el movimiento del frente de erosión hacia el exterior aumenta rápidamente en una primera fase, debido a que el proceso de hinchamiento genera un aumento en el radio de este frente. Posteriormente, este proceso se hace casi invariable hacia el final del ensayo, puesto que el espesor de la capa de gel formada se mantiene prácticamente constante (Figura 5-17 y Figura 5-19) (267, 295).

El frente de difusión se mueve hacia el interior de la matriz (valores negativos), debido a la disminución del frente de hinchamiento, manteniendo una velocidad de movimiento relativamente constante. El valor absoluto del frente de hinchamiento aumentó sustancialmente como se esperaba para matrices hidrofílicas (267).

Finalmente, con los datos de los frentes de movimiento se calculó el espesor de la capa de gel, que representa la distancia entre el frente de hinchamiento y el frente de erosión (Figura 5-19) (246, 247, 263, 267, 277). Este parámetro va aumentando con el transcurrir del tiempo, lo que está relacionado con una mayor entrada de agua, que genera el efecto plastificante ya mencionado, modificando el comportamiento del polímero. Este valor tiende a hacerse constante hacia el final del ensayo, debido al equilibrio que se establece entre los procesos de hinchamiento y erosión. El aumento de este espesor es el que permite modular la velocidad de liberación.

Figura 5-19 Espesor de la capa de gel



Los ensayos realizados en este capítulo, tanto al material co-procesado de partida como a la matriz hidrofílica, permitieron establecer una composición (formulación 3-3), que fuera compresible directamente y que modulara la liberación del activo, sin perder su actividad de inhibición de la α -amilasa, determinada *in vitro*. El mecanismo de liberación del extracto de *P. peruviana* a partir de la matriz hidrofílica, utilizando el polímero HPMC-K15M al 3,4%, incluye la difusión hasta alcanzar un tiempo de 120 minutos, donde comienza a primar la relajación-erosión del polímero como segundo mecanismo. Este comportamiento se confirma con los análisis de captación de agua y erosión y se complementa con el de frentes de movimiento (245, 257, 272, 291).

5.4 Conclusiones

El método de secado por aspersión para la elaboración del co-procesado (Extracto *P. peruviana* – Dióxido de silicio coloidal – HPMC) permitió conseguir un material con un rendimiento por encima del 64%, caracterizado por tener un tamaño de partícula pequeño, propiedades de flujo adecuadas, contenidos de humedad e higroscopicidad bajas, además de propiedades de compresión que permiten la elaboración de tabletas por compresión directa.

Se evaluaron diferentes formulaciones para la elaboración de las matrices hidrofílicas, variando la concentración de polímero en estas, encontrando que la velocidad de liberación del extracto disminuye con el aumento en el porcentaje de polímero en la matriz, siendo este uno de los factores relevantes en la modulación de liberación.

Dentro de las formulaciones evaluadas se seleccionó la 3-3 que corresponde a Ex:SiO₂:HPMC-K15M (55,2%:41,4%:3,4%), debido a que esta permitió la adecuada modulación de la liberación del extracto, mientras que las formulaciones correspondientes a las proporciones Ex:SiO₂:HPMC-K15M (50,0%:37,5%:12,5% y 53,3%:40%:6,7%) no liberaron completamente el extracto en el lapso de tiempo evaluado (8 horas). Se observó que aquella que contiene una proporción de polímero más baja (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 56,1%:42,1%:1,8%) no controla la liberación, permitiendo la rápida liberación del extracto, de manera similar a la formulación que no contiene polímero y que actúa como un sistema de liberación inmediata.

La liberación del extracto de frutos de *P. peruviana* a partir de la matriz con composición Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%, se ajustó a los modelos matemáticos “Korsmeyer y Peppas” y “Peppas y Sahlin”, con coeficientes de correlación de 0,9986 y 0,9987 para la fructosa y de 0,9975 y 0,9971 para la glucosa.

Para el modelo de Korsmeyer y Peppas se encontró un valor de n de 0,5892 y 0,5428 para fructosa y glucosa respectivamente, lo que indica que el proceso de liberación del extracto de frutos de *P. peruviana* a partir de la matriz seleccionada (formulación 3-3), se llevó a cabo por mecanismos combinados de difusión y relajación-erosión del polímero. Por su parte el modelo de Peppas y Sahlin complementó que la difusión fue el mecanismo predominante al inicio del proceso y el mecanismo por erosión-relajación del polímero se hizo más importante después de los 120 minutos de iniciado el proceso de liberación, con valores de constantes de velocidad de difusión (k_d) y relajación-erosión (k_r) de 0,0339 min^{-0,43} y 0,0044 min^{-0,86} para fructosa y de 0,0401 min^{-0,43} y 0,0031 min^{-0,86} para glucosa.

El proceso de captación de agua de la matriz se llevó a cabo en tres fases, caracterizado por una fase inicial de mayor velocidad que va disminuyendo en función del tiempo, por la rápida hidratación inicial de la matriz y la formación de la capa de gel, que en la medida que aumenta su espesor, disminuye el proceso de sorción. Adicionalmente, se evidenció la importancia del proceso de captación de agua en la liberación del extracto, encontrando un comportamiento similar de tres fases al correlacionar estas dos variables.

La erosión de la matriz que se presenta es un mecanismo importante en la liberación del extracto de frutos de *P. peruviana*, evidenciando una erosión del 25% después de 120 minutos del estudio, que va aumentando con el tiempo hasta que se hace constante. Se evidenció una alta correlación lineal entre la erosión y la liberación del extracto, así como entre la captación de agua y la erosión de la matriz, confirmando la dependencia de la formación de la capa gel con el proceso de captación de agua, que a su vez se vuelve determinante de la erosión que se presenta.

El estudio de frentes de movimiento permitió evidenciar y medir las zonas de hinchamiento, difusión y erosión de la matriz hidrofílica y derivado de ello el espesor de la capa gel, que en conjunto suministraron información complementaria acerca del mecanismo de liberación del extracto a partir del sistema matricial.

Conclusiones generales

Se aislaron y purificaron los Peruviosidos A-F, los cuales son responsables de la actividad evaluada *in-vitro* (mediante el ensayo de inhibición de la α -amilasa), del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*. Cuatro de estas moléculas se presentan por primera vez en la naturaleza, encontrando que aquellas con grupos isovalerilo en la posición C3' y un ácido graso de cadena larga (C₁₂) son los más activos en la serie de compuestos aislados.

Se identificaron y seleccionaron la glucosa y la fructosa como marcadores analíticos para la cuantificación del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, estableciendo y validando una metodología analítica para estos marcadores.

Se establecieron las condiciones del proceso para la obtención del extracto seco aplicando la metodología de secado por aspersion, mediante el empleo de un diseño estadístico experimental. Las condiciones determinadas fueron: temperatura de inyección 80°C; velocidad de flujo del nitrógeno de inyección 400 L/h; ajuste de la bomba de alimentación 5%; ajuste del aspirador 100%; concentración del extracto 7,5% p/p; relación del extracto y el coadyuvante de secado 1:0,75.

Se seleccionó el polímero HPMC-K15M para el estudio detallado del mecanismo de liberación del extracto a partir de formulaciones de matrices hidrofílicas, debido a su comportamiento intermedio en velocidad de liberación, asociado a la viscosidad que presentan sus dispersiones en comparación con otros polímeros evaluados.

Se desarrollaron los sistemas matriciales hidrofílicos a ser estudiados empleando el método de co-procesamiento por secado por aspersion y comprimidos por compresión directa. Se seleccionó la formulación 3-3 (Ex:SiO₂:HPMC-K15M 55,2%:41,4%:3,4%), debido a que esta permitió la adecuada modulación de la liberación del extracto.

Se evidenció que la actividad *in vitro* determinada para el extracto, no se vio afectada por la presencia de excipientes ni por el procesamiento por secado por aspersión.

Se estudió el mecanismo y el comportamiento fisicoquímico de la liberación del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* formulado como matrices hidrofílicas, en donde se encontró que la liberación está regida por mecanismos combinados de difusión del extracto y relajación-erosión del polímero, demostrado mediante el ajuste a los modelos matemáticos "Korsmeyer y Peppas" y "Peppas y Sahlin", con coeficientes de correlación de 0,9986 y 0,9987 para la fructosa y de 0,9975 y 0,9971 para la glucosa y complementado con la evaluación de captación de agua, erosión y frentes de movimiento.

Recomendaciones generales

1. Evaluar la posibilidad de elaborar el co-procesado a partir de una suspensión hidroalcohólica, con un alto contenido de agua y no en alcohol USP, ya que esto facilitaría el escalado del proceso y reduciría los costos de fabricación, además de permitir la obtención de un material posiblemente con mejores propiedades de fluidez para la fabricación a escala industrial.
2. Continuar con los estudios posteriores que hacen parte del desarrollo del producto, como son los estudios de evaluación de la actividad del fitoterapéutico *in vivo* empleando ratones, de estabilidad para determinar la vida útil del producto, biofarmacéuticos y farmacocinéticos y los estudios clínicos necesarios con el fin de llegar a un producto que pueda ser comercializado.

Anexo A: Protocolo para evaluar la inhibición de alfa amilasa

El presente protocolo está enfocado en la alfa-amilasa, enzima que interviene en la descomposición de los carbohidratos complejos, tales como almidón y glucógeno. Ella cataliza la escisión de residuos glucósidos individuales de diferentes glicoconjugados incluyendo polímeros con enlaces alfa o beta de glucosa.

Para la realización de la prueba se requiere preparar las siguientes soluciones.

Buffer: Se pesaron 21,03g de Trizma Base (Sigma/Aldrich) y 4,44 g de CaCl₂ anhidro, se disolvió con un litro de agua destilada, para obtener una solución de 0,2 M de Tris que contiene 0,04 M de CaCl₂. Aparte se midió un volumen de 1 mL de una solución de ácido clorhídrico 1 M y se llevó a volumen final de 100 mL, para obtener una solución de ácido clorhídrico a una concentración de 0,01 M. A 50 mL de la solución de Tris 0,2 M que contiene CaCl₂ 0,04 M, se agregó ácido clorhídrico 0,01 M hasta obtener pH 6,9 y se llevó a un volumen final de 200 mL con agua destilada, para obtener un buffer de Tris-HCl (0,05 M, pH 6,9) que contiene CaCl₂ 0,01 M.

Enzima: se pesaron 15 mg de amilasa porcina pancreática Sigma A3170, y se diluyeron en 1 mL del buffer anteriormente preparado; teniendo en cuenta que el producto contenía 22 UI/mg de sólido, se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{15 \text{ mg} \times 22 \text{ UI}}{1 \text{ mg} \times 1 \text{ mL}} = 330 \text{ UI/mL}$$

Luego para obtener una concentración de 2UI/mL

$$\frac{330 \text{ UI}}{\text{mL}} \times V_i = \frac{2 \text{ UI}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL}$$

$$V_i = 0,006 \text{ mL} \text{ ó } 6 \mu\text{L}$$

6 μL que se llevaron a 1 mL para obtener la concentración deseada.

Sustrato: Se pesaron 15 mg de almidón azul Sigma S7776 y se suspendieron en 1 mL del buffer Tris-HCl 0,05 M pH 6,9, para obtener una concentración de 10 mg/mL, se hicieron los siguientes cálculos:

$$\frac{15 \text{ mg}}{\text{mL}} \times V_i = \frac{10 \text{ mg}}{\text{mL}} \times 0,4 \text{ mL}$$

$$V_i = 0,267 \text{ mL} \text{ ó } 267 \mu\text{L}$$

267 μL que se llevaron a 0,4 mL para obtener la concentración deseada (Tabla A-1).

Tabla A-1 Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa amilasa

Llevar a ebullición (92°C) 200 μL de almidón azul (10 mg/mL) por 5 min					
Incubar a 37°C por 5 minutos					
Reactivos	Concentración Final	Blanco del control	Control (100% actividad enzimática)	Blanco de la muestra	Patrón o Muestra
Muestra	640 $\mu\text{g/mL}$	-	-	200 μL	200 μL
Alfa amilasa	2 UI/mL	-	100 μL	-	100 μL
Buffer de Tris-HCl (0,05 M, pH 6,9) que contiene CaCl_2 0,01 M	-	300 μL	200 μL	100 μL	-
Mezclar agitando vigorosamente					
Incubar a 37°C por 60 min					
Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a 4°C					
Medir Absorbancia a 100 μL del sobrenadante a 595 nm					

Anexo B Validación de la metodología analítica para la cuantificación de glucosa y fructosa en el extracto de frutos de *Physalis peruviana*

1. Objetivo:

Establecer la evidencia documentada para que el método analítico por HPLC-IR, utilizado en la valoración de fructosa y glucosa para el ensayo de disolución de las matrices hidrofílicas del extracto de *P. peruviana*, proporcione resultados reproducibles y confiables.

2. Metodología:

Para lograr el objetivo de la verificación de la metodología analítica utilizada en la valoración de fructosa y glucosa para el ensayo de disolución de las matrices hidrofílicas del extracto de *P. peruviana*, se realizaron las determinaciones de los parámetros de selectividad, precisión del sistema, precisión intermedia, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, estabilidad de la muestra para disolución en las matrices y límites de detección y cuantificación, siguiendo los lineamientos de las ICH Q2R1.

3. Condiciones de trabajo

Para la valoración de fructosa y glucosa en el ensayo de disolución por HPLC-IR, se utilizó una columna Aminex[®] HPX 87H (300 mm x 7,8 mm, 9 µm) con una temperatura del horno de 60°C. Para el método se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 0,05 mM y la velocidad de flujo se mantuvo constante a 0,6 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 µL. Cada solución fue filtrada a través de una membrana de 0,45 µm antes de inyectar en el equipo de HPLC.

3.1 Equipos

HPLC Agilent Technology modelo 9100 con detector de índice de refracción

3.3 Diluyente

Agua purificada

3.4 Solución estándar

3.4.1 Solución Madre

Se pesó y transfirió exactamente 1 g del estándar de Fructosa en un balón aforado de 100 mL, posteriormente se pesó y transfirió exactamente 1 g del estándar de glucosa al mismo balón aforado de 100 mL. Se agregaron 50 mL de agua purificada y se sometió a ultrasonido por 10 minutos. Se completó a volumen para obtener una solución de 10 mg/mL.

3.4.2 Solución estándar

La solución estándar se preparó a partir de diluciones de la solución madre para obtener ocho niveles de concentraciones de 0,25-10,00 mg/mL los cuales fueron analizadas por triplicado.

4. Validación

4.1 Selectividad

Se realizaron las inyecciones en el sistema cromatográfico de las siguientes muestras bajo las condiciones de trabajo de la disolución de las matrices hidrofílicas: Solución estándar a una concentración de 5 mg/mL; el extracto a 1 mg/mL con solución estándar a una concentración de 5 mg/mL; placebo (HPMC-K15M + dióxido de silicio); fase móvil; agua purificada y medio de disolución.

Para la evaluación de la selectividad se determinó la estabilidad de los estándares, el extracto con estándares y placebo junto a los estándares a un nivel de concentración de 5,0 mg/mL, valorando la solución a tiempo 0 y luego de dejar reposar la solución por 8 horas en cada uno de los medios de disolución (pH 1,2 y pH: 6,8). Se compararon entre sí cada uno de los resultados obtenidos.

La técnica se considera selectiva si no presenta ninguna señal que interfiera con la señal del estándar, adicionalmente, Los productos de degradación generados bajo las condiciones de trabajo no presentan ninguna señal que interfiera con la señal del estándar.

CV < 5,0%

Tabla B-1 Selectividad para la Fructosa

Muestra	pH 1,2			pH 6,8		
	1	2	3	1	2	3
Fructosa (área mv*min)						
0 horas	23416,6	23456,8	23600,0	23564,7	23674,0	23876,0
6 horas	23412,9	23415,9	23154,8	23415,9	23765,4	24009,0
Promedio	23414,8	23436,4	23377,4	23490,3	23719,7	23942,5
Desvest.	2,6	28,9	314,8	105,2	64,6	94,0
CV (%)	0,0	0,1	1,4	0,4	0,3	0,4
Fructosa + Extracto (área mv*min)						
0 horas	25634,5	25867,9	25889,6	25987,0	25990,0	24989,0
6 horas	26009,7	26143,9	26476,0	26876,1	26989,0	26783,1
Promedio	25822,1	26005,9	26182,8	26431,6	26489,5	25886,1
Desvest.	265,3	195,2	414,6	628,7	706,4	1268,6
CV (%)	1,0	0,8	1,6	2,4	2,7	4,9
Fructosa + Placebo (área mv*min)						
0 horas	24576,9	23674,8	24758,0	23789,0	24675,9	24567,0
6 horas	24678,0	24457,0	23908,0	23409,9	23467,0	24008,2
Promedio	24627,5	24065,9	24333,0	23599,5	24071,5	24287,6
Desvest.	71,5	553,1	601,0	268,1	854,8	395,1
CV (%)	0,3	2,3	2,5	1,1	3,6	1,6

Tabla B-2 Selectividad para la Glucosa

Muestra	pH 1,2			pH 6,8		
	1	2	3	1	2	3
Glucosa (área mv*min)						
0 horas	26784,9	26413,0	26789,0	26900,8	27080,0	27000,9
6 horas	26788,8	27000,9	26790,0	27888,1	26666,6	25901,0
Promedio	26786,9	26707,0	26789,5	27394,5	26873,3	26451,0
Desvest.	2,8	415,7	0,7	698,1	292,3	777,7
CV (%)	0,0	1,6	0,0	2,6	1,1	2,9
Glucosa + Extracto (área mv*min)						
0 horas	51768,0	52902,0	51908,2	51345,0	51110,0	52786,1
6 horas	52897,0	51908,1	52000,1	51876,1	52347,8	52672,2
Promedio	52332,5	52405,1	51954,2	51610,6	51728,9	52729,2
Desvest.	798,3	702,8	65,0	375,5	875,3	80,5

CV (%)	1,5	1,3	0,1	0,7	1,7	0,2
Glucosa Placebo (área mv*min)						
0 horas	53768,0	54768,3	54679,9	55900,0	58789,0	57911,1
6 horas	54112,0	55787,0	56091,2	56790,0	60123,1	55701,9
Promedio	53940,0	55277,7	55385,6	56345,0	59456,1	56806,5
Desvest.	243,2	720,3	997,9	629,3	943,3	1562,1
CV (%)	0,4	1,3	1,8	1,1	1,6	2,8

De acuerdo a los resultados de las muestras valoradas en el momento de la preparación y luego de dejarlas durante 8 horas en el medio de disolución, se demuestra que no hay cambios significativos entre las áreas bajo la curva obtenidas de los marcadores Fructosa y Glucosa.

4-2 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. Los resultados se analizaron 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 $CV \leq 5\%$.

Para demostrar la precisión del sistema se hicieron tres réplicas de la solución del 100% de estándar de Fructosa y Glucosa, a concentraciones de 0,25, 5,0 y 10,0 mg/mL

4.2.1 Precisión del sistema y repetibilidad

En cuanto a la precisión intradía se hicieron lecturas por triplicado del estándar de Fructosa y Glucosa a concentraciones de 0,25, 5,0 y 10,0 mg/mL, en una solución con extracto a una concentración de 1mg/mL y en una solución con el placebo que contiene el polímero de HPMC-K15M y aerosil a 1mg/mL.

Tabla B-3 Precisión del sistema y precisión intradía (Repetibilidad) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices para la fructosa (agua)

Ensayo	Fructosa (área mv*min)	Fructosa + Extracto (área mv*min)	Fructosa +Placebo (área mv*min)
0,25 mg/mL			
1	1090,6	2377,9	1262,3
2	1048,7	2381,9	1234,7
3	1043,3	2326,8	1251,3
Promedio	1060,9	2362,2	1249,4
Desvest.	25,8	30,7	13,9
CV (%)	2,4	1,3	1,1
5,0 mg/mL			
1	23712,3	25145,2	31733,2
2	23157,0	25887,7	31559,2
3	23821,6	25462,8	31825,2
Promedio	23563,6	25498,5	31705,8
Desvest.	356,4	372,5	135,1
CV (%)	1,5	1,5	0,4
10,0 mg/mL			
1	48089,8	49310,3	48548,7
2	48125,0	49062,8	48791,4
3	48710,3	49456,7	48590,2
Promedio	48308,4	49276,6	48643,4
Desvest.	348,5	199,1	129,8
CV (%)	0,72	0,4	0,3

Tabla B-4 Precisión intradía (Repetibilidad) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices para la glucosa

Ensayo	Glucosa (área mv*min)	Glucosa + Extracto (área mv*min)	Glucosa + Placebo (área mv*min)
0,25 mg/mL			
1	734,5	1732,5	1007,2
2	736,7	1818,5	1076,2
3	695,8	1898,2	1009,0
Promedio	722,3	1816,4	1030,8
Desvest.	23,0	82,9	39,3
CV (%)	3,2	4,6	3,8
5,0 mg/mL			
1	25414,3	26385,9	26702,4

2	25462,7	26862,9	26160,9
3	25303,0	26954,9	26852,4
Promedio	25393,3	26734,6	26571,9
Desvest.	81,9	305,4	363,8
CV (%)	0,3	1,1	1,4
10,0 mg/mL			
1	51622,2	51828,4	51603,2
2	51375,1	50697,9	52789,6
3	51961,0	50987,1	53112,3
Promedio	51652,8	51171,1	52501,7
Desvest.	294,1	587,3	794,7
CV (%)	0,6	1,2	1,5

En todos los casos el CV es menor que el 5% establecido, por lo tanto en la repetibilidad instrumental (precisión del sistema) se demostró la mínima interferencia del equipo en la obtención de los datos de CV para las concentraciones evaluadas y por otro lado en la repetibilidad intradía (precisión del método) se demostró la mínima interferencia de la formulación y de los componentes del extracto.

4.2.2 Precisión intermedia

Para la precisión interdía (precisión intermedia) se evaluaron muestras individuales preparadas desde su pesaje en diferentes días, para una concentración de 5,0 mg/mL de estándar de Fructosa y Glucosa en agua (sistema), en una solución con extracto a una concentración de 1mg/mL y en una solución con el placebo que contiene el polímero de HPMC-K15M y aerosil a 1mg/mL.

Tabla B-5 Precisión interdía (Precisión intermedia) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices a una concentración de 5,0 mg/mL para la fructosa.

Día	Fructosa (área mv*min)	Fructosa + Extracto (área mv*min)	Fructosa + Placebo (área mv*min)
1	23712,3	25145,2	2411,3
	23157,0	25887,7	24313,2
	23821,6	25462,8	24445,8
2	20415,0	25711,2	25986,0
	22819,0	26416,6	24562,0
	22490,0	24533,0	24427,0

3	22504,0	25257,3	24573,0
	22516,0	25923,0	24242,0
	23952,0	26049,5	25381,0
Promedio	22820,8	25598,4	24671,1
Desvest.	1077,0	564,7	611,5
CV (%)	4,7	2,2	2,5

Tabla B-6 Precisión interdía (Precisión intermedia) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices a una concentración de 5,0 mg/mL para la glucosa.

Día	Glucosa (área mv*min)	Glucosa + Extracto (área mv*min)	Glucosa + Placebo (área mv*min)
1	25414,3	51828,4	51603,2
	25462,7	50697,9	52789,6
	25303,0	50987,1	53112,3
2	24081,5	51267,3	52381,5
	24049,2	51329,5	51652,8
	24024,0	51283,0	51263,0
3	24959,7	51225,7	51801,1
	26829,0	51202,2	51432,0
	24844,3	51269,1	51939,0
Promedio	24996,4	51232,2	51997,1
Desvest.	904,8	299,3	631,8
CV (%)	3,6	0,6	1,2

De acuerdo con los datos obtenidos en los análisis y el CV, se concluye que no hay diferencias significativas de los resultados entre días.

4.3 Exactitud del método

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. Para determinar la exactitud de la medida en cada matriz de estudio se realizaron tres réplicas a un nivel de concentración a través de un ensayo de adición de estándar, como se describe en la metodología.

La exactitud se evaluó a un nivel de concentración de 5,0 mg/mL de Fructosa y Glucosa y se evaluaron en agua purificada, en una solución con extracto a una concentración de

1mg/mL y en una solución con placebo que contiene el polímero de HPMC-K15M y aerosil a 1mg/mL.

Tabla B-7 Exactitud evaluada en cada una de las matrices, expresada como porcentaje de recuperación (5,0 mg/mL) para la fructosa.

Matriz	Estándar + agua purificada (área mv*min)	Placebo + agua purificada (área mv*min)	Estándar + placebo (área mv*min)	% recuperación
Extracto	23712,3	1109,0	25145,2	101,3
	23157,0	1154,5	25887,7	106,5
	23821,6	1171,2	25462,8	101,9
Promedio	23563,6	1144,9	25498,6	103,2
Desvest.	356,3	32,2	372,5	2,8
CV (%)	1,5	2,8	1,5	2,8
Placebo	23712,3	0	24110,3	101,7
	23157,0	0	24313,2	105,0
	23821,6	0	24445,8	102,6
Promedio	23563,6	0	24289,8	103,1
Desvest.	356,4	0	169,0	1,7
CV (%)	1,5	-	0,70	1,7

Tabla B-8 Exactitud evaluada en cada una de las matrices, expresada como porcentaje de recuperación (5,0 mg/mL) para la glucosa.

Matriz	Estándar + agua purificada (área mv*min)	Placebo + agua purificada (área mv*min)	Estándar + placebo (área mv*min)	% recuperación
Extracto	25414,3	1081,8	26385,9	99,6
	25462,7	1125,6	26862,9	101,0
	25303,0	1098,2	26954,9	102,1
Promedio	25393,3	1101,9	26734,6	100,9
Desvest.	81,9	22,1	305,4	1,3
CV (%)	0,3	2,0	1,1	1,2
Placebo	25414,3	0	26702,4	105,1
	25462,7	0	26160,9	102,7
	25303,0	0	26852,4	106,1
Promedio	25393,3	0	26571,9	104,6
Desvest.	81,9	0	363,8	1,7
CV (%)	0,3	-	1,4	1,6

La recuperación media de la metodología analítica se encuentra dentro de los límites estipulados para el método de HPLC-IR (95-105%), el CV confirma que no existe

diferencias estadísticamente significativas con el valor de recuperación media obtenido para cada una de las matrices (extracto y la formulación con polímero de HPMC-K15M), por lo cual se concluye que la metodología es exacta.

4.4 Linealidad

Para determinar la linealidad del sistema y la linealidad del método en cada una de las matrices estudiadas, para Fructosa y Glucosa, se realizaron 3 réplicas del análisis, a ocho niveles de concentración (0,25, 0,50, 1,00, 3,00, 5,00, 6,00, 8,00 y 10,00 mg/mL). Las matrices analizadas fueron agua, extracto y placebo con polímero de HPMC-K15M y dióxido de silicio.

Para considerar lineal el método, los resultados del análisis de varianza deben concluir que el F calculado es mayor al F de la tabla para la regresión, el R^2 debe ser de al menos 0,99 y para el intercepto y la pendiente, los valores calculados de t deber ser mayores, comparados con el valor tabulado.

Sistema: agua

Tabla B-9 Linealidad del sistema fructosa (agua)

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
F1	0,25	1090,6	1090,6	25,9	2,4
		1048,7			
		1043,3			
F2	0,50	2593,6	2593,6	35,7	1,4
		2542,4			
		2524,9			
F3	1,00	4748,5	4748,5	133,9	2,8
		4976,9			
		4983,7			
F4	3,00	13655,1	13655,1	140,7	1,0
		13526,8			
		13807,8			
F5	5,00	23712,3	23712,3	356,4	1,5
		23157,0			
		23821,6			
F6	6,00	28890,5	28890,5	395,0	1,4
		28104,0			
		28433,7			
F7	8,00	37381,8	37381,8	296,8	0,8
		36994,0			
		37577,2			
F8	10,00	48089,8	48089,8	348,5	0,7
		48125,0			
		48710,3			

Tabla B-10 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el sistema (agua)

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	t _{exp}	t _{tab} (22; 0,05)
Intercepto (a)	-147,5	H ₀ : α = 0	-0,91	2,0739
Pendiente (b)	4771,2	H ₀ : β = 0	158,34	2,0739
Correlación (r)	0,9991	H ₀ : r = 0	82,64	2,0739

Tabla B-11 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de fructosa en el sistema (agua)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Regresión	1	6346332010	6346332010	25074,1	4,301 (1; 22; 0,05)
Error	22	5568263,8	253102,9		
Desvío de linealidad	6	4503794,4	750632,4	1,28	2,741 (6; 16; 0,05)
Error puro	16	1064469,4	66529,3		

Figura B-1 Curva de calibración para fructosa en el sistema (agua)

Ecuación de la recta: $y = 4771,2X + 147,5$ ($R^2 = 0,9991$)

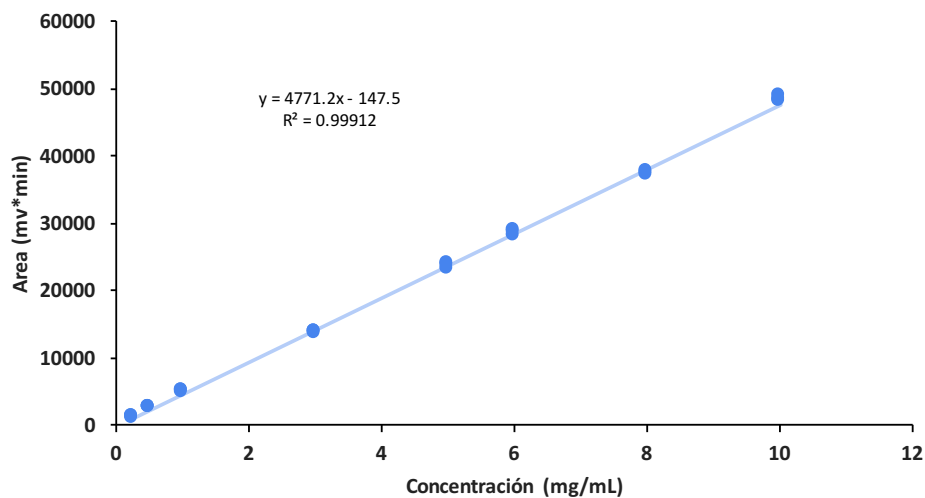


Tabla B-12 Linealidad del sistema glucosa (agua)

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
G1	0,25	1090,6	734,5	23,0	3,1
		1048,7 1043,3			
G2	0,50	2593,6	2054,2	17,4	0,8
		2542,4 2524,9			
G3	1,00	4748,5	5072,7	26,2	0,5
		4976,9 4983,7			
G4	3,00	13655,1	14481,9	146,9	1,0
		13526,8 13807,8			
G5	5,00	23712,3	25414,3	81,9	0,3
		23157,0 23821,6			
G6	6,00	28890,5	31029,6	108,7	0,4
		28104,0 28433,7			
G7	8,00	37381,8	40934,0	147,6	0,4
		36994,0 37577,2			
G8	10,00	48089,8	51622,2	294,1	0,6
		48125,0 48710,3			

Tabla B-13 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de glucosa en el sistema (agua)

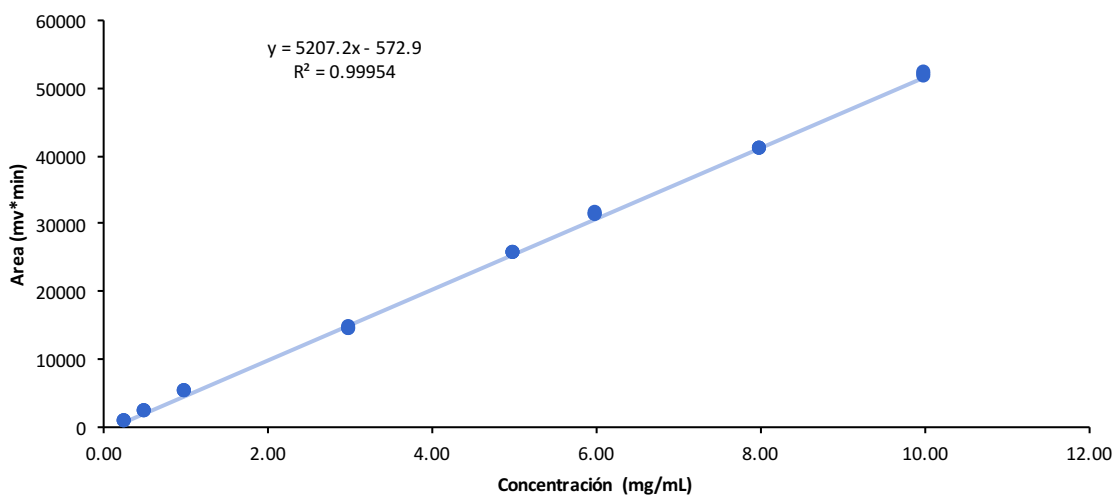
Parámetro	Valor	Hipótesis nula	t _{exp}	t _{tab} (22; 0,05)
Intercepto (a)	-572,9	H ₀ : α = 0	-4,45	2,0739
Pendiente (b)	5207,2	H ₀ : β = 0	219,6	2,0739
Correlación (r)	0,9995	H ₀ : r = 0	114,7	2,0739

Tabla B-14 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de glucosa en el sistema (agua)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Regresión	1	7559451691	7559451691	48206,2	4,301 (1; 22; 0,05)
Error	22	3449930,0	156815,0		
Desvío de linealidad	6	3150099,4	525016,6	2,0	2,741 (6; 16; 0,05)
Error puro	16	299830,6	18739,4		

Figura B-2 Curva de calibración para glucosa en el sistema (agua)

Ecuación de la recta: $y = 5207,2X - 572,9$ ($R^2 = 0,9995$)



Linealidad del método 1: Extracto de frutos de *P. peruviana*

Tabla B-15 Evaluación de la linealidad del método para fructosa. Método 1: Matriz extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
EX-F1	0,25	2377,9	2377,9	30,7	1,3
		2381,9			
		2326,8			

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
EX-F2	0,50	3460,3	3460,3	140,4	4,1
		3401,8			
		3669,0			
EX-F3	1,00	6184,6	6184,6	54,3	0,9
		6086,2			
		6175,4			
EX-F4	3,00	15375,1	15375,1	181,6	1,2
		15268,5			
		15622,4			
EX-F5	5,00	25145,2	25145,2	372,5	1,4
		25887,7			
		25462,8			
EX-F6	6,00	30479,4	30479,4	70,4	0,2
		30477,9			
		30356,8			
EX-F7	8,00	39103,7	39103,7	125,2	0,3
		39337,8			
		39143,9			
EX-F8	10,00	49310,3	49310,3	199,1	0,4
		49062,8			
		49456,7			

Tabla B-16 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el método 1: Extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	t _{exp}	t _{tab} (22; 0,05)
Intercepto (a)	1224,8	H ₀ : α = 0	12,42	2,0739
Pendiente (b)	4801,6	H ₀ : β = 0	264,0	2,0739
Correlación (r)	0,9997	H ₀ : r = 0	137,9	2,0739

Tabla B-17 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de fructosa en el método 1: Extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Regresión	1	6427533967	6427533967	69691,3	4,301 (1; 22; 0,05)
Error	22	2029030,9	92228,7		
Desvío de linealidad	6	1517763,0	252960,5	2,52	2,741 (6; 16; 0,05)
Error puro	16	511267,9	31954,2		

Figura B-3 Curva de calibración para fructosa en el método 1: Extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

Ecuación de la recta: $y = 4801,6X - 1224,8$ ($R^2 = 0,9997$)

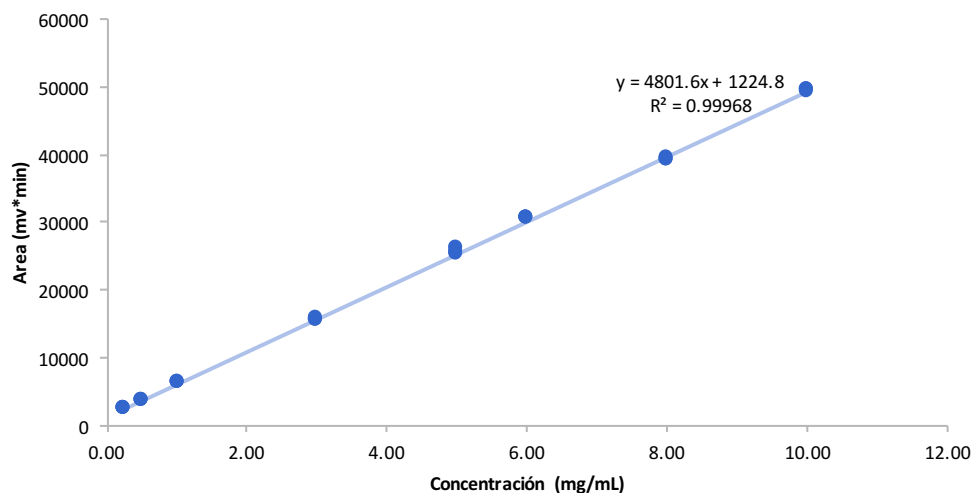


Tabla B-18 Evaluación de la linealidad del método para glucosa. Método 1: Matriz extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
EX-G1	0,25	1732,5	1732,5	82,9	4,8
		1818,5			
EX-G2	0,50	1898,2	2740,3	56,4	2,1
		2740,3			
EX-G3	1,00	2672,9	5791,0	63,2	1,1
		2428,2			
EX-G4	3,00	5791,0	15387,1	549,6	3,6
		5746,1			
EX-G5	5,00	5666,3	26385,9	305,4	1,2
		15387,1			
EX-G6	6,00	15053,6	32927,0	263,9	0,8
		16127,4			
EX-G7	8,00	26385,9	41478,7	79,8	0,2
		26862,9			
EX-G8	10,00	26954,9	51828,4	587,3	1,1
		32927,0			
		32502,9			
		32987,1			
		41478,7			
		41360,2			
		41327,0			
		51828,4			
		50697,9			
		50987,1			

Tabla B-19 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de glucosa en el método 1: Extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

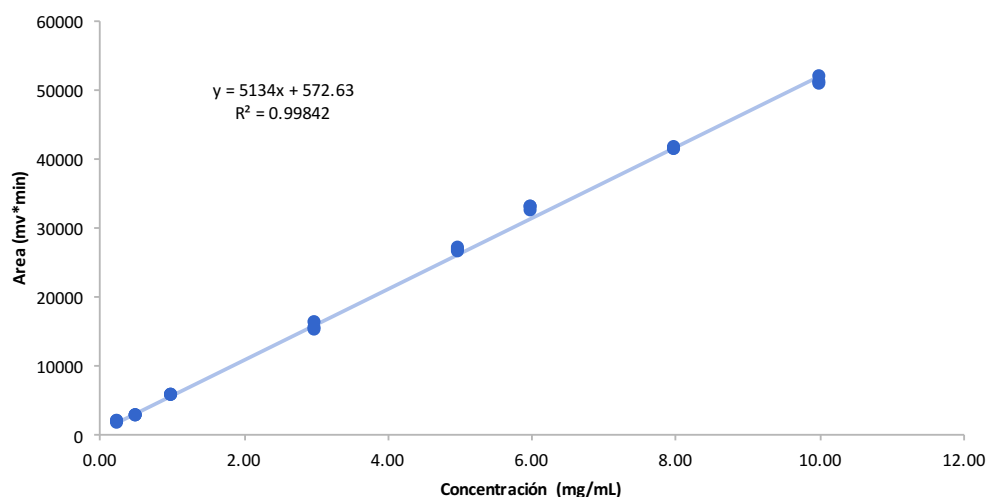
Parámetro	Valor	Hipótesis nula	t _{exp}	t _{tab} (22; 0,05)
Intercepto (a)	572,6	H ₀ : α = 0	2,43	2,0739
Pendiente (b)	5134,0	H ₀ : β = 0	118,0	2,0739
Correlación (r)	0,9984	H ₀ : r = 0	61,62	2,0739

Tabla B-20 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de glucosa en el método 1: Extracto de frutos de *Physalis peruviana*

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Regresión	1	7348353418	7348353418	13922,9	4,301 (1; 22; 0,05)
Error	22	11611387,3	527790,3		
Desvío de linealidad	6	9950772,2	1658462,0	1,98	2,741 (6; 16; 0,05)
Error puro	16	1660615,1	103788,4		

Figura B-4 Curva de calibración para glucosa en el método 1: Extracto de frutos de *Physalis peruviana* (agua)

Ecuación de la recta: $y = 5136,7X - 572,63$ ($R^2 = 0,9984$)



Linealidad del método 2: Placebo

Tabla B-21 Evaluación de la linealidad del método para fructosa. Método 2: Matriz polímero HPMC K15M (agua).

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
EX-F1	0,25	1262,3	1262,3	13,9	1,1
		1234,7			
EX-F2	0,50	1251,3	2561,2	101,0	3,9
		2561,2			
		2653,5			
EX-F3	1,00	2451,8	5400,8	48,4	0,9
		5400,8			
		5435,1			
EX-F4	3,00	5339,6	15870,3	411,4	2,6
		15870,3			
		15438,1			
EX-F5	5,00	15047,8	24110,3	169,0	0,7
		24110,3			
		24313,2			
EX-F6	6,00	24445,8	31733,2	135,1	0,4
		31733,2			
		31559,2			
EX-F7	8,00	31825,2	44302,1	170,2	0,4
		44302,1			
		44604,2			
EX-F8	10,00	44589,1	48548,7	129,8	0,3
		48548,7			
		48791,4			
		48590,2			

Tabla B-22 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua)

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	t _{exp}	t _{tab} (22; 0,05)
Intercepto (a)	192,2	H ₀ : α = 0	0,34	2,0739
Pendiente (b)	5103,7	H ₀ : β = 0	49,35	2,0739
Correlación (r)	0,9910	H ₀ : r = 0	25,77	2,0739

Tabla B-23 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Regresión	1	7261760275	7261760275	2435,5	4,301 (1; 22; 0,05)
Error	22	65596370,5	2981653,2		
Desvío de linealidad	6	65047109,2	10841184,9	1,80	2,741 (6; 16; 0,05)
Error puro	16	549261,4	34328,8		

Figura B-5 Curva de calibración para fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua)

Ecuación de la recta: $y = 5103,7X - 192,16$ ($R^2 = 0,9910$)

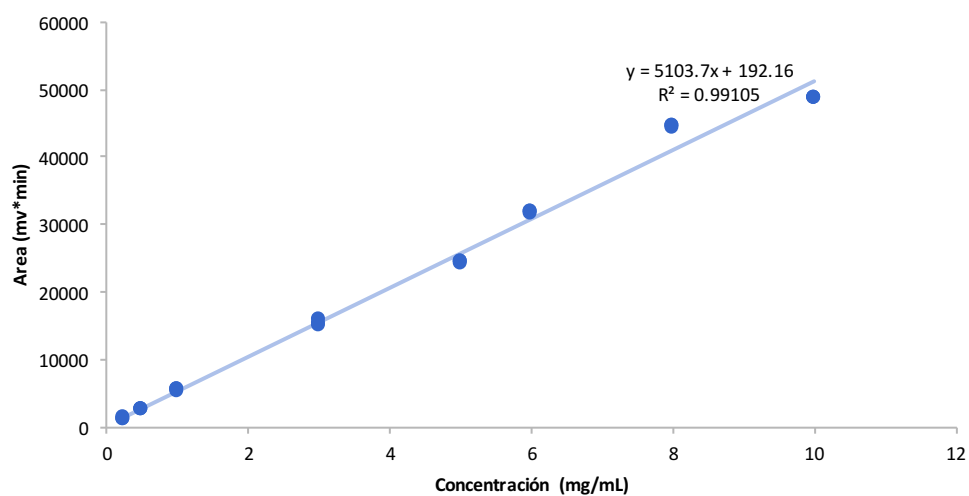


Tabla B-24 Evaluación de la linealidad del método para glucosa. Método 2: Matriz polímero HPMC K15M (agua)

Muestra	X (Conc.) mg/mL	Y (Área) (mv*min)	Promedio Área (mv*min)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
EX-F1	0,25	1007,2	1007,2	39,3	3,9
		1076,2			
		1009,0			
EX-F2	0,50	2326,2	2326,2	93,2	4,0
		2402,4			
		2511,7			
EX-F3	1,00	5489,3	5489,3	254,9	4,6
		5998,7			
		5759,5			
EX-F4	3,00	16125,3	16125,3	451,0	2,8
		16981,5			
		16307,8			
EX-F5	5,00	26702,4	26702,4	363,8	1,4
		26160,9			
		26852,4			
EX-F6	6,00	32446,4	32446,4	1218,8	3,8
		32117,8			
		34373,9			
EX-F7	8,00	41815,2	41815,2	1563,3	3,7
		44898,0			
		42904,7			
EX-F8	10,00	51603,2	51603,2	794,7	1,5
		52789,6			
		53112,3			

Tabla B-25 Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de glucosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua)

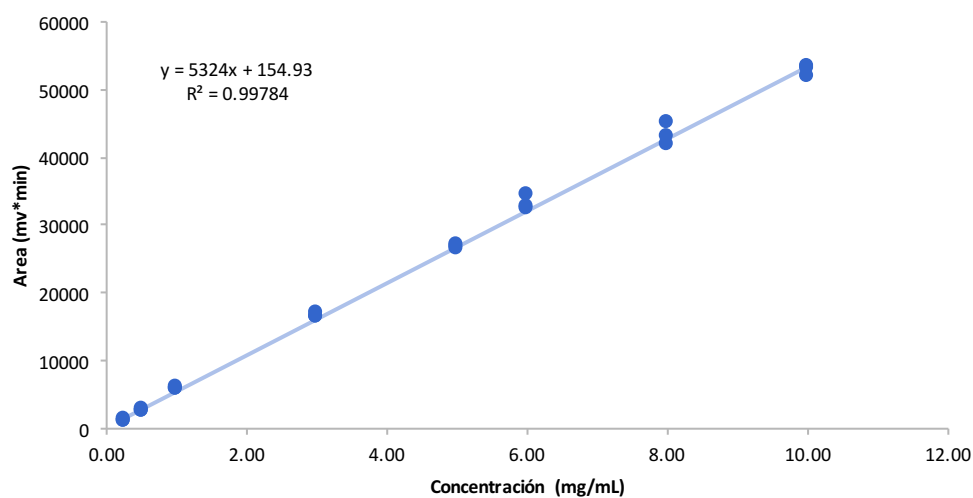
Parámetro	Valor	Hipótesis nula	t _{exp}	t _{tab} (22; 0,05)
Intercepto (a)	154,9	H ₀ : α = 0	0,54	2,0739
Pendiente (b)	5324,0	H ₀ : β = 0	100,82	2,0739
Correlación (r)	0,9978	H ₀ : r = 0	52,65	2,0739

Tabla B-26 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de glucosa en el método 2: Polímero HPMC K15M

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Regresión	1	7902218109	7902218109	10164,26	4,301 (1; 22; 0,05)
Error	22	17103923,8	777451,1		
Desvío de linealidad	6	7160089,6	1193348,3	1,92	2,741 (6; 16; 0,05)
Error puro	16	9943834,2	621489,6		

Figura B-6 Curva de calibración para fructosa en el método 2: Polímero HPMC K15M (agua)

Ecuación de la recta: $y = 5324,0X - 154,93$ ($R^2 = 0,99784$)



Con los resultados del análisis de varianza se concluye que existe proporcionalidad entre las variables concentración y área, al ser el valor de F calculado mayor al F de la tabla para la regresión para todas las matrices evaluadas.

Los resultados del análisis del coeficiente de correlación confirman la correlación lineal existente entre estas dos variables al ser el t calculado mayor al t de la tabla para el coeficiente de correlación.

Para el intercepto y la pendiente, se puede decir que según los valores calculados de t, comparados contra el valor tabulado, se concluye que la pendiente y el intercepto son estadísticamente diferentes de cero, para todas las matrices.

De acuerdo al análisis de linealidad del sistema, la linealidad del método cumple con los parámetros evaluados guardando relación lineal entre las concentraciones de Fructosa y Glucosa obtenidas para cada nivel de concentración.

La curva de calibración trazada demuestra la linealidad por la relación existente entre la concentración y la respuesta en unidades de área bajo la curva, tanto para el sistema, como para las matrices evaluadas.

4.5 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. Se define como la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco.

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, es decir es aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco, o la señal de fondo.

Estos límites se determinaron con las 3 concentraciones más bajas de las curvas de calibración elaboradas (0,25; 0,50 y 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

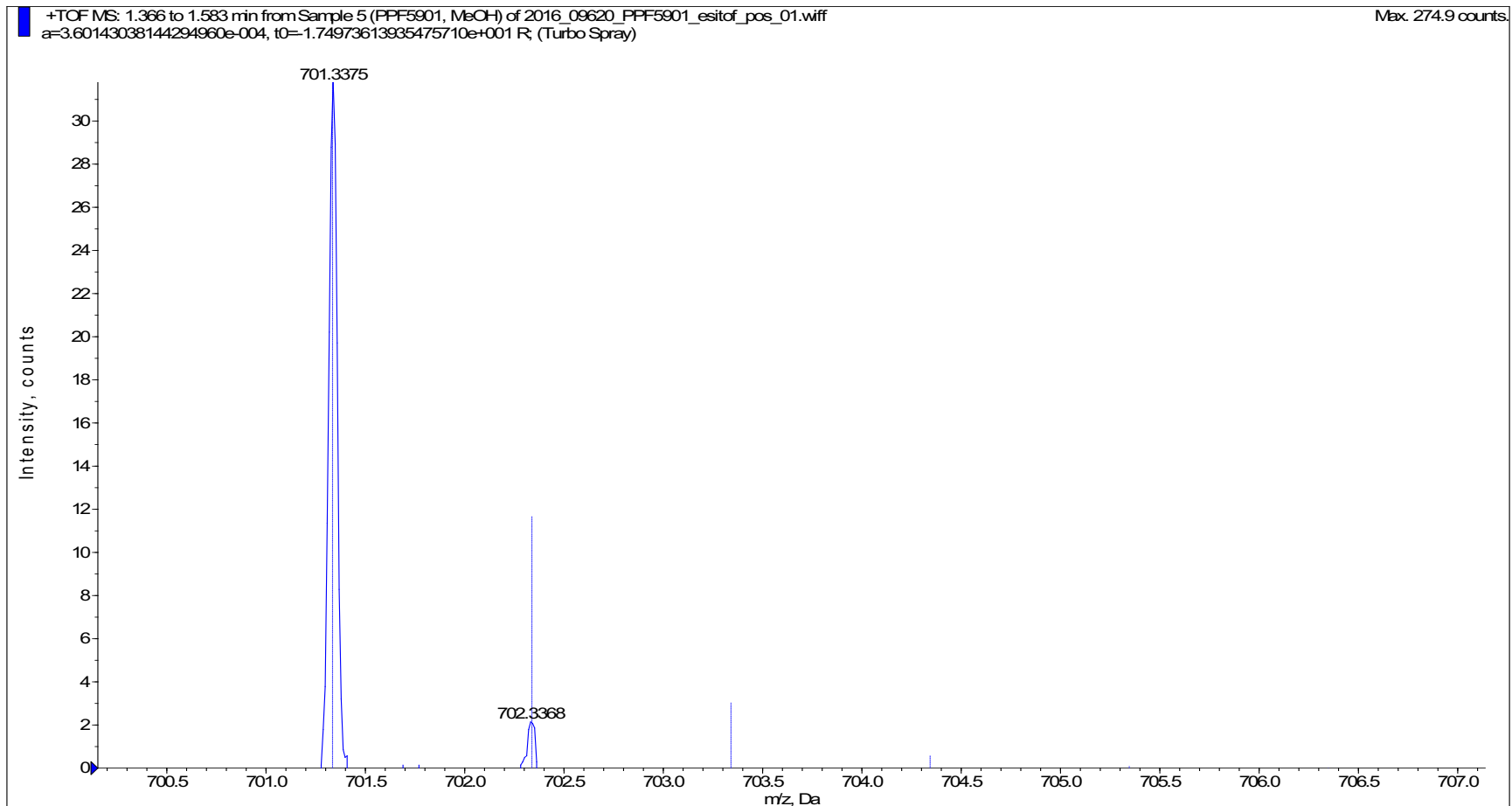
Tabla B-27 Limite de detección y límite de cuantificación para cada uno de los marcadores analíticos

Parámetro	Fructosa	Glucosa
Sa	163,4	128,6
A	-0,9	-4,4
B	4771,16	5207,2
LD (mg/mL)	0,021	0,015
LC (mg/mL)	0,068	0,049

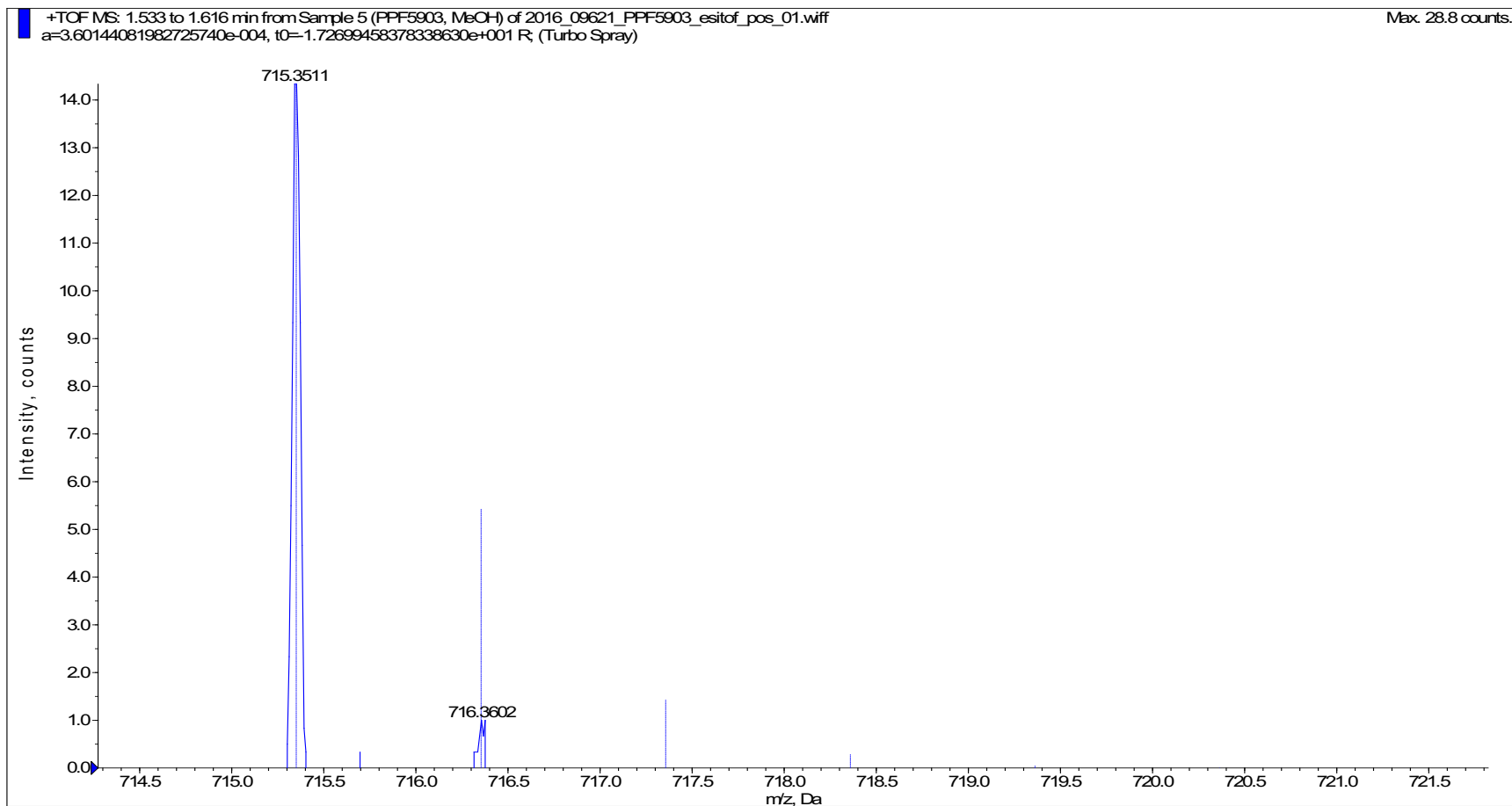
Los límites de cuantificación y detección fueron de 0,068 y 0,021 mg/mL para fructosa y 0,049 y 0,015 mg/mL para glucosa, respectivamente.

Anexo C Espectros de masas obtenidos para cada uno de los compuestos purificados

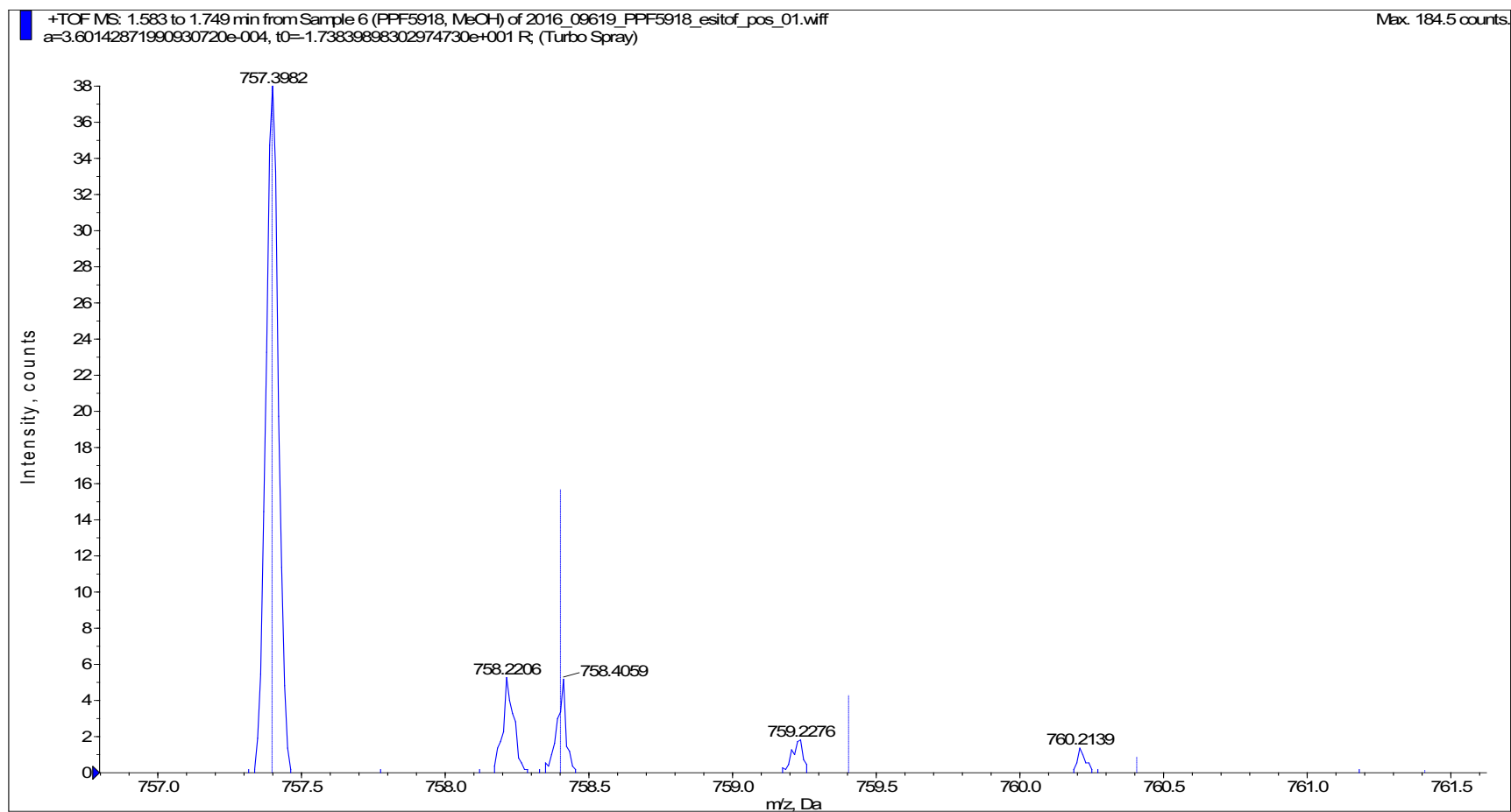
1. Espectro de masas en modo positivo del compuesto P1 (Peruviosido C)



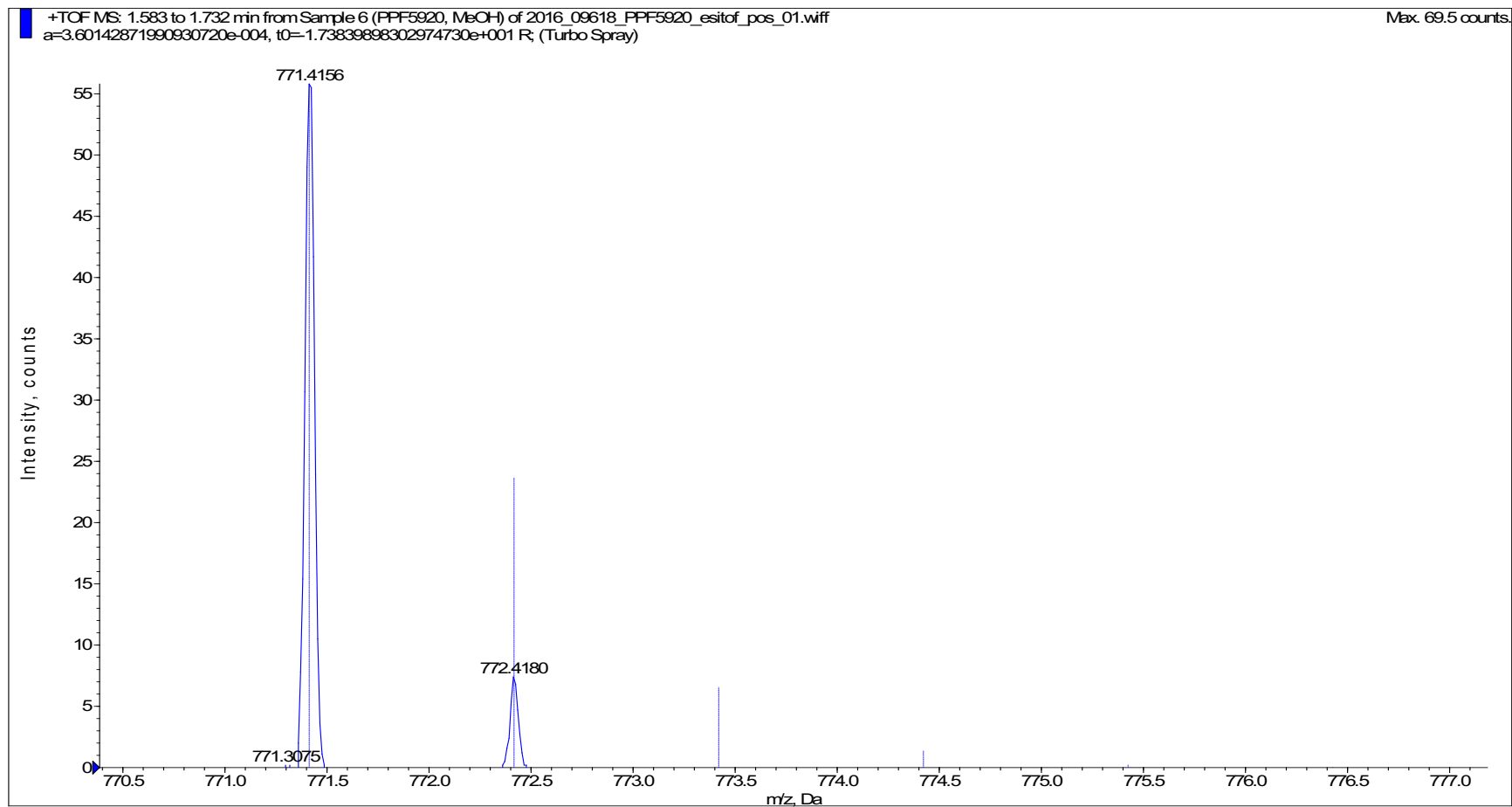
2. Espectro de masas en modo positivo del compuesto P2 (Peruviósido D)



3. Espectro de masas en modo positivo del compuesto P3 (Peruviósido E)

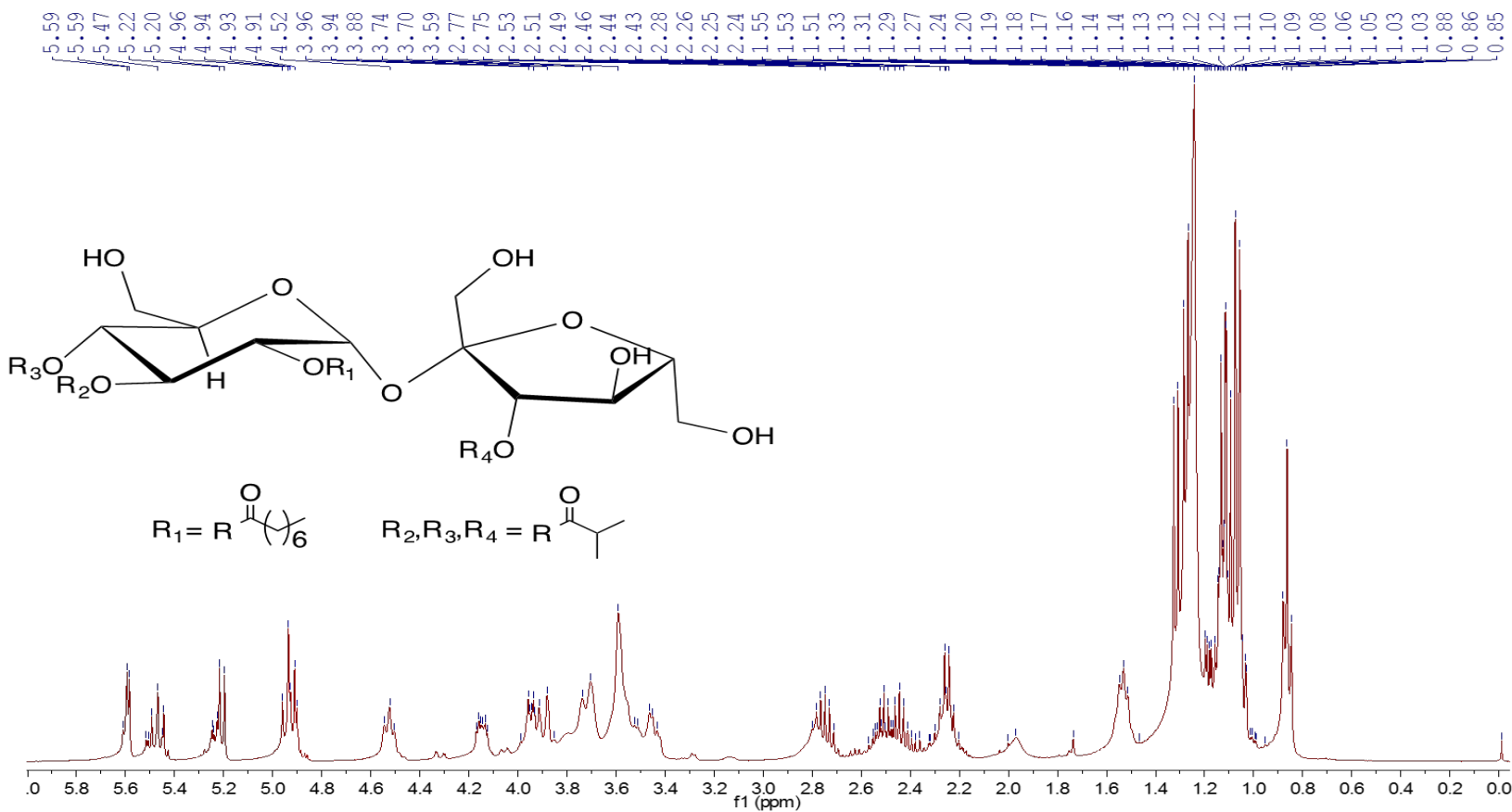


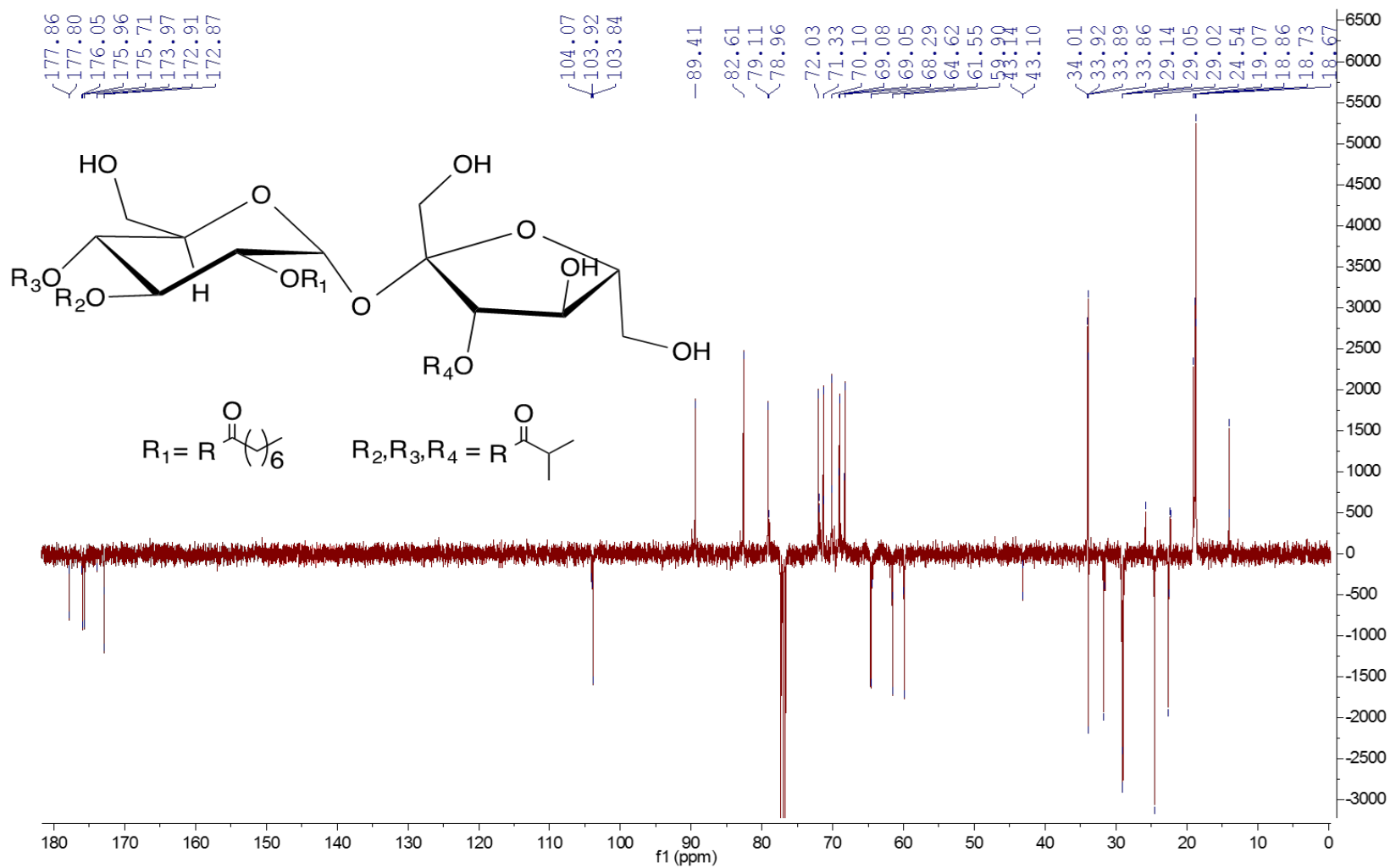
4. Espectro de masas en modo positivo del compuesto P4 (Peruviósido F)

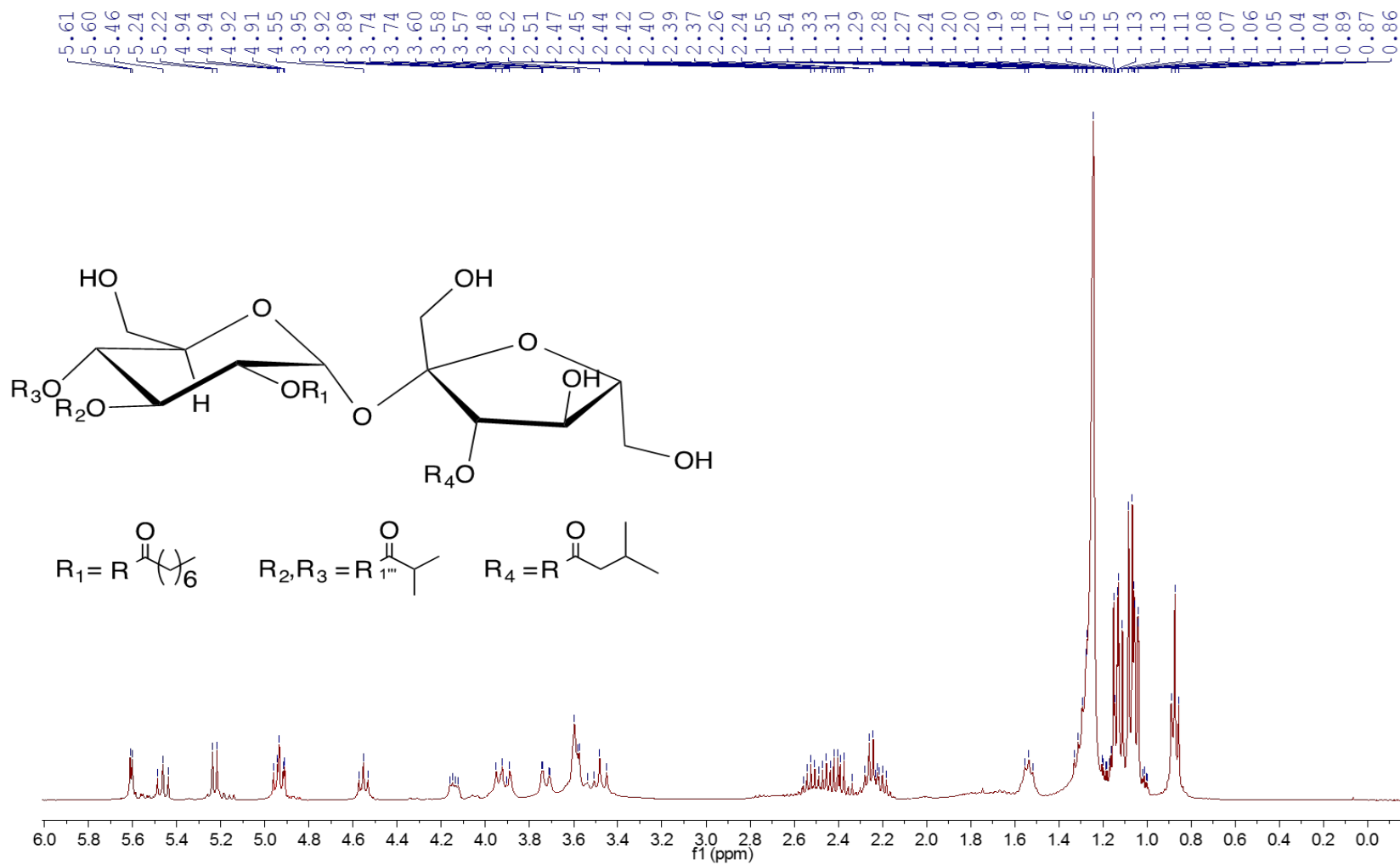


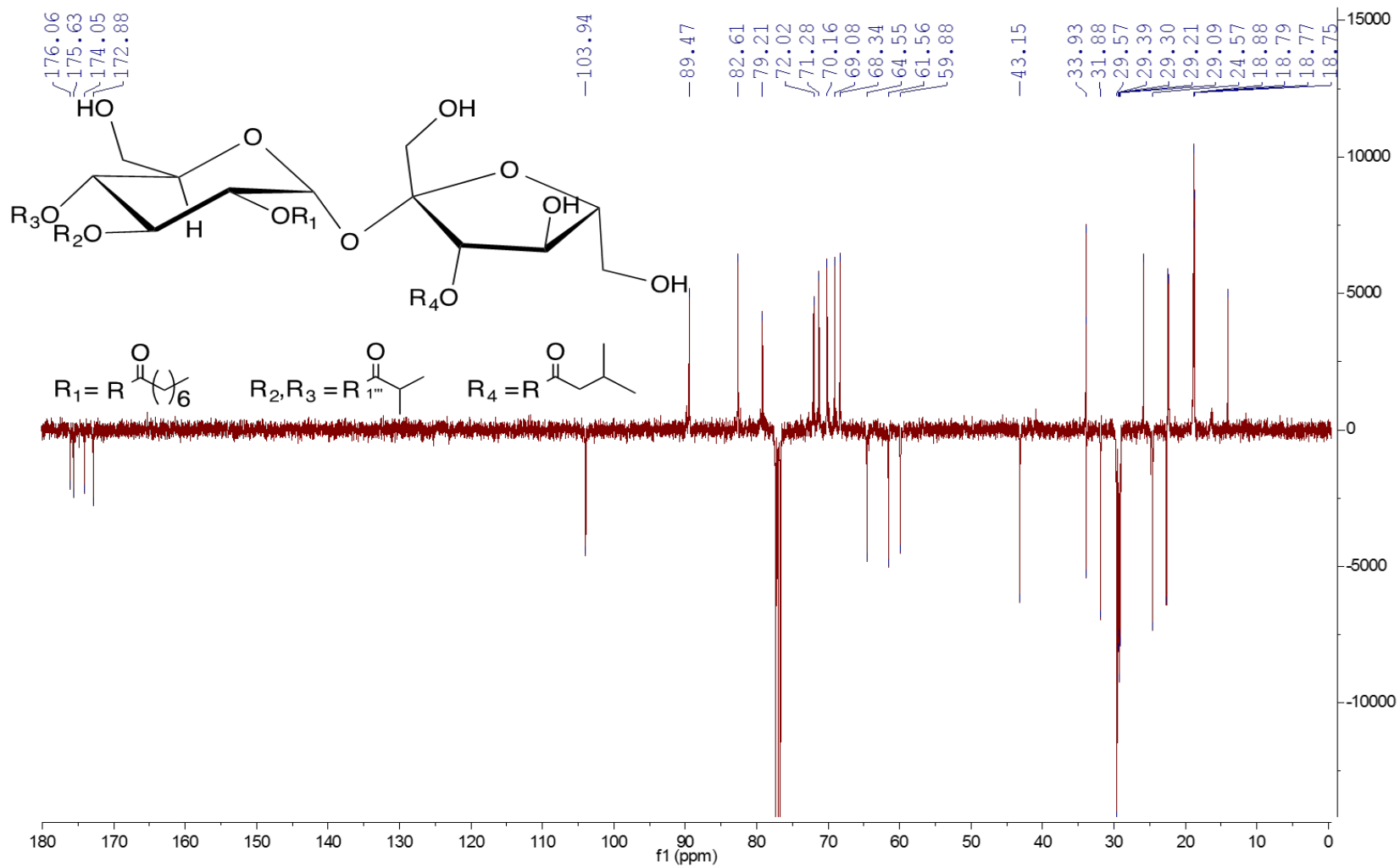
Anexo D Espectros RMN obtenidos para cada uno de los compuestos purificados

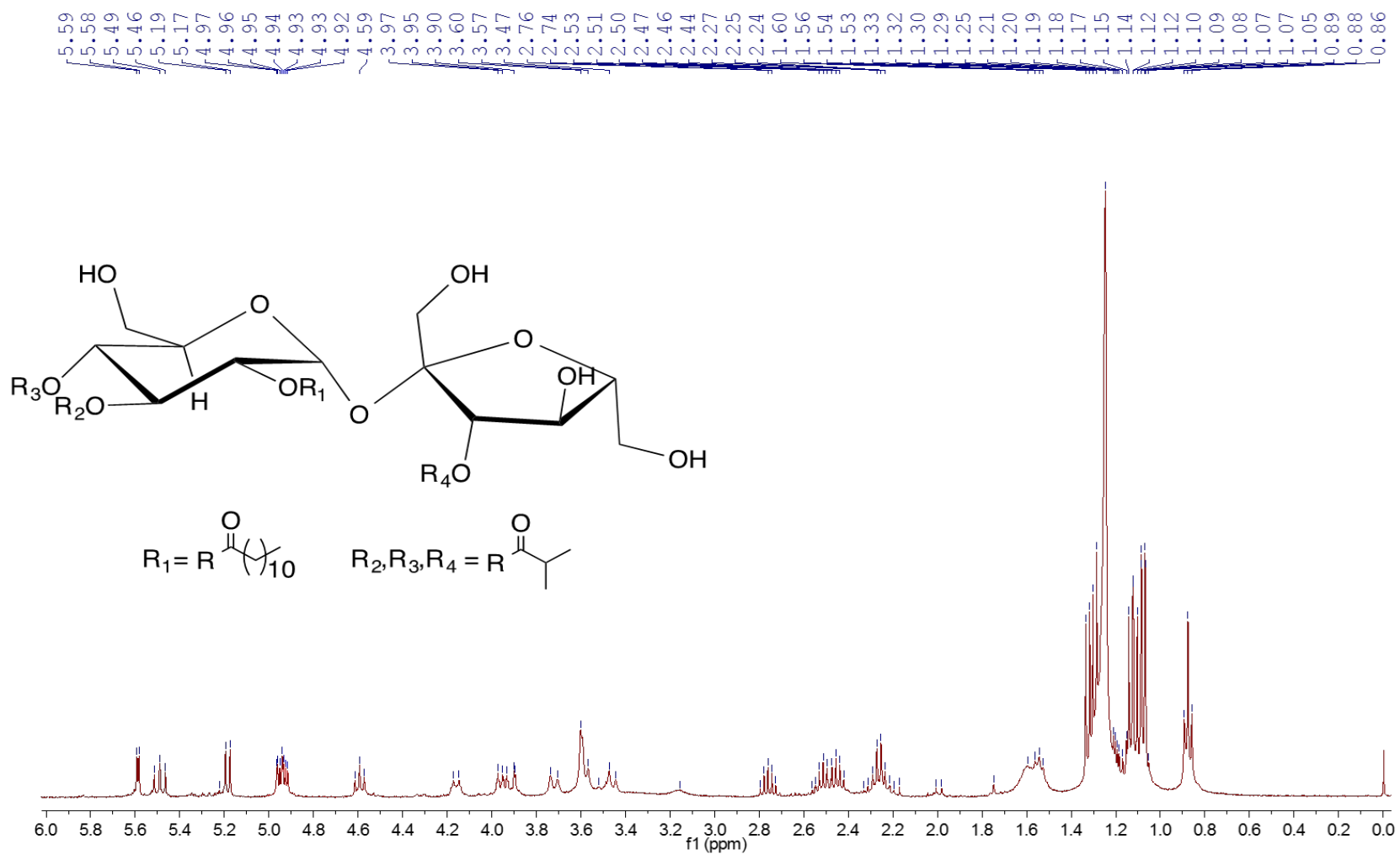
Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ del compuesto P1

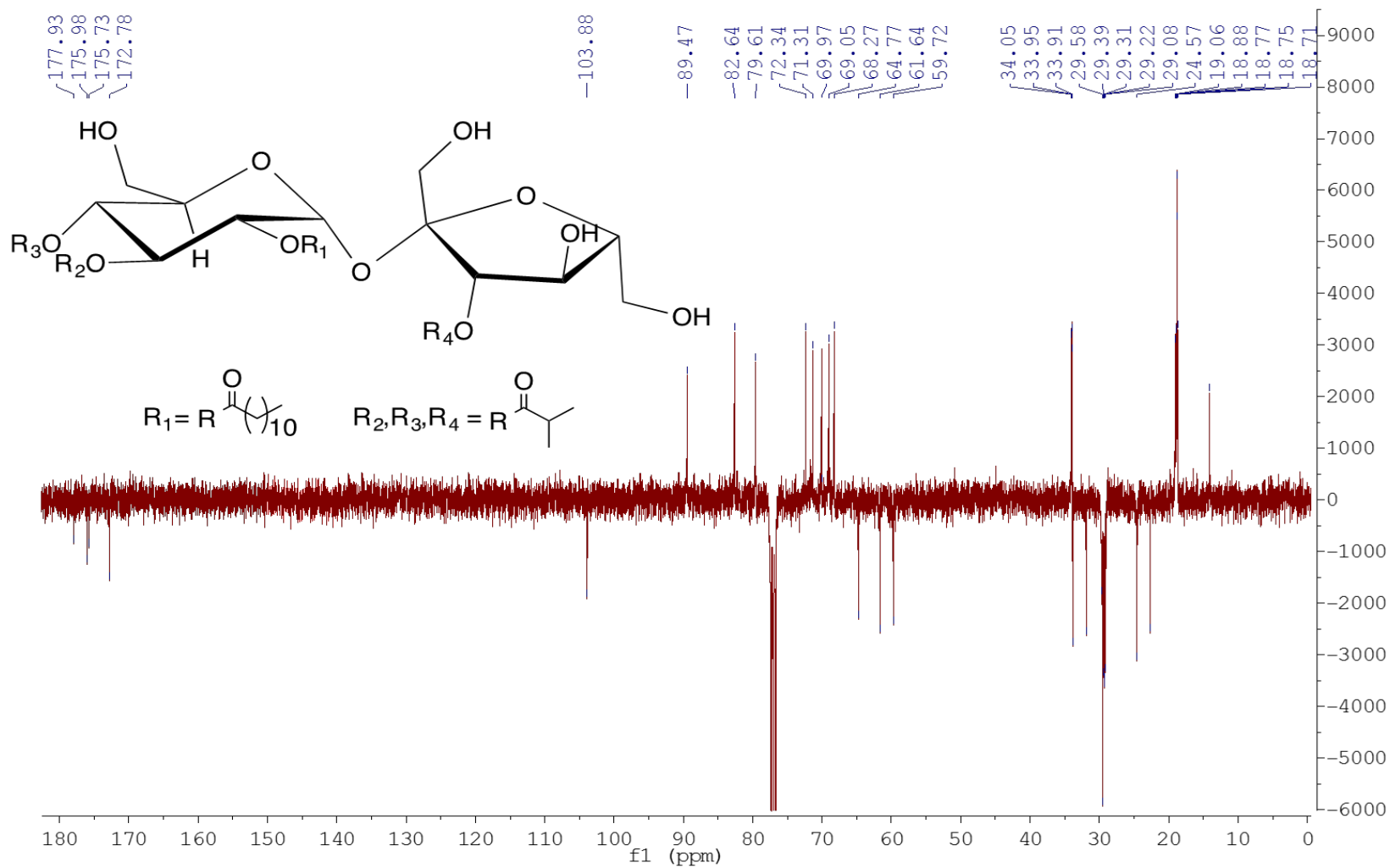


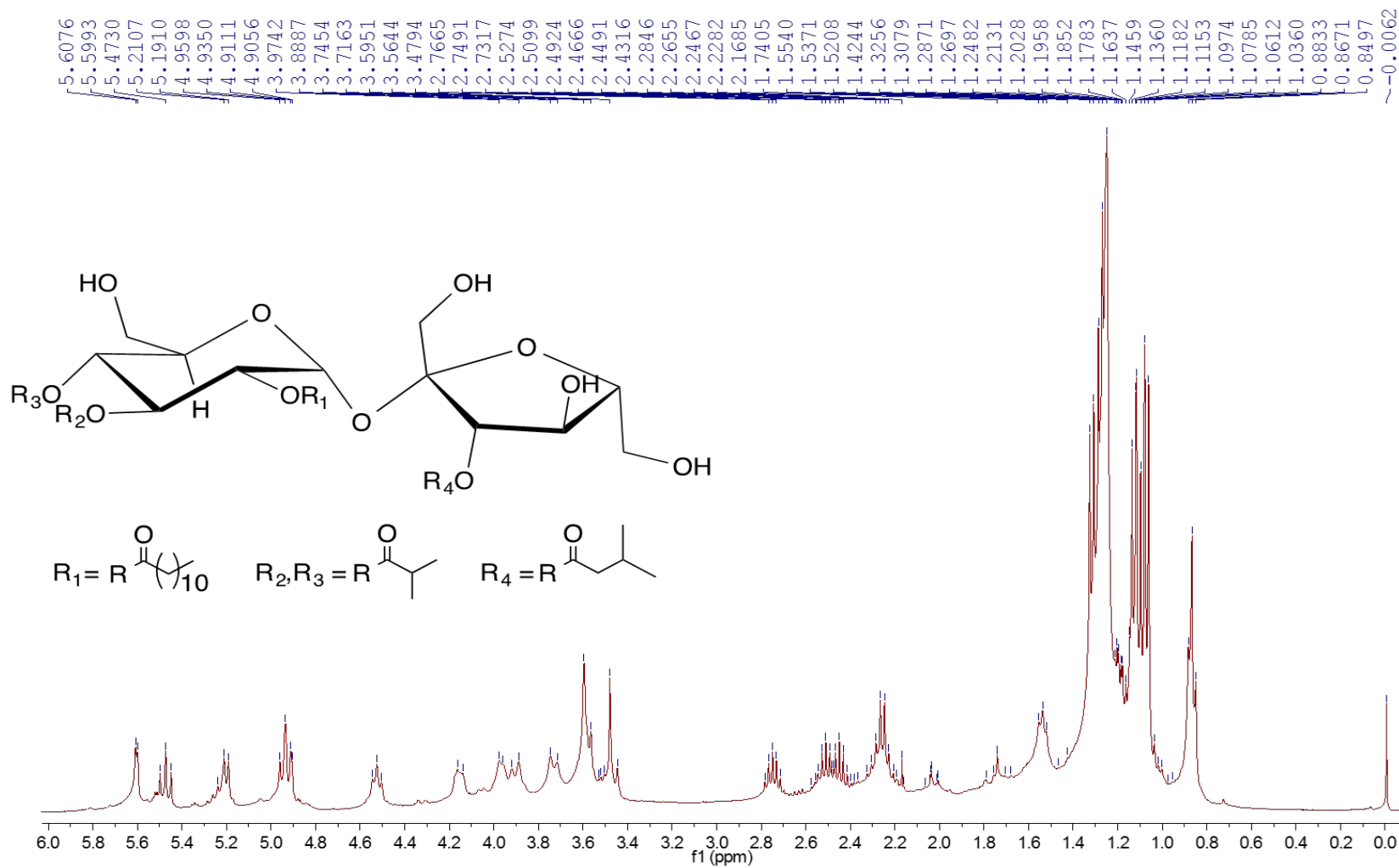
Espectro de RMN-¹³C en CDCl₃ del compuesto P1

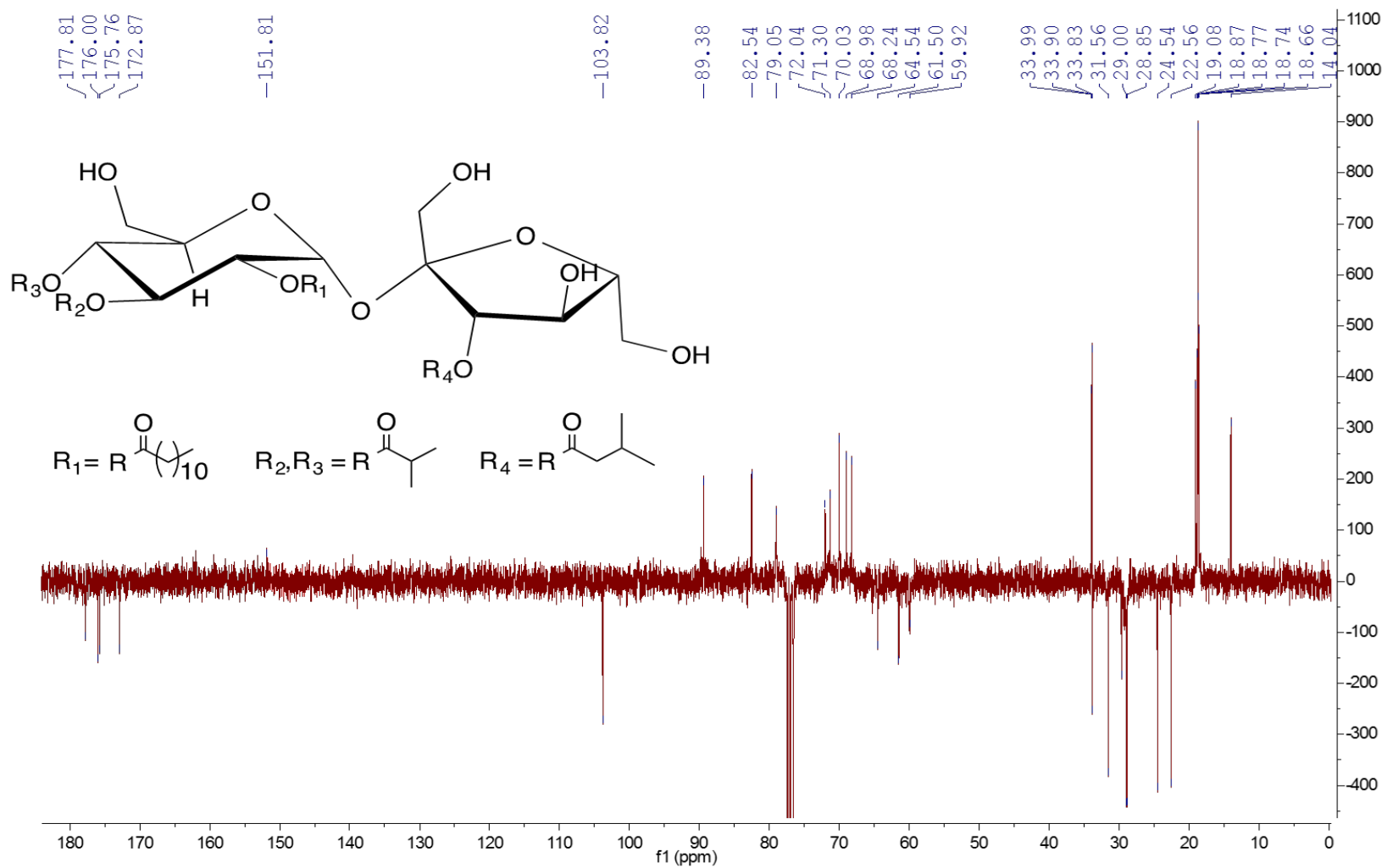
Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ del compuesto P2

Espectro de RMN-¹³C en CDCl₃ del compuesto P2

Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ del compuesto P3

Espectro de RMN-¹³C en CDCl₃ del compuesto P3

Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ del compuesto P4

Espectro de RMN-¹³C en CDCl₃ del compuesto P4

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud (OMS), Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014- 2023. Ginebra; 2013.
2. Sharapin N, Machado Rocha L, Carvalho ES. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello : CYTED; 2000.
3. Bonati A. Formulation of plant extracts into dosage forms. Press CRC, editor. Boca Raton: CRC Press; 1991.
4. Simonsen T, Aarbakke J, Kay I, Coleman I, Sinnot P, Lysaa R. Farmacología para licenciados en enfermería. 2da ed. México D.F.: Manual Moderno; 2009.
5. Isaza CA, Isaza G, Fuentes J, Marulanda T. Fundamentos de farmacología terapéutica. 4ta. ed. Pereira, Colombia: Postergraph; 2002.
6. International Diabetes Federation (IDF), Diabetes on the increase but health expenditures remain low 2011 [cited 2013 Noviembre de 2013]. Available from: <http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/SACA-Press-Release-WDD.pdf>.
7. International Diabetes Federation (IDF), Global Diabetes Plan 2011-2021. Bruselas, Bélgica, 2010.
8. International Diabetes Federation (IDF), Strategic Implementation Plan 2016-17. Bruselas, Bélgica, 2015.
9. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology. 2005;99(3):325–48.
10. Witters L. The blooming of the French lilac. Journal of Clinical Investigation. 2001;108(8): 1105–7.
11. Kripalani S, Yao X, Haynes R. Interventions to enhance medication adherence in chronic medical conditions: a systematic review. Archives of Internal Medicine. 2007;167(6):540-50.
12. Castellano-Muñoz P, Miranda-Ruiz A, Sojo-González G, Perea-Milla E, García-Alegria JJ, Dolores Santos-Rubio M. Adherencia al tratamiento farmacológico en pacientes ancianos tras el alta hospitalaria. Enfermería Clínica. 2008;18(3):120-6.

13. Saini Sd Fau - Schoenfeld P, Schoenfeld P Fau - Kaulback K, Kaulback K Fau - Dubinsky MC, Dubinsky MC. Effect of medication dosing frequency on adherence in chronic diseases. *American Journal of Managed Care*. 2009;15(6):e22-33.
14. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Colombia: Ministerio de la Protección Social de Colombia; 2008.
15. Bula Tobon JM. Comprobación de la actividad hipoglicemiante por vía oral de *Physalis peruviana* [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia; 1993.
16. García Ruiz AT, Súa Tunjano SY. Evaluación de la actividad hipoglicemiante de algunas fracciones obtenidas de frutos de *Physalis peruviana* [Tesis de Grado]. Santafé de Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1997.
17. Wu SJ, Tsai JY, Chang SP, Lin DL, Wang SS, Huang SN, et al. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;108(3):407-13.
18. Mora Huertas AC. Evaluación del efecto de los frutos de *Physalis peruviana* sobre el estrés oxidativo en un modelo de diabetes experimental [Tesis de Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
19. Wijesekera ROB. The medicinal plant industry. Boca Raton: CRC Press; 1991.
20. List PH, Schmidt PC. *Phytopharmaceutical technology*. Boca Ratón, Florida: CRC Press; 1989.
21. Rodríguez D, Espitia M, Caicedo YE, Cordoba YE, Baena Y, Mora CE. Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 2005;34(2):140-6.
22. Rodríguez Sanchez D, Espitia Useche M, Mora Huertas CE. Evaluación de las propiedades farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y su aplicación como diluyente en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas [Tesis de Grado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2002.
23. Aulton ME. *Aulton's pharmaceuticals the design and manufacture of medicines*. 3rd ed. Edinburgh New York, United States: Churchill Livingstone; 2007.
24. Carstensen JT. *Pharmaceutics of solids and solid dosage forms*. 1st ed. New York, United States: John Wiley; 1977.
25. ICH. *Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products, Q1B*. Geneva, Switzerland: ICH; 1996.
26. Bernal Rodríguez CA. Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico [Tesis de Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012.

27. Chandira M, Jayakar B. Formulation and evaluation of herbal tablets containing *Ipomea digitata* Linn. extract. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research. 2010;3(1):101-10.
28. Shivanand P, Viral D, Manish G, Subhash V, Jaganathan K. Formulation and evaluation of *Cedrus deodara* loud extract. International Journal of ChemTech Research. 2009;1(4): 1145-52.
29. Bernal C-A, Aragón M, Baena Y. Dry powder formulation from fruits of *Physalis peruviana* L. standardized extract with hypoglycemic activity. Powder Technology. 2016;301:839–47.
30. Viyoch J, Sudedmark T, Srema W, Suwongkrua W. Development of hydrogel patch for controlled release of alpha-hydroxy acid contained in tamarind fruit pulp extract. International Journal of Cosmetic Science. 2005;27(2):89-99.
31. Viyoch J, Patcharaworakulchai P, Songmek R, Pimsan V, Wittaya-Areekul S. Formulation and development of a patch containing tamarind fruit extract by using the blended chitosan-starch as a rate-controlling matrix. International Journal of Cosmetic Science. 2003;25(3):113-25.
32. El-Samaligy MS, Afifi NN, Mahmoud EA. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and *in vivo* performance. International Journal of Pharmaceutics. 2006;319(1–2):121-9.
33. Sinico C, De Logu A, Lai F, Valenti D, Manconi M, Loy G, et al. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005;59(1):161-8.
34. 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 PharmSciTech. 2010;11(3):1350-8.
35. Panda VS, Naik SR. Cardioprotective activity of *Ginkgo biloba* Phytosomes in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats: A biochemical and histoarchitectural evaluation. Experimental and Toxicologic Pathology. 2008;60(5):397-404.
36. 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 and Chemical Toxicology. 2008;46(5):1771-7.
37. Prabakar K, Sivalingam P, Mohamed Rabeek SI, Muthuselvam M, Devarajan N, Arjunan A, et al. Evaluation of antibacterial efficacy of phyto fabricated silver nanoparticles using *Mukia scabrella* (Musumusukkai) against drug resistance nosocomial gram negative bacterial pathogens. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013;104:282-8.
38. Su YL, Fu ZY, Zhang JY, Wang WM, Wang H, Wang YC, et al. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. Powder Technology. 2008;184(1):114-21.
39. Shimada S, inventor. Composition comprising nanoparticle *Ginkgo biloba* extract with the effect of brain function activation. United States patent 20080254126. 2008.

40. Esmaeili A, Asgari A. *In vitro* release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules. 2015;81:283–90.
41. Zamarioli CM, Martins RM, Carvalho EC, Freitas LAP. Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): development of topical delivery formulation. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2015;25(1):53–60.
42. Arana L, Salado C, Vega S, Aizpurua-Olaizola O, Arada Idl, Suarez T, et al. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015;135:18–26.
43. Zhao Y, Wang C, Chow AHL, Ren K, Gong T, Zhang Z, et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. International Journal of Pharmaceutics. 2010;383(1-2):170-7.
44. Gumus ZP, Guler E, Demir B, Barlas FB, Yavuz M, Colpankan D, et al. Herbal infusions of black seed and wheat germ oil: Their chemical profiles, *in vitro* bio-investigations and effective formulations as phyto-nanoemulsions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015;133:73–80.
45. Pinto NdOF, Rodrigues THS, Pereira RdCA, Silva LMAe, Cáceres CA, Cordeiro de Azeredo HM, et al. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Industrial Crops and Products. 2016;86:279–88.
46. Esfanjani AF, Jafari SM, Assadpoor E, Mohammadi A. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. Journal of Food Engineering. 2015;165:149–55.
47. Gavini E, Alamanni MC, Cossu M, Giunchedi P. Tableted microspheres containing *Cynara scolymus* (var. Spinoso sardo) extract for the preparation of controlled release nutraceutical matrices. Journal of Microencapsulation. 2005;22(5):487-99.
48. Cujic N, Trifkovic K, Bugarski B, Ibric S, Pljevljakusi D, Savikin K. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. Industrial Crops and Products. 2016;86:120–31.
49. Klein T, Longhini R, Bruschi ML, de Mello JCP. Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2015 25 (3):292–300.
50. Zu C, Zhao X, Dua X. Enhanced water-solubility of Licorice extract microparticle prepared by antisolvent precipitation process. Advanced Powder Technology. 2014;25(2):787–94.
51. Mulham A, Kausar A, Farahidah M. Microencapsulation of *Cassia alata*: Fabrication and characterization. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012;4(4):219-24.

52. Seemanchala R, Bijan Kumar G, NripendraNath B. Microencapsulation of a mixture of herbal extracts by non solvent addition method. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(4):572-81.
53. Belščak-Cvitanovića A, Bušića A, Barišića L, Vrsaljko D, Karlovića S, Špoljarić I, et al. Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids*. 2016;57:139–52.
54. Nalawade PB, Gajjar AK. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016;33:75-87.
55. Arriola NDA, Medeiros PMd, Prudencio ES, Müller CMO, Amboni RDdMC. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Bioscience*. 2016;13:32–40.
56. Sansone F, Picerno P, Mencherini T, Porta A, Lauro MR, Russo P, et al. Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. *Journal of Food Engineering*. 2014;120:260–7.
57. Wang W, Kang Q, Liu N, Zhang Q, Zhang Y, Li H, et al. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of *Ginkgo biloba* extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion. *Fitoterapia*. 2015;102:189–97.
58. Mekjaruskul C, Yang Y-T, Leed MGD, Sadgrove MP, Jay M, Sripanidkulchai B. Novel formulation strategies for enhancing oral delivery of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* by SMEDDS or complexation with 2-hydroxypropyl-cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;445(1-2):1– 11.
59. Thitilertdecha P, Rowan MG, Guy RH. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant – *Clerodendrum petasites* S. Moore. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;478(1):39–45.
60. Ávila PHMd, Ávila RId, Filho EXdS, Bastos CCC, Batista AC, Mendonça EF, et al. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Toxicology Reports*. 2015;2:563–73.
61. Sterer N, Nuas S, Mizrahi B, Goldenberg C, Weiss EI, Domb A, et al. Oral malodor reduction by a palatal mucoadhesive tablet containing herbal formulation. *Journal of Dentistry*. 2008;36(7):535-9.
62. Gallo L, Piña J, Bucalá V, Allemandi D, Ramírez-Rigo MV. Development of a modified-release hydrophilic matrix system of a plant extract based on co-spray-dried powders. *Powder Technology*. 2013;241(1):252-62.
63. Suksaeree J, Charoenchai L, Madaka F, Monton C, Sakunpak A, Charoonratana T, et al. *Zingiber cassumunar* blended patches for skin application: Formulation, physicochemical properties, and in vitro studies. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015 (10):341-9.

64. Marquele-Oliveira F, Torres EC, Barudb HdS, Zoccal KF, Faccioli LH, Hori JI, et al. Physicochemical characterization by AFM, FT-IR and DSC and biological assays of a promising antileishmania delivery system loaded with a natural Brazilian product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;123:195–204.
65. Ajazuddin, Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010;81(7):680-9.
66. Noriega P, Ropke CD, Consiglieri VO, Taqueda MES, Tavares LC, Wasicky A, et al. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;353(1-2):149-59.
67. Golestani MR, Rad M, Bassami M, Afkhami-Goli A. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7. *Life Sciences*. 2015;135:22–6.
68. Ordoñez AAL, Ordoñez RM, Zampini IC, Isla MI. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;378(1-2):51-8.
69. Yu YL, Lu Y, Tang X, Cui FD. Formulation, preparation and evaluation of an intravenous emulsion containing *Brucea javanica* oil and Coix Seed oil for anti-tumor application. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008;31(4):673-80.
70. Xu J, Fan Q-J, Yin Z-Q, Li X-T, Du Y-H, Jia R-Y, et al. The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and other formulations *in vitro*. *Veterinary Parasitology*. 2010;169(3):399-403.
71. Moghimipour E, Ameri A, Saudatzadeh A, Salimi A, Siahpoosh A. Formulation of an Anti-dermatophyte Cream from Hydro-alcoholic Extract of *Eucalyptus camaldulensis* Leaves. *Jundishapur Journal of Pharmaceutical Natural Products*. 2009;4(1):32-40.
72. Costa SCC, Detoni CB, Branco CRC, Botura MB, Branco A. *In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25 (4):413–8.
73. Vijayalakshmi A, Tripura A, Ravichandiran V. Development and evaluation of anti-acne products from *Terminalia arjuna* Bark. *International Journal of ChemTech Research*. 2011;3(1):320-7.
74. Shantanu K, Gunratna G, Nakul C. Formulation and *in-vitro* evaluation of *Moringa concanensis*, Nimmo. seed oils sunscreen cream. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(3):2060-2.
75. Shantanu K, Ghoge P, Ansari A, Waje A, Sonawane A. Formulation and *in-vitro* determination of sun protection factor of *Nigella sativa* Linn. seed oil sunscreen cream. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(4):2194-7.

76. Chen F, Li S, Li D, Ding J-S. Transdermal behaviors comparisons among *Evodia rutaecarpa* extracts with different purity of evodiamine and rutaecarpine and the effect of topical formulation *in vivo*. *Fitoterapia*. 2012;83(5):954-60.
77. Soisuwan S, Mapaisansin W, Samee W, Brantner AH, Kamkaen N. Development of Peacock flower extract as anti-wrinkle formulation. *Journal of Health Research*. 2010;24(1):29-34.
78. Hoepers SM, Souza HGMTd, Quintão NLM, Santin JR, Filho VC, Silva RML, et al. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. Willd (Euphorbiaceae) leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;173:251–5.
79. Mishra AP, Saklan S, Milella L, Tiwar P. Formulation and evaluation of herbal antioxidant face cream of *Nardostachys jatamansi* collected from Indian Himalayan region. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(2):S679-S82.
80. More B, Sakharwade S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of herbal gel contains the flower extract of *Butea monosperma*. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(5):650-60.
81. Sudipta D, Pallab H, Goutam P. Formulation and evaluation of herbal gel containing *Clerodendron infortunatum* leaves extract. *International Journal of PharmTech Research*. 2011;3(1):140-3.
82. Mishra US, Murthy PN, Mishra D, Sahu KC. Formulation and standardisation of herbal gel containing methanolic extract of *Calophyllum inophyllum*. *American Journal of PharmTech Research*. 2011;1(4):276-89.
83. Jambaninj D, Sulaiman SA, Gillani SW, Davaasuren TS, Erdenetsetseg G, Dungerej D. Technological study of preparing gel from semi-solid extract of *Cacalia hastata* L. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2012;3(1):25-9.
84. Das K, Dang R, Machale M. Formulation and Evaluation of A Novel Herbal Gel Of Stevia Extract. *Iranian Journal of Dermatology*. 2009;12:117-22.
85. Anurag S, Sumeet D, Ganesh PM, Hemant J. Formulation and evaluation of herbal gel containing extracts of *Albezia Lebbeck* linn. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(4):662-8.
86. Barreira JCM, Rodrigues S, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application: Evaluation of antioxidant activity of the final formulations. *Industrial Crops and Products*. 2013;42:175–80.
87. Manca ML, Zaru M, Bacchetta G, Biggio T, Cappai N, Cabras A, et al. A new technological approach to improve the efficacy of a traditional herbal medicinal product in wound healing. *Industrial Crops and Products*. 2015;63:71–8.
88. Nitin G, Surendra G, Shailesh C. Design, development and evaluation of oral herbal formulations of *Piper nigrum* and *Nyctanthes arbortristis*. *International Journal of PharmTech Research* 2010;2(1):171-6.

89. Dosani MA, Sakarkar DM, Kosalge SB, Sheikh S. Formulation development and evaluation of unit moulded herbal semisolid jelly useful in treatment of mouth ulcer. *International Journal of PharmTech Research*. 2011;3(3):1705-13.
90. Rongsriyam Y, Trongtokit Y, Komalamisra N, Sinchaipanich N, Apiwathnasorn C, Mitrejet A. Formulation of tablets from the crude extract of *Rhinacanthus nasutus* (Thai local plant) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae: a preliminary study. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2006;37(2):265-71.
91. Gallo L, Ramirez-Rigo MV, Piña J, Palma S, Allemandi D, Bucalá V. *Valeriana officinalis* Dry plant extract for direct compression: Preparation and characterization. *Scientia Pharmaceutica*. 2012;80 (4):1013-26.
92. Palma S, Luján C, Llabot JM, Barboza G, Manzo RH, Allemandi DA. Design of *Peumus boldus* tablets by direct compression using a novel dry plant extract. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;233(1-2):191-8.
93. Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Dry plant extracts loaded on fumed silica for direct compression: preparation and preformulation. *Pharmaceutical Development and Technology*. 1999;4(4):523-30.
94. Ganapaty S, Ramaiah M, Ramakrishna P, Reddy DN. Scientific validation and formulation of three Indian Folklore medicinal plants. *Journal of Pharmacy Research*. 2013;6(8):823–35.
95. Wu J, Yang C, Rong Y, Wang Z. Preparation and nutritional characterization of Perilla chewable Tablet. *Procedia Engineering*. 2012;37:202-7.
96. Araújo-Júnior CAd, Costa FSdO, Taveira SF, Marreto RN, Valadares MC, Lima EM. Preparation of pellets containing *Pothomorphe umbellata* extracts by extrusion-spheronization: improvement of 4-nerolidylcatechol photostability. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2013;23(1):169-74.
97. Shanish AA, Nehru SSC, Vijaya SS, Rao YB, Jayasankar K. Formulation and evaluation of a polyherbal formulation (lacto-4) for its galactogogue activity in wistar rats. *International Journal of PharmTech Research*. 2012;4(2):554-60.
98. Vyas T, Dash RP, Anandjiwala S, Nivsarkar M. Formulation and pharmacokinetic evaluation of hard gelatin capsule encapsulating lyophilized Vasa Swaras for improved stability and oral bioavailability of vasicine. *Fitoterapia*. 2011;82(3):446-53.
99. Ma H. The formulation, manufacture and evaluation of capsules containing freeze-dried aqueous extracts of *Leonotis leonorus* or *Mentha longifolia* [Master Thesis]. Bellville, South Africa,,: The University Of The Western Cape; 2006.
100. Soonwera M, Phasomkusolsil S. Efficacy of Thai herbal essential oils as green repellent against mosquito vectors. *Acta Tropica*. 2015;142:127–30.
101. Chokshi K, Ladola D, Suthar J, Solanki A, Patel S, Ahir K. To Prepare a Poly Herbal Formulation Containing *Pluchea lanceolata* and *Vitex negundo* and Evaluate its Anti-

Inflammatory Activity by Topical Application. American Journal of PharmTech Research. 2012;2(4):755-60.

102. Toro Arango RM. Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana* [Tesis de Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014.

103. Correa J, Bernal H. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. SECAB, editor. Santafe de Bogotá, Colombia 1992.

104. Zárate S CE, Polanía F MdR, Calderón Gómez E. Análisis fitoquímico del fruto de la *Physalis peruviana* [Tesis de Grado]. Colombia, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1974.

105. García Barriga H. Flora medicinal de Colombia botánica médica. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia; 1974.

106. Romero Castañeda R. Frutas silvestres de Colombia. 2. ed. Bogotá: Instituto Colombiano de Cultura Hispánica; 1991.

107. Pérez Arbeláez E. Plantas útiles de Colombia. 5a. ed. Santafé de Bogotá: Dama: Fen : Jardín Botánico José Celestino Mutis; 1996.

108. Wikipedia. *Physalis peruviana*, 3rd November, 2016 https://en.wikipedia.org/wiki/Physalis_peruviana_-_media/File:Uchuva_2005.jpg.

109. Morton JF. Fruits of Warm Climates. Miami, Florida: Creative Resorces Systems, Inc.; 1987.

110. Hernández Mesa M. Plantas colombianas su aplicación medicinal. Bogotá, Colombia: Banco Popular. Fondo de Promoción de la Cultura; 1992.

111. Ospina LF, Pinzón R. Plantas usadas como antidiabéticas en la medicina popular Colombiana. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 1995;23(1):81-94.

112. Pardo Muñoz JM. Determinación de la actividad farmacológica de los frutos de la *Physalis peruviana* en ojos de conejo [Tesis de Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2005.

113. García Mahé MC, Lozano Ruíz AA. Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de los cálices de *Physalis peruviana* L [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2002.

114. Wu S-J, Ng L-T, Huang Y-M, Lin D-L, Wang S-S, Huang S-N, et al. Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2005;28(6):963-6.

115. Baumann TW, Meier CM. Chemical defence by withanolides during fruit development in *Physalis peruviana*. Phytochemistry. 1993;33(2):317-21.

116. Franco Ospina LA. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de *Physalis peruviana* [Tesis de Doctorado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2006.

117. Ascher KRS, Nemny NE, Eliyahu M, Kirson I, Abraham A, Glotter E. Insect antifeedant properties of withanolides and related steroids from Solanaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1980;36(8):998-9.
118. Glotter E, Abraham A, Gunzberg G, Kirson I. Naturally occurring steroidal lactones with a 17 α -oriented side chain. Structure of withanolide E and related compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1977:341-6.
119. Bagchi A, Neogi P, Sahai M, Ray AB, Oshima Y, Hikino H. Withaperuvin E and nicandrin B, withanolides from *Physalis peruviana* and *Nicandra physaloides*. *Phytochemistry*. 1984;23(4):853-5.
120. Fang ST, Liu JK, Li B. A novel 1,10-seco withanolide from *Physalis peruviana*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2010;12(7):618-22.
121. Frolow F, Ray AB, Sahai M, Glotter E, Gottlieb HE, Kirson I. Withaperuvin and 4-deoxyphysalolactone, two new ergostane-type steroids from *Physalis peruviana* (Solanaceae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1981:1029-32.
122. Neogi P, Sahai M, Ray AB. Withaperuvins F and G, two withanolides of *Physalis peruviana* roots. *Phytochemistry*. 1986;26(1):243-7.
123. Oshima Y, Hikino H, Sahai M, Ray AB. Withaperuvin H, a withanolide of *Physalis peruviana* roots. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1989 (10):628-9.
124. Sahai M, Meogi P, Ray AB, Oshima Y, Hikino H. Structure of Withaperuvina B and C, Withanolides of *Physalis peruviana* roots. *Heterocycles*. 1982;19(1):37-40.
125. Pinder AR. Structure of physoperuvine. *The Journal of Organic Chemistry*. 1982;47(19):3607-10.
126. Kubwabo C, Rollmann B, Tilquin B. Analysis of Alkaloids from *Physalis peruviana* by Capillary GC, Capillary GC-MS, and GC-FTIR. *Planta Medica*. 1993;59(2):161-3.
127. Wu SJ, Chang SP, Lin DL, Wang SS, Hou FF, Ng LT. Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(6):1132-8.
128. Kirson I, Gottlieb HE, Glotter E, Ray AB, Sahai M, Ali A. Physalolactone B 3- β -D-Glucopyranoside, the first glycoside in the Withanolide series. *Journal of Chemical Research*. 1983;5:120-1.
129. Ali A, Sahai M, Ray AB, Slatkin DJ. Physalolactone C, a new withanolide from *Physalis peruviana*. *Journal of Natural Products*. 1984;47(4):648-51.
130. Kirson I, Gunzberg G, Glotter E. Acid-catalysed dehydration of withanolide E, a 14 α ,17 β ,20 α F-trihydroxysteroid; a revision. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1980:531-4.

131. Gottlieb HE, Kirson I, Glotter E, Ray AB, Sahai M, Ali A. Perulactone, a new ergostane-type steroid from *Physalis peruviana* (Solanaceae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1980;2700-4.
132. Ray AB, Gupta M. Withanosteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones. *Progress in the chemistry of organic natural products*. 1994;63:387-90.
133. Dinan LN, Sarker SD, Sik V. 28-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*. 1997;44(3):509-12.
134. Franco LA, Ocampo YC, Gomez HA, De la Puerta R, Espartero JL, Ospina LF. Sucrose esters from *Physalis peruviana* calyces with anti-inflammatory activity. *Planta Medica*. 2014;80(17):1605-14.
135. Mayorga H, Knapp H, Winterhalter P, Duque C. Glycosidically bound flavor compounds of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(4):1904-8.
136. Mayorga H, Duque C, Knapp H, Winterhalter P. Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana*). *Phytochemistry*. 2002;59(4):439-45.
137. Ramadan MF, Morsel JT. Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(4):969-74.
138. Asano N, Kato A, Matsui K, Watson AA, Nash RJ, Molyneux RJ, et al. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology*. 1997;7(8):1085-8.
139. Latza S, Ganßer D, Berger RG. Carbohydrate esters of cinnamic acid from fruits of *Physalis peruviana*, *Psidium guajava* and *Vaccinium vitis-idaea*. *Phytochemistry*. 1996;43(2):481-5.
140. Basey K, McGaw BA, Woolley JG. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry*. 1992;31(12):4173-6.
141. Sahai M, Ray AB. Secotropane alkaloids of *Physalis peruviana*. *The Journal of Organic Chemistry*. 1980;45(16):3265-8.
142. Ahmad S, Malik A, Yasmin R, Ullah N, Gul W, Khan PM, et al. Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*. 1999;50(4):647-51.
143. Ahmad S, Malik A, Afza N, Yasmin R. A new withanolide glycoside from *Physalis peruviana*. *Journal of Natural Products*. 1999;62(3):493-4.
144. Glotter E. Withanolides and related ergostane-type steroids. *Natural Product Reports*. 1991;8(4):415-40.
145. Arun M, Asha VV. Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;111(1):110-4.

146. Zaed AM, Swift MD, Sutherland A. A stereoselective synthesis of (+)-physoperuvine using a tandem aza-Claisen rearrangement and ring closing metathesis reaction. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2009;7(13):2678-80.
147. Ramadan MF. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*. 2011;44(7):1830-6.
148. Rinderknecht H, Wilding P, Haverback BJ. A new method for the determination of alpha-amylase. *Experientia*. 1967;23(10):805.
149. Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. α -amylase inhibitor from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000;64(5):1041-3.
150. Rey DP, Ospina LF, Aragón DM. Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 2015;44(1):72-89.
151. Rey DP. Evaluación *in vitro* del efecto de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales [Tesis de Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
152. Instituto Suizo de Bioinformática (SIB). Sistema Experto de Análisis de Proteínas (ExpASy). Alfa Amilasa. <http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.1>. 2016 [Abril de 2016].
153. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a. ed. Monterrey, N.L., México: McGraw-Hill interamericana; 2008.
154. Chunmei M, Zhen S, Changbao C, Lili Z, Shuhua Z. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. *Food Chemistry*. 2014 (145):784–8.
155. Chinnici F, Spinabelli U, Riponi C, Amati A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005;18(2-3):121–30.
156. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). Geneva, Switzerland: ICH; 2005.
157. Maldonado E, Torres FR, Martínez M, Pérez-Castorena A-L. Sucrose esters from the fruits of *Physalis nicandroides* var. *attenuata*. *Journal of Natural Products*. 2006;69(10):1511-3.
158. Pérez-Castorena A-L, Martínez M, Maldonado E. Labdanes and sucrose esters from *Physalis sordida*. *Journal of Natural Products*. 2010;73(7):1271–6.
159. Pratap Singh A, Singh AK, Begum AS, Sahai M. Two acyl sucroses from *Petunia nyctaginiflora*. *Phytochemistry*. 2003;63(4):485-9.

160. Jia C, Wang Y, Zhu Y, Xu C, Mao D. Preparative isolation and structural characterization of sucrose ester isomers from oriental tobacco. *Carbohydrate research*. 2013;372(47):73-7.
161. Pérez-Castorena A-L, Luna M, Martínez M, Maldonado E. New sucrose esters from the fruits of *Physalis solanaceus*. *Carbohydrate Research*. 2012;352:211-4.
162. Zhang C-R, Khan W, Bakht J, Nair MG. New antiinflammatory sucrose esters in the natural sticky coating of tomatillo (*Physalis philadelphica*), an important culinary fruit. *Food Chemistry*. 2016;196:726–32.
163. Cañari C, Nieva A, Maruenda H. NMR Metabolic Profiling of Two Exotic Native Fruits from Peru: *Vanilla pompona* ssp *Grandiflora* and *Physalis peruviana* L. SMASH 2012 NMR Conference, 2012.
164. Choi YH, van Spronsen J, Yuntao D, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, et al. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology. *Plant Physiology*. 2011;156(4):1701–5.
165. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G-J, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*. 2013;766:61–8.
166. Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(29):9142–7.
167. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G-J, Verpoorte R, Choi YH. Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *Journal of Natural Products*. 2013;76(11):2162–73.
168. Liu X, Ai N, Zhang H, Lu M, Ji D, Yu F, et al. Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corncob hydrolysate by HPLC-PDA–ELSD. *Carbohydrate Research*. 2012;353:111–4.
169. Callahan JC, Cleary GW, Elefant M, Kaplan G, Kensler T, Nash RA. Equilibrium Moisture Content of Pharmaceutical Excipients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1982;8(3):355-69.
170. Gonnissen Y, Gonçalves SIV, De Geest BG, Remon JP, Vervaet C. Process design applied to optimise a directly compressible powder produced via a continuous manufacturing process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(3):760-70.
171. Gallo L, Llabot JM, Allemandi D, Bucalá V, Piña J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technology*. 2011;208(1):205-14.
172. Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*. 2008;25(2):999–1022.
173. Sollohub K, Cal K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(2):587-97.

174. Tong HHY, Wong SYS, Law MWL, Chu KKW, Chow AHL. Anti-hygroscopic effect of dextrans in herbal formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;363(1–2):99-105.
175. Souza CRF, Oliveira WP. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* Link extract. *Drying Technology*. 2006;24(6):735-49.
176. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;453(1):253-84.
177. Tan LW, Ibrahim MN, Kamil R, Taip FS. Empirical modeling for spray drying process of sticky and non-sticky products. *Procedia Food Science*. 2011;1:690-7.
178. Ré M-I. Formulating drug delivery systems by spray drying. *Drying Technology*. 2006;24(4):433-46.
179. Sollohub K Fau - Cal K, Cal K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *J Pharm Sci*. 2010;99(2):587 - 97.
180. Berggren J, Frenning G, Alderborn G. Compression behaviour and tablet-forming ability of spray-dried amorphous composite particles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;22(2–3):191-200.
181. Takeuchi H, Nagira S, Yamamoto H, Kawashima Y. Solid dispersion particles of tolbutamide prepared with fine silica particles by the spray-drying method. *Powder Technology*. 2004;141(3):187-95.
182. Chen R, Tagawa M, Hoshi N, Ogura T, Okamoto H, Danjo K. Improved dissolution of an insoluble drug using a 4-fluid nozzle spray-drying technique. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;52(9):1066-70.
183. Takeuchi H, Nagira S, Yamamoto H, Kawashima Y. Solid dispersion particles of amorphous indomethacin with fine porous silica particles by using spray-drying method. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;293(1–2):155-64.
184. Di Martino P, Scoppa M, Joiris E, Palmieri GF, Andres C, Pourcelot Y, et al. The spray drying of acetazolamide as method to modify crystal properties and to improve compression behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;213(1–2):209-21.
185. Takeuchi H, Sasaki H, Niwa T, Hino T, Kawashima Y, Uesugi K, et al. Preparation of powdered redispersible vitamin E acetate emulsion by spray-drying technique. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1991;39(6):1528-31.
186. Dollo G, Le Corre P, Guérin A, Chevanne F, Burgot JL, Leverge R. Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;19(4):273-80.
187. Christensen KL, Pedersen GP, Kristensen HG. Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;212(2):187-94.

188. Hansen T, Holm P, Schultz K. Process characteristics and compaction of spray-dried emulsions containing a drug dissolved in lipid. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;287(1–2):55-66.
189. Hansen T, Holm P, Rohde M, Schultz K. *In vivo* evaluation of tablets and capsules containing spray-dried o/w-emulsions for oral delivery of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;293(1–2):203-11.
190. Raffin Pohlmann A, Weiss V, Mertins O, Pesce da Silveira N, Stanisçuaski Guterres SI. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;16(4–5):305-12.
191. Cook RO, Pannu RK, Kellaway IW. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2005;104(1):79-90.
192. Sham JOH, Zhang Y, Finlay WH, Roa WH, Löbenberg R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;269(2):457-67.
193. Mizoe T, Ozeki T, Okada H. Preparation of drug nanoparticle-containing microparticles using a 4-fluid nozzle spray drier for oral, pulmonary, and injection dosage forms. *Journal of Controlled Release*. 2007;122(1):10-5.
194. Gonnissen Y, Gonçalves SI, Remon JP, Vervaet C. Mixture design applied to optimize a directly compressible powder produced via cospray drying. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008;34(3):248-57.
195. Gonnissen Y, Remon JP, Vervaet C. Development of directly compressible powders via co-spray drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;67(1):220-6.
196. Moreira GÉG, Costa MGM, Souza ACRd, Brito ESd, Medeiros MdFDd, Azeredo HMCd. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *LWT - Food Science and Technology*. 2009; 42(2): 641–5.
197. Soares LAL, González Ortega G, Petrovick PR, Schmidt PC. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. *AAPS PharmSciTech*. 2005;6(3):E359-E66.
198. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 2008;88(3):411-8.
199. Gonnissen Y, Remon JP, Vervaet C. Effect of maltodextrin and superdisintegrant in directly compressible powder mixtures prepared via co-spray drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(2):277-82.
200. Forero DA. Desarrollo de una metodología para la obtención y caracterización de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana* L. y propuesta para su adecuación tecnológica [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2008.

210 Desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana* L. aplicando el método de secado por aspersión

201. Vasconcelos EAF, Medeiros MGF, Raffin FN, Moura TFAL. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2005;15(3):243-9.

202. Peixoto MPG, Freitas LAP. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: physicochemical and biological evaluation. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2013;23(1):145-52.

203. Maa YF, Costantino HR, Nguyen PA, Hsu CC. The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-dried protein particles. Pharmaceutical Development and Technology. 1997;2(3):213-23.

204. Seydel P, Sengespeick A, Blömer J, Bertling J. Experiment and mathematical modeling of solid formation at spray drying. Chemical Engineering & Technology. 2004;27(5):505-10.

205. Jangam SV, Thorat BN. Optimization of spray drying of ginger extract. Drying Technology. 2010;28(12):1426–34.

206. Silva PI, Stringheta PC, Teófilo RF, Nolasco de Oliveira IR. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. Journal of Food Engineering. 2013 (117):538–44.

207. Tajber L, Corrigan OI, Healy AM. Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their composites—II. Statistical factorial design and *in vitro* deposition properties. International Journal of Pharmaceutics. 2009;367(1-2):86–96.

208. Couto RO, Martins FS, Chaul LT, Conceição EC, Freitas LAP, Bara MTF, et al. Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects of in-process parameters on product quality. Revista Brasileira de Farmacognosia 2013;23(1):115-23.

209. United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 39–NF 34. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2016.

210. Martin AN, Sinko PJ, Singh Y. Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences. Physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences. 6th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

211. Rodríguez Endez RY. Estudio comparativo de excipientes empleados en la formulación de formas farmacéuticas sólidas, parte IV, fosfato de calcio en polvo, fosfato de calcio granulado, fosfato de calcio granulado con almidón como desintegrante, fosfato de calcio directamente comprensible [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1983.

212. Cadena R MI, Velez R MS. Aspectos técnicos de la rehidratación de jugos de frutas en polvo 1986.

213. Moyano Bonilla LJ, Quesada Betancourt CE. Preformulación de tabletas de teofilina del tipo matriz hidrofílica y evaluación de la cinética de liberación controlada del fármaco [Tesis de Grado]. Santafé de Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2000.

214. Sopó Ortega MI. Estudio comparativo de excipientes utilizados en la formulación de formas farmacéuticas solidas. Parte 1. Lactosa secada por rocío, celulosa microcristalina, azúcar directamente comprensible [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1980.
215. Universidad de Antioquia. Farmacotecnia 2004 [cited 2011 Noviembre de 2011]. Available from: <http://docencia.udea.edu.co/qf/farmacotecnia/07/cflujo.html>.
216. Alarcon Mora CA, Gómez Vasquez JC. Pautas para el desarrollo de un producto fitoterapeutico con base en *Bidens pilosa* L. Parte I. "Estudios preliminares para la caracterización de extractos de *Bidens pilosa* L." [Tesis de Grado]. Santafe de Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1995.
217. Melo O, Lopez L, Melo S. Diseño de experimentos metodos y aplicaciones. Primera ed. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogota, Facultad de Ciencias. 2007.
218. Montgomery DC, Piña García R, Zetina Vélez G. Diseño y análisis de experimentos. 2a. ed. México: Limusa Wiley; 2010.
219. Carmona Fernández R, López Hernández OD, Gonzáles Sanabria ML. Relación entre índice de refracción y sólidos totales en extractos acuosos de *Calendula officinalis* L. (caléndula) y *Ocimum sanctum* L. (albahaca morada). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2009;14(3):23-8.
220. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2000;33(2):179-89.
221. Wang S, Langrish T. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. Food Research International. 2009;42(1):13-25.
222. Cal K, Sollohub K. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010;99(2):575-86.
223. Rao Jammalamadaka S, Sengupta A. Topics in Circular Statistics. New Jersey, USA: World Scientific Pub. Co. Inc.; 2001 2013.
224. Ferrari S, Cribari-Neto F. Beta Regression for Modelling Rates and Proportions. Journal of Applied Statistics. 2004;31(7):799–815.
225. Cribari-Neto F, Zeileis A. Beta Regression in R. Journal of Statistical Software. 2010;34(2):1–24.
226. Ribeiro Rattes AL, Pereira Oliveira W. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. Powder Technology. 2007;171(1): 7–14.
227. Büchi. Mini Spray Dryer B-290, 3rd September, 2015, <http://www.buchi.com/en/products/spray-drying-and-encapsulation/mini-spray-dryer-b-290> [cited 2015 3rd September].

228. Quek SY, Chok NK, Swedlund P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing*. 2007;46(5):386–92.
229. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, Association. AP. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. London; Chicago: Pharmaceutical Press; American Pharmacists Association; 2009.
230. Voigt R, Bornschein M. Tratado de tecnología farmacéutica. 3ra ed. Zaragoza, España: Acribia; 1982.
231. Gross J, Ligges U. Nortest: Tests for Normality, R package version 1.0-2, 3rd September, 2015, <https://cran.r-project.org/web/packages/nortest/index.html>.
232. Florence AT, Attwood D. Physicochemical principles of pharmacy. 4th ed. London Chicago: Pharmaceutical Press; 2006.
233. Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2005;6(4):420 - 8.
234. Allen Jr. LV, Popovich NG, Ansel HC. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 9th ed. Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
235. Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(10):510-23.
236. Maderuelo C, Zarzuelo A, Lanao JM. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*. 2011;154(1):2-19.
237. Marwaha M, Sandhu D, Marwaha R. Coprocessing of excipients: A review on excipient development for improved tableting performance. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2010;2(3):41-7.
238. Gohel MC. A review of co-processed directly compressible excipients. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2005;8(1):76-93.
239. Sandoval H. PA, Baena Y, Aragón M, Rosas JE, Ponce D'León LF. Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 2008;37(2):105-21.
240. Conti S, Maggi L, Segale L, Ochoa Machiste E, Conte U, Grenier P, et al. Matrices containing NaCMC and HPMC 2. Swelling and release mechanism study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;333(1-2):143-51.
241. Conti S, Maggi L, Segale L, Ochoa Machiste E, Conte U, Grenier P, et al. Matrices containing NaCMC and HPMC 1. Dissolution performance characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;333(1-2):136-42.

242. Brouillet F, Bataille B, Cartilier L. High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug-release: formulation aspects and *in vitro* drug-release evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;356(1-2):52-60.
243. Cui Q Fau - Zhu Y, Zhu Y Fau - Cui J, Cui J. Preparation and *in vitro* release of *Ginkgo biloba* extract sustained-release tablets. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009;34(15):1910-13.
244. Dürig T, Fassihi R. Guar-based monolithic matrix systems: effect of ionizable and non-ionizable substances and excipients on gel dynamics and release kinetics. *Journal of Controlled Release*. 2002;80(1-3):45-56.
245. Miranda A, Millán M, Caraballo I. Study of the critical points of HPMC hydrophilic matrices for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;311(1-2):75-81.
246. Colombo P, Bettini R, Santi P, De Ascentiis A, Peppas NA. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *Journal of Controlled Release*. 1996;39(2-3):231-7.
247. Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2000;3(6):198-204.
248. Giunchedi P, Gavini E, Morett MDL, Pirisino G. Evaluation of Alginate Compressed Matrices as Prolonged Drug Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech*. 2000;1(3):31-6.
249. Saifi A, Sinhal A, Kumar M, Chaturvedi M. Recent development in novel drug delivery systems of herbal drugs. *International Journal of Green Pharmacy*. 2011;5(2):87-94.
250. Michailova V, Titeva S, Kotsilkova R, Krusteva E, Minkov E. Influence of aqueous medium on viscoelastic properties of carboxymethylcellulose sodium, hydroxypropylmethyl cellulose, and thermally pre-gelatinized starch gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1999;149(1-3):515-20.
251. Ravi PR, Kotreka UK, Saha RN. Controlled release matrix tablets of zidovudine: effect of formulation variables on the *in vitro* drug release kinetics. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(1):302-13.
252. Naim S, Samuel B, Chauhan B, Paradkar A. Effect of potassium chloride and cationic drug on swelling, erosion and release from κ -carrageenan matrices. *AAPS PharmSciTech*. 2004;5(2):1-8.
253. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*. 2006; 114(1):1-14.
254. Borgquist P, Körner A, Piculell L, Larsson A, Axelsson A. A model for the drug release from a polymer matrix tablet—effects of swelling and dissolution. *Journal of Controlled Release*. 2006;113(3):216-25.

255. Barba AA, D'Amore M, Cascone S, Chirico S, Lamberti G, Titomanlio G. On the Behavior of HPMC/Theophylline Matrices for Controlled Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(11):4100-10.
256. Narasimhan B, Peppas NA. Molecular analysis of drug delivery systems controlled by dissolution of the polymer carrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(3):297-304.
257. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(2-3):139-57.
258. DOW. POLYOX Water-Soluble Resins, http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_094e/0901b8038094e22f.pdf?filepath=/pdfs/noreg/326-00001.pdf&fromPage=GetDoc [cited 2016 18th January].
259. Tasaki K. Poly(oxyethylene)-water interactions: A molecular dynamics study. *Journal of American Chemical Society*. 1996;118(35):8459-69.
260. Escudero JJ, Ferrero C, Jiménez-Castellanos MR. Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies from matrices combining mixtures of swellable and inert polymers. II. Effect of HPMC with different degrees of methoxy/hydroxypropyl substitution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;387(1-2):56-64.
261. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;13(2):123-33.
262. Bourdy G, Chavez de Michel LR, Roca-Coulthard A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guarani (Bolivian Chaco). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;91(2-3):189-208.
263. Colombo P. Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1992;11(1-2):37-57
264. Dahl TC, Calderwood T, Bormeth A, Trimble K, Piepmeier E. Influence of physico-chemical properties of hydroxypropyl methylcellulose on naproxen release from sustained release matrix tablets. *Journal of Controlled Release*. 1990;14(1):1-10.
265. Campos-Aldrete ME, Villafuerte-Robles L. Influence of the viscosity grade and the particle size of HPMC on metronidazole release from matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1997;43 (2):173-8
266. Escudero JJ, Ferrero C, Jiménez-Castellanos MR. Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies from matrices combining mixtures of swellable and inert polymers: Effect of HPMC of different viscosity grades. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;351(1-2):61-73.
267. Colombo P, Bettini R, Peppas NA. Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug. *Journal of Controlled Release* 1999;61(1-2):83-91.

268. Reddy K, Mutalik S, Reddy S. Once-daily sustained-release matrix tablets of nicorandil: Formulation and *in vitro* evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4(4):1-9.
269. Costa E, Arancibia A, Aiache J-M. Sistemas Matriciales. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23. 2004;23(2):259 -65.
270. Narasimhan B. Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(2-3):195-210.
271. Narasimhan B, Peppas NA. On the importance of chain reptation in models of dissolution of glassy polymers. *Macromolecules*. 1996;29(9):3283-91.
272. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;15(1):25-35.
273. Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;57(2):169-72.
274. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*. 1987;5(1):37-42.
275. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*. 1987;5(1):23-36.
276. Escudero JJ, Ferrero C, Casas M, Jiménez-Castellanos MR. Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies of matrices combining mixtures of swellable and inert polymers. III: Effect of polymer substitution type. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;434(1-2):215-23.
277. Colombo P, Bettini R, Catellani PL, Santi P, Peppas NA. Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxypropylmethyl cellulose matrices containing a soluble drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;9(1):33-40.
278. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1963;52(12):1145-9.
279. Nogami H, Nagai T, Fukuoka E, Sonobe T. Disintegration of the aspirin tablets containing potato starch and microcrystalline cellulose in various concentrations. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1969;17(7):1450-5.
280. Bhise KS, Dhumal RS, Chauhan B, Paradkar A, Kadam SS. Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling, erosion, and drug release from chitosan matrices. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(2):E110-E8.
281. Ranga Rao KV, Padmalatha Devi K. Swelling controlled-release systems: recent developments and applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 1988;48(1-3):1-13.

282. Rodríguez Villamizar RE, Rodríguez Beltrán C. Adecuación y estandarización del equipo de enslin y microfotografico para la determinacion de sorción e hinchamiento para matrices polielectrolito- farmaco [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2008.
283. Tewa-Tagne P, Briançon S, Fessi H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;325(1-2):63–74.
284. Martins RM, Pereira SV, Siqueira S, Salomão WF, Freitas LAP. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. *Food Research International*. 2013; 50(2):657–63.
285. Šantl M, Ilić I, Vrečer F, Baumgartne S. A compressibility and compactibility study of real tableting mixtures: The impact of wet and dry granulation versus a direct tableting mixture. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;414(1–2):131–9.
286. Leuenberger H, Rohera B. Fundamentals of powder compression I. The compactibility and compressibility of pharmaceutical powders. *Pharmaceutical Research*. 1986;3(1):12-22.
287. Iderborn G, Nicklasson F. Analysis of the compression mechanics of pharmaceutical agglomerates of different porosity and composition using the Adams and Kawakita equations. *Pharmaceutical Research*. 2000;17(8):949-54.
288. Chakrabarti S, Law Y, Zhang Y. Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4(4):489-99.
289. Ebube NK, Jones AB. Sustained release of acetaminophen from a heterogeneous mixture of two hydrophilic non-ionic cellulose ether polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;272(1-2):19-27.
290. Mitchell K, Ford JL, Armstrong DJ, Elliott PNC, Rostron C, Hogan JE. The influence of concentration on the release of drugs from gels and matrices containing Methocel. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;100(1-3):155-63.
291. Koester LS, Ortega GG, Mayorga P, Bassani VL. Mathematical evaluation of *in vitro* release profiles of hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets containing carbamazepine associated to beta-cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;58(1):177–9.
292. Rassu G, Gavini E, Jonassen H, Zambito Y, Fogli S, Breschi MC, et al. New chitosan derivatives for the preparation of rokitamycin loaded microspheres designed for ocular or nasal administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(12):4852–65.
293. Jhon MS, Andrade JD. Water and Hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1973;7(6):509-22.
294. Bettinia R, Catellania PL, Santia P, Massimoa G, Peppasb NA, Colombo P. Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate. *Journal of Controlled Release*. 2001;70(3):383–91.

295. Ferrero C, Muñoz-Ruiz A, Jiménez-Castellanos M. Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;202(1-2):21–8.