

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



COMPARACION DE LA LIBERACION DE RIBOFLAVINA CONTENIDA EN
DIFERENTES MATRICES COMO POSIBLE SISTEMA DE LIBERACION
RETARDADA

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

KAREN GABRIELA GARCIA FERMAN

KARLA ELVIRA JORDAN MORAN

PARA OPTAR AL GRADO DEL
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE 2020

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORAS DE AREA EN: APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

MsD. Ana Miriam Santamaría de Campos

DOCENTE ASESOR

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos inmensamente a Dios por culminar este proyecto, por permitirnos conocer personas que guiaron nuestro camino. Por lo que con el corazón expresamos nuestra gratitud.

A nuestro docente asesor, Ing. Sergio Armando Maravilla, por brindarnos la oportunidad de realizar este trabajo en su supervisión y, sobre todo, por haber sido un gran maestro durante nuestra formación.

Al Lic. Ulises Guardado Castillo, por su guía y consejos. Por no solo mostrarse como asesor, sino como un compañero y amigo durante largos días de laboratorio.

A los docentes del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales: Dr. Marvin Núñez, MSc. Morena Martínez, MSc. Miriam Santamaría, y Licda. Rina Toledo; por habernos acogido con gran amabilidad día a día en el laboratorio y, especialmente, por permitirnos realizar este trabajo de investigación disponiendo de todos los recursos para su realización.

Al MSc. Eliseo Ayala, docentes, y laboratorista de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, quienes con gran amabilidad nos brindaron apoyo y recursos necesarios, que nos permitieron realizar parte del proceso experimental de la investigación.

A las docentes del tribunal evaluador, Msc. Cecilia Gallardo, Msc. Morena Martínez, y MSc. Miriam Santamaría, por sus consejos, soporte y tiempo.

A todos los docentes de la Facultad de Química y Farmacia que durante años transmitieron sus valiosos conocimientos formándonos con gran entrega y dedicación. A nuestras familias que con amor y paciencia a diario fueron el motor y los pilares que sostenían nuestro sueño de ser profesionales.

Karen García y Karla Jordán

DEDICATORIA

Tú eres todo, yo no soy nada y, sin embargo, tu amor quiere que yo sea mucho.
¡ Con tú todo y mi nada haremos ese mucho !

San Oscar Romero.

Más que una dedicatoria es un agradecimiento. Primeramente, a Dios y a la Virgen María Auxiliadora que me permitieron alcanzar el sueño de ser farmacéutica, que sin su ayuda, misericordia y guía, no lo habría logrado.

A mi madre Brenda Fermán y mi padre Byron García, por ser mi motor, mi luz y mi apoyo en cada momento, sin duda son la bendición más grande que tengo y sin ellos nada hubiera sido posible.

A mis hermanitos Fernando y Andrea García, que con todo su amor me han apoyado en cada paso, siendo la alegría de mi vida y la fuerza para continuar.

A mi abuelita y mis tíos, que siempre estuvieron a mi lado dándome su cariño, su apoyo y consejos, cuando los necesité.

A mi gran amigo Yerandir Segura, quien estuvo pacientemente en cada paso dándome ánimo e impulsándome para lograr este sueño.

A Mauricio Jiménez, quien me llenaba de alegrías es esos momentos de estrés dándome palabras de ánimo.

A mis amigos Giovanni Monterrosa, Mercedes Aquino, Norma Monroy, Luis Almazán y Sonia Landaverde, que con tanto cariño me han brindado su amistad sincera y su apoyo todos estos años.

A mi compañera en esta travesía Karla Jordán, por su apoyo, paciencia, y dedicación para que este proyecto fuera un logro.

Karen Gabriela García Fermán

DEDICATORIA

"Éxito es: Conocer tu propósito en la vida, crecer para desarrollar tu máximo potencial y sembrar semillas que ayuden a los demás",

John Maxwell.

En primer lugar, más que dedicatoria es un agradecimiento profundo a Dios, pues a él es a quien debo todos mis logros. Por concederme fortaleza y perseverancia para alcanzar esta meta y, sobre todo, por mostrar misericordia a mis suplicas y dirigir mis pasos por el camino correcto.

A mi padre Carlos Rogelio Jordán Rodríguez, por sus consejos y ser un ejemplo de valentía. Por esos recuerdos preciados que aún guardo en mi corazón, sobre todo, por tener fe en que algún día me convertiría en alguien que marcaría la diferencia. Te amo y hasta el cielo, gracias.

A mi madre Emma Idania Moran Vda. de Jordán, por ser el ángel que Dios dejó para cuidarme. Por tu amor, tus consejos, por esos abrazos cada fin de semana que me llenaban de energía para seguir. Pero más que nada, por entregar tu vida para verme cumplir mi meta. Te amo.

A mi tía Sor Sonia Daisy Moran, por incentivar en mí el interés por la química y farmacia, por creer en mí, aún cuando yo no lo hacía, por su amor y consejos que siempre llevare en mi corazón. Hasta el cielo, gracias.

A mis hermanos, Gabriela, Andrea y Carlos Jordán por ser mi alegría cuando regresaba a casa, los amo.

A Fernando Manzanares, por su apoyo, paciencia y por estar para mí siempre. Por hacer mis alegrías sus alegrías y mis tristezas sus tristezas. Por ayudarme a crecer y por tu inmenso amor, gracias.

A mi compañera de tesis, Karencita, por su apoyo y constante trabajo en equipo.

Finalmente, a todos mis amigos que siempre confiaron en mí, por el detalle de haberme dado su afecto durante estos años, por haber compartido su tiempo conmigo y, sobre todo, por haberme hecho compañía cuando estuve lejos de mi familia.

Convéncete a ti mismo que si eres capaz y lo podrás lograr.

Karla Elvira Jordán Morán

INDICE

	Pág N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xxi
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	27
3.1 Sistemas de liberación modificada	29
3.1.1 Clasificación de los sistemas de liberación modificada	29
3.1.2 Sistemas de liberación acelerada	30
3.1.3 Sistemas de liberación diferida	30
3.1.4 Sistemas de liberación prolongada	30
3.1.5 Sistemas flotantes y bioadhesivos	31
3.1.6 Sistema de Liberación al que está dirigido la investigación	31
3.2 Dosificación controlada por mecanismos físicos	32
3.2.1 Sistemas controlados por difusión	33
3.2.2 Sistemas controlados por el disolvente	33
3.3 Sistemas matriciales	34
3.3.1 Matrices hidrofílicas	35
3.4 Vitaminas	36
3.4.1 Riboflavina	37

3.4.1.1	Características fisicoquímicas de la Riboflavina	38
3.4.1.2	Incompatibilidades	39
3.4.1.3	Farmacocinética	39
3.4.1.4	Mecanismo de acción	39
3.4.1.5	Usos terapéuticos de la Riboflavina.	40
3.5	Generalidades de la “Naranja” <i>Citrus aurantium</i>	41
3.5.1	Clasificación botánica del <i>Citrus aurantium</i>	41
3.5.2	Características botánicas de la naranja <i>Citrus aurantium</i>	41
3.5.3	Descripción botánica	42
3.5.4	Distribución geográfica	42
3.5.5	Estudio fitoquímico	43
3.5.6	Usos populares	43
3.5.7	Porcentaje de pectina en frutos	43
3.6	Generalidades físicas y químicas de la pectina	44
3.6.1	La pectina sus orígenes	44
3.6.2	Definición del término pectina	45
3.6.3	Sustancias pécticas	45
3.6.4	Clasificación de las sustancias pécticas	46
3.6.5	Estructura química de la pectina	46
3.6.6	Propiedades fisicoquímicas de las pectinas	47
3.6.7	Parámetros de Medición de la Calidad de la Pectina	48
3.6.7.1	Pectinas de alto metoxilo (HM)	48
3.6.7.2	Pectinas de bajo metoxilo (LM)	49
3.6.8	Usos farmacéuticos de la pectina	50

3.6.9 Métodos de extracción de la pectina	52
3.7 Polivinilpirrolidona	53
3.8 Generalidades del almidón	54
3.8.1 Composición química de los almidones	55
3.8.2 Almidones Modificados	56
3.9 Modelos para evaluar la cinética de liberación de los fármacos	58
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	60
4.1 Tipo de estudio	60
4.2 Investigación bibliográfica	60
4.3 Investigación de campo	61
4.4 Desarrollo experimental	61
4.4.1 Procedimiento general para extracción de pectina	62
4.4.2 Determinación de la calidad fisicoquímica de las pectinas	64
4.4.3 Formulación de las matrices	66
4.4.3.1 Diseño cualitativo de los componentes de las matrices	67
4.4.3.2 Diseño cuantitativo de los componentes de las matrices	68
4.4.4 Elaboración de las matrices	70
4.4.4.1 Elección de la forma farmacéutica	70
4.4.4.2 Procedimiento para determinar el tamaño de cápsula	70
4.4.4.3 Elaboración de las matrices	71
4.4.5 Estudio <i>in vitro</i> de la liberación de la Riboflavina	73
4.4.5.1 Preparación de la curva de calibración del estándar de Riboflavina	73

4.4.5.2 Preparación de las muestras	74
4.4.5.3 Procedimiento para realizar las disoluciones	74
4.4.5.4 Disoluciones realizadas en el Experimento Inicial	75
4.4.5.5 Diluciones realizadas en el Experimento Final	75
4.4.5.6 Procedimiento para la medición de las absorbancias en el espectrofotómetro UV-vis	76
4.4.6 Determinación de la cinética de liberación de la Riboflavina.	76
4.5 Método estadístico	78
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	82
5.1 Extracción de pectina del mesocarpo de " <i>Citrus aurantium</i> "	82
5.2 Determinación de la calidad fisicoquímica de la pectina extraída del mesocarpo de las "naranjas" <i>Citrus aurantium</i>	84
5.3 Formulación de matrices y elección de la forma farmacéutica	89
5.4 Elaboración de las matrices e incorporación del principio activo	93
5.5 Estudio <i>in vitro</i> de la liberación de la riboflavina	93
5.6 Determinación de la cinética de liberación del principio activo	111
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	118
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	121
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág.
1	Esquema de clasificación de Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada.	31
2	Dosificación controlada por mecanismos físicos.	33
3	Representación esquemática del proceso de liberación desde una matriz hidrofílica.	36
4	Estructura de la Riboflavina, Flavín Mononucleótido (FMN) y Flavín Adenín Dinucleótido (FAD).	37
5	Estructura química de Riboflavina.	38
6	Descripción de <i>Citrus aurantium</i> .	42
7	Partes de la "Naranja"	44
8	Estructura de la pectina.	47
9	Pectinas con alto grado de metoxilo.	49
10	Pectinas con bajo grado de metoxilo.	50
11	Distribución de matrices a pH 7.6.	75
12	Distribución de las matrices en la disolución de pH 7.6.	76
13	Curva de calibración promedio del estándar.	94
14	Distribución de matrices en disolución 1 y 2	96
15	Distribución del valor de F crítico obtenido en la investigación con respecto a las hipótesis.	100
16	Diagrama de caja para la interacción entre los factores y sus niveles (Prueba inicial)	103
17	Distribución de las matrices en la disolución de Buffer pH7.6	105
18	Diagrama de caja de interacción entre niveles de los factores (Prueba final).	110
19	Liberación de Riboflavina ([] vs tiempo) contenida en matriz 2A, ajuste para el modelo de orden 0.	112

20	Liberación de Riboflavina ($\ln []$ vs tiempo) contenida en matriz 2A, ajuste para el modelo de orden 1.	113
21	Liberación de Riboflavina ($1/\ln []$ vs tiempo) contenida en matriz 2 A, ajuste para el modelo de orden 2.	113
22	Liberación de Riboflavina contenida en matriz 2 B, ajuste para el modelo de orden 0.	115
23	Liberación de Riboflavina contenida en matriz 2B, ajuste para el modelo de orden 1.	115
24	Liberación de Riboflavina contenida en matriz 2B, ajuste para el modelo de orden 2.	115
25	Procedimiento general para la extracción de pectina.	147
26	Procedimiento para la extracción de pectina (hidrólisis ácida).	148
27	Procedimiento para la prueba de identificación de las pectinas.	149
28	Procedimiento para la prueba de valoración de grupos metoxilo.	150
29	Procedimiento para la realización de la prueba de pérdida por secado.	151
30	Nomograma para determinación del número de cápsula.	152
31	Procedimiento general para la elaboración de las matrices.	155
32	Cascada de dilución para la preparación del estándar.	156
33	Esquema de prueba de disolución para las muestras.	157
34	Ilustración del pH del tracto gastrointestinal.	158

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág.
1	Ejemplos y principales características de las Forma Farmacéuticas de Liberación Modificada	29
2	Ventajas y desventajas de las Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada	32
3	Porcentajes de rendimiento de pectina por fruto	44
4	Modelos de Cinética de liberación de fármacos	58
5	Funciones de los componentes de la matriz	66
6	Componentes de las matrices (cualitativamente)	68
7	Composición de las matrices para el experimento inicial (Cuantitativamente)	69
8	Composición de las matrices para el experimento final (Cuantitativamente)	69
9	Modelos para cinética de orden de reacción.	77
10	Factores a evaluar en el estudio de Liberación de Riboflavina (Experimento inicial)	79
11	Factores a evaluar en el estudio de Liberación de Riboflavina (Experimento final)	79
12	Rendimientos obtenidos y condiciones de extracción de pectina a partir del mesocarpo de <i>Citrus aurantium</i> .	83
13	Resumen de los resultados obtenidos de diferentes pruebas de identificación.	84
14	Resultados obtenidos de la valoración de la prueba de grupos metoxilo	85
15	Resultados obtenidos en la determinación de porcentaje de ácido galacturónico.	86
16	Resultados obtenidos en la prueba de pérdida por secado	88

17	Resultados obtenidos para formulación de matrices (1B, 2B, 3B)	90
18	Resultados de volumen aparente y compactado	92
19	Resultados en la elaboración de las matrices (1A, 2A y 3A)	92
20	Absorbancias obtenidas en las curvas de calibración del estándar	94
21	Parámetros para llevar a cabo cada disolución	95
22	Resultados obtenidos en Matriz 1 A, 2 A y 3 A a pH 1.2	97
23	Resultados obtenidos en Matriz 1 A, 2 A y 3 A a pH 6.2	97
24	Resultados obtenidos en Matriz 1 A, 2 A y 3 A a pH 7.6	98
25	ANOVA para comparación de matrices A (matriz elaborada con pectina extraída) con 95% de confianza.	99
26	Test de Tukey para el factor 1 (confianza 95%)	101
27	Test de Tukey para el factor 2 (confianza 95%)	102
28	Resultados obtenidos en la disolución (Ácido)	105
29	Resultados obtenidos en la disolución (Medio agua)	106
30	Resultados obtenidos en la disolución (Medio Buffer fosfato)	106
31	Resultados de ANOVA para experimento final (comparación de matrices 2 A y 2 B)	107
32	Resultados del Test de Tukey para el Factor 1 (confianza 95%)	108
33	Resultados del Test de Tukey para el Factor 2 con un nivel de confianza de 95%	109
34	Resultados de la cinética de liberación de Riboflavina matriz 2 A	112
35	Resultados de la cinética de liberación de Riboflavina matriz 2B en buffer pH 7.6	114
36	Cantidades de NaOH para la elaboración de buffer fosfato de potasio monobásico	142
37	Determinación del tamaño de cápsulas	153
38	Diseño de viñeta utilizada para la identificación en los ensayos	154
39	Hoja de cálculo para la cuantificación de riboflavina	159
40	Valores críticos de la distribución de F (0.05)	161

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Monografía de riboflavina según USP 37/ NF 32.
- 2 monografía de pectina según USP 37/ NF 32.
- 3 Voucher de la identificación de *citrus aurantium*.
- 4 Procedimiento para la preparación de reactivos.
- 5 Materiales y equipos.
- 6 Extracción general de pectina.
- 7 Extracción de pectina.
- 8 Prueba de identificación.
- 9 Prueba de valoración de grupos metoxilo.
- 10 Prueba de pérdida por secado.
- 11 Nomograma.
- 12 Tamaños de cápsulas
- 13 Viñeta.
- 14 Elaboracion de las matrices.
- 15 Preparación del estándar de referencia.
- 16 Disolución de las muestras.
- 17 pH del tracto gastrointestinal.
- 18 Cuantificación de riboflavina.
- 19 valores críticos de la distribución de F (0.05).

SIMBOLOGÍAS

[]	Concentración
ρ	Densidad
°C	Grados Celsius
g	Gramos
mg	Miligramo
μL	Microlitros
mL	Mililitros
%	Porcentaje
N	Normalidad (Medida de concentración)
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minutos
v/v	Masa/Volumen (Medida de concentración)
VS	Solución volumétrica

ABREVIATURAS

Dr	Doctor
MUHNES	Museo de Historia Natural de El Salvador
NF	National Formulary (formulario nacional de medicamento).
PVP	Polivinilpirrolidona
UES	Universidad de El Salvador
USAM	Universidad Alberto Masferrer
USP	United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estado Unidos)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de comparar la liberación de Riboflavina contenida en diferentes matrices elaboradas con pectina extraída del mesocarpo de la “Naranja” y pectina comercial, como posible sistema de liberación retardada. La especie utilizada fue identificada como *Citrus aurantium* de la cual se extrajo la pectina por medio del método de hidrólisis ácida. Se realizaron pruebas de control de calidad fisicoquímico, en ambas pectinas, utilizadas para la elaboración de las diferentes matrices.

En un experimento inicial, se determinó cuál de las matrices elaboradas contenía la concentración de pectina ideal para ser utilizada en la investigación. Posteriormente, se realizó un experimento final cuyo objetivo era comparar la matriz seleccionada inicialmente con una matriz de iguales concentraciones, pero elaborada con pectina comercial. Los experimentos se realizaron a tres diferentes pH (1.2, 6.2 y 7.6), por medio del Método de Disolución y se cuantificó la cantidad de riboflavina liberada por el Método de Espectroscopia Ultravioleta Visible. Además, se realizó la cinética de liberación de las matrices evaluadas en el experimento final, utilizando como medio pH 7.6, las muestras fueron tomadas a los 5, 15, 25, 35 y 45 minutos. Según los resultados obtenidos, la matriz que presentó un comportamiento similar a un sistema de liberación modificado es la matriz 2 A, la cual presenta una cinética de reacción que se apega a un modelo de orden cero. Para obtener una evaluación más amplia de las matrices que contienen polímeros naturales, es recomendable evaluar su disolución en puntos de pH que oscilan en rangos de 1.2 a 7.6 en los medios de disolución, para obtener el comportamiento más completo de la disolución de las matrices.

La investigación se realizó de septiembre del 2019 a febrero del 2020, en las instalaciones del Laboratorio de investigación en Productos Naturales y el Laboratorio de Control de Calidad de productos farmacéuticos de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador.

**CAPITULO I
INTRODUCCION**

1.0 INTRODUCCION

El desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada ha producido gran interés en la industria farmacéutica, ya que aportan mejor simplificación de la posología y mejor perfil farmacocinético, e incluso, reducción de efectos adversos. En ellas se introducen modificaciones en la formulación o en el proceso de producción con el fin de alterar la velocidad, el tiempo o el lugar de liberación del fármaco.

Sin embargo, para obtener este resultado innovador se requiere cada vez de más investigaciones dirigidas al estudio de nuevos sistemas de liberación y de factores que condicionan el proceso de liberación del fármaco a partir de la matriz que los contiene. Actualmente en la elaboración de sistemas de liberación retardada, se utilizan un gran número de polímeros los cuales están clasificados en dos grandes grupos: los polímeros sintéticos y los polímeros naturales, entre ellos la pectina.

En la presente investigación se evaluaron tres matrices con el objetivo de determinar su uso como un posible sistema de liberación retardada de modo que, permitieran mantener los niveles óptimos de Riboflavina en el organismo, para lo cual se evaluó el comportamiento del fármaco al entrar en contacto en un ambiente que simuló las condiciones de los fluidos del organismo, que van del pH ácido del estómago al pH básico del intestino. Por ello, en este trabajo de investigación se elaboraron matrices compuestas por Polivinilpirrolidona, Starch 1500®, pectina comercial y pectina extraída del mesocarpo de la “Naranja”. Para el desarrollo experimental se evaluaron las matrices elaboradas con pectina extraída del mesocarpo de la “Naranja” en un experimento inicial, el cual consistió en la selección de la matriz que presentara las mejores características para un sistema liberación retardada. Posteriormente, se realizó un experimento final en el que se comparó la matriz seleccionada en el experimento inicial contra una

elaborada a la misma concentración pero con pectina comercial. El desarrollo de los experimentos se realizó a tres diferentes pH (1.2, 6.2 y 7.6), por medio del Método de Disolución y se cuantificó la cantidad de riboflavina liberada por el Método de Espectroscopia Ultravioleta Visible. Además, se realizó la cinética de liberación de las matrices evaluadas en el experimento final, utilizando como medio pH 7.6, las muestras fueron tomadas a los 5, 15, 25, 35 y 45 minutos. Con los resultados se graficó concentración versus tiempo para determinar el orden de reacción.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente a través de un Diseño de Experimentos Multifactorial, Test de Tukey y Diagrama cajas. Luego se codificaron para realizar el análisis en el software estadístico R (Dark and Stormy night) versión 3.6, obteniéndose como resultado que la matriz que presenta un comportamiento similar a un sistema de liberación modificado es la matriz 2 A, la cual presenta una cinética de reacción que sigue una tendencia que se apega a un modelo de orden cero. Lo que demuestra que su comportamiento es similar al de los fármacos existentes en la industria farmacéutica, ya que la velocidad de reacción es independiente de la concentración del fármaco, lo que permite controlar la liberación y que esta se dé en el sitio de elección.

El trabajo se realizó en la Universidad de El Salvador, en la Facultad de Química y Farmacia, en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y Laboratorio de Control de Calidad, durante los meses de septiembre de 2019 a febrero de 2020.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Comparar la liberación de Riboflavina contenida en diferentes matrices elaboradas con pectina extraída del mesocarpo de la “Naranja”, como posible sistema de liberación retardada.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Extraer pectina del mesocarpo de la “Naranja” de la variedad *Citrus aurantium*.
- 2.2.2 Realizar pruebas de control de calidad fisicoquímico a la pectina extraída y pectina grado comercial.
- 2.2.3 Elaborar matrices compuestas por Starch 1500, Polivinilpirrolidona, pectina comercial y pectina derivada del mesocarpo de la “Naranja” a tres diferentes concentraciones para el diseño de un sistema matricial que permita la liberación de la Riboflavina.
- 2.2.4 Evaluar la liberación por medio de Disolución de la Riboflavina incorporada en las diversas matrices, elaboradas a diferentes pH y cuantificar la cantidad de fármaco liberada por medio de Espectroscopia UV-VIS.
- 2.2.5 Comparar los resultados obtenidos de cada una de las matrices por medio de un análisis estadístico y determinar qué matriz es más efectiva para la liberación de la Riboflavina.

2.2.6 Determinar la cinética de liberación de la Riboflavina en las diferentes matrices disueltas en el medio que propone la prueba de disolución de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 37/ NF 32).

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

En la década de los años sesenta del pasado siglo, el gran objetivo del Farmacéutico era garantizar que el producto final contuviese exactamente la dosis necesaria y suficiente para ejercer los efectos terapéuticos pretendidos. Una vez reconocida la actividad biológica del principio activo, la gran preocupación residía en garantizar la existencia de métodos capaces de controlar las propiedades físicas, químicas y tecnológicas de la respectiva forma farmacéutica que asegurasen la presencia de una dosis precisa y uniforme del principio activo, su estabilidad fisicoquímica y biológica durante todo el tiempo exigido para su consumo por el paciente.

En el último cuarto de siglo XX, se identificaron numerosos casos de alteración de la biodisponibilidad farmacéutica debida a diversas modificaciones tecnológicas, llegando a la conclusión de que la eficacia farmacológica de un medicamento dependía exclusivamente de las características del principio activo, era objetivamente errónea, y tomó relevancia la formulación y la tecnología de fabricación sobre la respuesta fisiológica a la administración del medicamento.⁽²⁰⁾

En las últimas décadas se ha incrementado el desarrollo de sistemas o dispositivos que permiten que un principio activo pueda liberarse de manera controlada o bien orientarse a una región determinada del cuerpo.⁽⁹⁾

En la actualidad existen en el mercado numerosos productos formulados para administración oral y parenteral que entregan el principio activo en forma controlada. Sin embargo, muchos de estos preparados emplean tecnologías muy sofisticadas en su elaboración, difícilmente alcanzables en países en desarrollo y con mercados reducidos, lo que hace que éstos sean dependientes de la compra de tecnología.⁽²⁰⁾

Es así como la investigación en preparados farmacéuticos de liberación modificada ha experimentado un desarrollo importante en los últimos años, avalada tanto por el conocimiento farmacocinético de los principios activos como por los grandes avances en la obtención de polímeros biocompatibles, produciendo un sistema de liberación que optimice la seguridad y la eficacia de los tratamientos, simplificando así su posología.

La industria química farmacéutica de El Salvador forma una parte importante para la economía nacional. El sector ha obtenido un crecimiento muy notable en los últimos años; la producción ha crecido desde \$213 millones en 2004 hasta \$ 297 millones en el 2011. El aumento, de \$ 84 millones, refleja la estrategia de la industria para ir sustituyendo en lo posible los productos importados.

Entre otras cifras, la industria farmacéutica salvadoreña exportó \$139.7 millones en 2017, lo que representó un 1 % de crecimiento, siendo el quinto sector industrial más importante del país, en concepto de exportación. INQUIFAR tiene 15 laboratorios asociados que representan el 60 % de las exportaciones de medicamentos de El Salvador. Además, el país le exporta el 81 % de su producción farmacéutica a Centroamérica.

A pesar de que dicha industria es una potencia de exportación a nivel nacional El Salvador sigue siendo un país dependiente de la investigación y desarrollo en medicamentos que se origina en países de mayor avance, sin embargo, participa en las etapas de verificación de la eficacia y seguridad de las moléculas nuevas (estudios clínicos fase III y IV). Dentro de las principales causas que limitan el desarrollo de investigaciones están: falta de recursos financieros, logística, tecnología, ausencia de un marco regulatorio en investigaciones biomédicas, inexistencia de prioridades de investigación que den respuesta a los principales problemas de salud de la población, ya que solamente se cuenta con las investigaciones que realizan en las universidades.⁽¹⁶⁾

3.1 Sistemas de liberación modificada.

La Real Farmacopea Española describe las formas farmacéuticas de liberación modificada como aquellas preparaciones en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas, es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía.⁽⁹⁾

Esta modificación liberada se consigue por una formulación particular o por un método de fabricación especial. Existen numerosas clasificaciones basadas en la forma de liberar el fármaco o bien en los mecanismos que gobiernan dicha liberación (ver Tabla N°1). La siguiente tabla explica en que consiste la clasificación, de acuerdo con lo que aparece en la mayoría de los tratados de tecnología farmacéutica:

3.1.1 Clasificación de los sistemas de liberación modificada.

Tabla N° 1. Ejemplos y principales características de las Forma Farmacéuticas de Liberación Modificada ⁽¹⁵⁾

Tipo de sistema	Características principales
Liberación acelerada	Disolución rápida del fármaco sin necesidad de administración de líquidos. No se prolonga el efecto terapéutico.
Liberación diferida	Retardadas: diseñadas para salvar el pH gástrico o para evitar gastrolesividad del fármaco. No prolongan el efecto terapéutico. Pulsátil: liberación secuencial del medicamento
Liberación prolongada	Diseñados para prolongar la concentración plasmática (Cp) del fármaco o para mejorar las características farmacocinéticas del medicamento.
Flotantes y bioadhesivos	Diseñados para aumentar el período de residencia gástrico.

Existen numerosas clasificaciones basadas en la forma de liberar el fármaco o bien en los mecanismos que gobiernan dicha liberación. La siguiente clasificación pretende ser lo más sencilla posible, de acuerdo con lo que aparece en la mayoría de los tratados de tecnología farmacéutica:

3.1.2 Sistemas de liberación acelerada:

Se trata de formas sólidas que se disuelven instantáneamente en la cavidad bucal sin necesidad de administración de líquidos. En este grupo se pueden encontrar diferentes sistemas en función del mecanismo de liberación, como los comprimidos de disgregación rápida en contacto con la saliva o los liotabs bucodispersables. En algunos casos se presentan como sistemas que permiten aumentar la biodisponibilidad de determinados fármacos al reducir el efecto de primer paso por su absorción sublingual o bien pregástrica, a través de la mucosa bucal, faríngea y esofágica.

3.1.3 Sistemas de liberación diferida:

En este grupo se incluyen los sistemas diseñados para liberar el fármaco de forma retardada, los cuales, sin prolongar el efecto terapéutico, permiten modificar el tiempo o el lugar donde se va a producir la liberación. Aquí se encuentran los sistemas de cubierta entérica que tienen la finalidad de salvar el contacto del principio activo con los jugos gástricos, bien para evitar su inactivación o para evitar la gastrolesividad del mismo (ejemplo: aspirina microencapsulada).

3.1.4 Sistemas de liberación prolongada:

Algunos autores hablan también de liberación controlada o sostenida. Se trata de sistemas diseñados principalmente para prolongar el efecto terapéutico o bien, disminuir los picos de concentración característicos de los sistemas convencionales. Estos sistemas se llevan utilizando varias décadas, aunque siguen apareciendo novedades diseñadas para facilitar la posología o aportar un mejor perfil farmacocinético. En este sentido, es conocido el cambio de formulación galénica que permite una liberación continua al presentar el principio activo de forma cristalizada, que se va disolviendo de manera lenta y continua.

3.1.5 Sistemas flotantes y bioadhesivos:

En este caso se trata de sistemas diseñados para retrasar el tránsito gastrointestinal del medicamento o aumentar el período de residencia gástrico del mismo. Facilitan la absorción gástrica o en las primeras porciones del intestino delgado de determinados fármacos. Se utilizan en principios activos resistentes a los jugos gástricos y con procesos de liberación-absorción para los que este sistema pueda suponer una ventaja en la biodisponibilidad del medicamento. También se benefician de estos sistemas los principios activos cuya absorción es mayoritaria en las primeras porciones del intestino delgado (ejemplo: calcio). Los sistemas flotantes basan su efecto en conseguir una menor densidad que los jugos gástricos, bien introduciendo hidrocoloides en la gelatina de encapsulación o bien mediante cámaras de flotación. ⁽⁹⁾

3.1.6 Sistema de Liberación al que está dirigido la investigación.

El sistema de liberación en el que se va a centrar la investigación será orientado a la Liberación Diferida específicamente al sistema de liberación retardado. Con la liberación retardada se conseguirá retrasar el tiempo de liberación, alargando el tiempo de latencia hasta que el sistema esté a nivel del colon y poder liberar el fármaco en el órgano esperado, por lo tanto, no se espera obtener niveles plasmáticos del fármaco hasta que la forma farmacéutica se encuentre en la zona del tracto digestivo en donde se desea que se active el sistema.

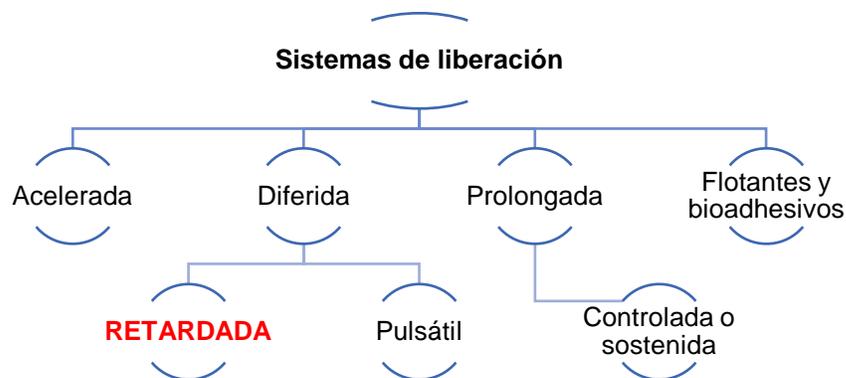


Figura N° 1. Esquema de clasificación de Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada (FFLM)

Tabla N° 2. Ventajas y desventajas de las Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada. ⁽¹¹⁾⁽⁹⁾

Ventajas	Desventajas
Reducción de la frecuencia de administración (simplificación de la posología).	Costo elevado.
Disminución de la fluctuación de niveles plasmáticos.	Correlaciones <i>in vitro/in vivo</i> difíciles de predecir.
Efecto terapéutico más uniforme.	Posible sobredosificación por liberación inmediata e incontrolada de la dosis.
Reducción de efectos secundarios relacionados con dosis elevadas.	Dificultad de ajuste de dosificación

Los sistemas de liberación modificada también se pueden clasificar en función del mecanismo por el cual se libera el principio activo. La liberación puede ocurrir por difusión, disolución, presión osmótica, fuerza mecánica, hinchamiento, erosión o activación. ⁽¹⁹⁾⁽³³⁾

Los sistemas poliméricos de liberación de fármacos se pueden clasificar de otra manera y es según la forma de incorporación del fármaco, distinguiéndose transportadores químicos y físicos.

3.2 Dosificación controlada por mecanismos físicos

En el caso de sistemas con unión física entre el polímero y el agente bioactivo, los tipos más representativos en función del mecanismo de actuación son los sistemas:

- Controlados por difusión, bien en depósitos o reservorios (membranas), en matrices (monolíticos)
- Controlados por el disolvente (sistemas osmóticos y sistemas controlados por hinchamiento).



Figura N° 2. Dosificación controlada por mecanismos físicos.

3.2.1 Sistemas controlados por difusión

La cantidad de producto bioactivo que llega a una zona determinada de aplicación se controla mediante un fenómeno de difusión del compuesto: directamente a través de la estructura molecular del polímero o a través de macro o microporos. Sin embargo, el caso más frecuente es una combinación de ambos mecanismos.⁽⁶⁾

- Sistemas matrices o dispositivos monolíticos.

En estos sistemas el compuesto bioactivo se encuentra uniformemente distribuido en un soporte de polímero sólido. El fármaco puede encontrarse disuelto en la matriz polimérica o disperso si su contenido es mayor que el límite de solubilidad. La migración del fármaco al medio se produce por difusión molecular a través del soporte o por difusión a través de microporos existentes en la matriz polimérica.

3.2.2 Sistemas controlados por el disolvente ⁽⁶⁾

Son matrices poliméricas o sistemas con depósito donde la liberación es controlada por la penetración de un disolvente, vía ósmosis o hinchamiento.

- Sistemas controlados por hinchamiento. Son sistemas monolíticos en los que el compuesto activo se encuentra disuelto o disperso en un soporte de polímero

hidrófilo, entrecruzado o no, el cual se hincha sin disolverse cuando se pone en contacto con un medio acuoso. En estos sistemas el grado de hinchamiento (y por tanto la cantidad de fármaco liberada) depende del balance hidrófilo/hidrófobo de la matriz polimérica y del grado de entrecruzamiento.

3.3 Sistemas matriciales (12)(21)(23)

Un sistema matricial o monolítico consiste en una dispersión homogénea del PA y demás excipientes en el seno de una red polimérica de naturaleza hidrofílica, hidrofóbica o inerte que controla la velocidad de liberación a través de la matriz.

Actualmente, los sistemas matriciales son considerados como una de las formas más accesibles de controlar la liberación de un PA, y son ampliamente utilizados para la elaboración de SLM orales debido a su relativa simplicidad, rápida producción y baja influencia de variables fisiológicas en el comportamiento de liberación (pH, temperatura, ionización), además son seguros frente a la rotura, ya que no conducen a la liberación rápida y masiva del fármaco como en los sistemas reservorio.

El progreso alcanzado en la manufactura de los sistemas matriciales deriva directamente de los avances en la ciencia de los polímeros y del conocimiento cada vez más exacto de los factores que influyen el comportamiento de estos sistemas matriciales.

Los sistemas matriciales pueden ser considerados actualmente como una de las formas más fáciles y menos costosas de controlar la liberación de los principios activos. Estos sistemas retardan y regulan la liberación del principio activo, mediante un proceso que sigue las leyes de difusión. ⁽⁹⁾

Según sus características, se pueden distinguir tres tipos de matrices:

1. Matrices inertes, plásticas o insolubles.
2. Matrices hidrofílicas.
3. Matrices lipídicas.

La matriz en estudio se clasifica como “Matrices hidrofílicas”.

3.3.1 Matrices hidrofílicas

Estas son obtenidas por la compresión de una mezcla que contiene un principio activo relativamente soluble y un polímero no digerible que actúa como un agente gelificante. Este polímero se hidrata e hincha cuando entra en contacto con los líquidos digestivos. De esta manera hay formación de una capa gelificada, cuyo espesor aumentará con el tiempo. El fármaco tiene que difundir progresivamente a través de esta capa gelificada. La liberación del principio activo puede describirse en cuatro pasos no consecutivos:

-La penetración del líquido del medio de disolución o del tracto gastrointestinal en el comprimido junto con la disolución simultánea de una cantidad pequeña de fármaco que se encuentra en la superficie externa de la forma farmacéutica.

-Hinchamiento del polímero hidrófilo por adsorción de agua y formación de una barrera gelificada.

-Penetración de los líquidos circundantes en la profundidad de los comprimidos por difusión a través de la capa de gel y disolución del fármaco.

-Difusión del fármaco disuelto a través de la barrera gelificada.

Este tipo de matriz presenta las siguientes ventajas:

1. La liberación del fármaco es poco o no influenciada por las variaciones de las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas en el tracto gastrointestinal.
2. El proceso de manufactura es a menudo simple y barato y numerosos excipientes muy conocidos pueden usarse por su buena tolerancia.

En las matrices hidrofílicas, es posible modificar el ambiente de disolución de fármaco para controlar la velocidad de liberación creando un “micro-pH” en la matriz con el uso de sustancias apropiadas.

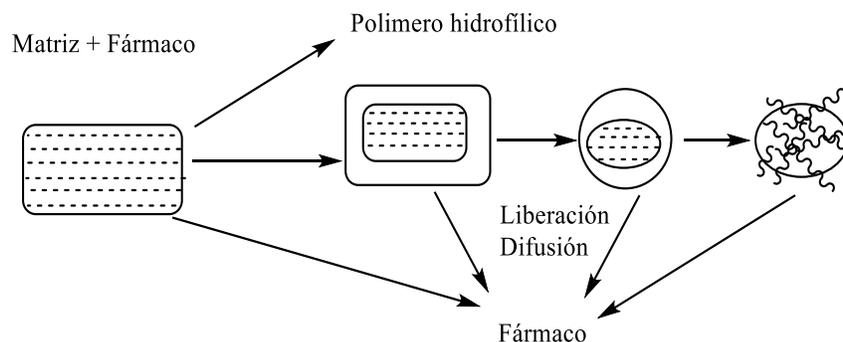


Figura N° 3. Representación esquemática del proceso de liberación desde una matriz hidrofílica.

3.4 Vitaminas⁽⁴⁾

El cuerpo humano diariamente necesita una amplia variedad de nutrientes que le permitan funcionar correctamente y dentro de estos nutrientes se encuentran las vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles, muchas de las vitaminas que nuestro cuerpo necesita las obtiene de los alimentos que consume, pero hoy en día la mala alimentación genera deficiencia de ellas, por lo que los procesos y actividades normales del cuerpo humano no se llevan a cabo con normalidad, es aquí donde los suplementos alimenticios son necesarios. Siendo la vitamina B₂ o Riboflavina una vitamina hidrosoluble de amplia administración en todo el mundo, por ser de carácter hidrosoluble no se almacena en el organismo, esto implica que debe ingerirse diariamente en los alimentos para que el cuerpo pueda hacer uso de ella, ya que es un fármaco muy estudiado y de amplio margen terapéutico ideal para ser utilizado como principio activo modelo para el presente estudio.

Las vitaminas son consideradas como compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento y, en general para el buen funcionamiento del organismo. Aunque se tenga una dieta rica en otros nutrientes es necesario, abastecer al organismo de cantidades adecuadas de vitaminas ya que su carencia provoca ciertas manifestaciones químicas que no pasan desapercibidas, así mismo, las vitaminas están relacionadas con la fusión

de las enzimas, ya que inician y catalizan las reacciones químicas; sin embargo, se conoce claramente que varias vitaminas solo actúan en combinación con ciertas proteínas específicas y forman en este caso enzimas. Algunas vitaminas forman complejos enzimáticos e intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono; ejemplo: vitamina B₁ y B₂.

3.4.1 Riboflavina ⁽⁴⁾⁽²²⁾

La Riboflavina (vitamina B₂) es una vitamina hidrosoluble, componente principal de los cofactores FAD y FMN y por ende es requerida por todas las flavoproteínas, así como para una amplia variedad de procesos celulares. Como otras vitaminas del complejo B, tiene un papel importante en el metabolismo energético, y es requerida en el metabolismo de grasas, carbohidratos y proteínas. (Ver Anexo N°1)

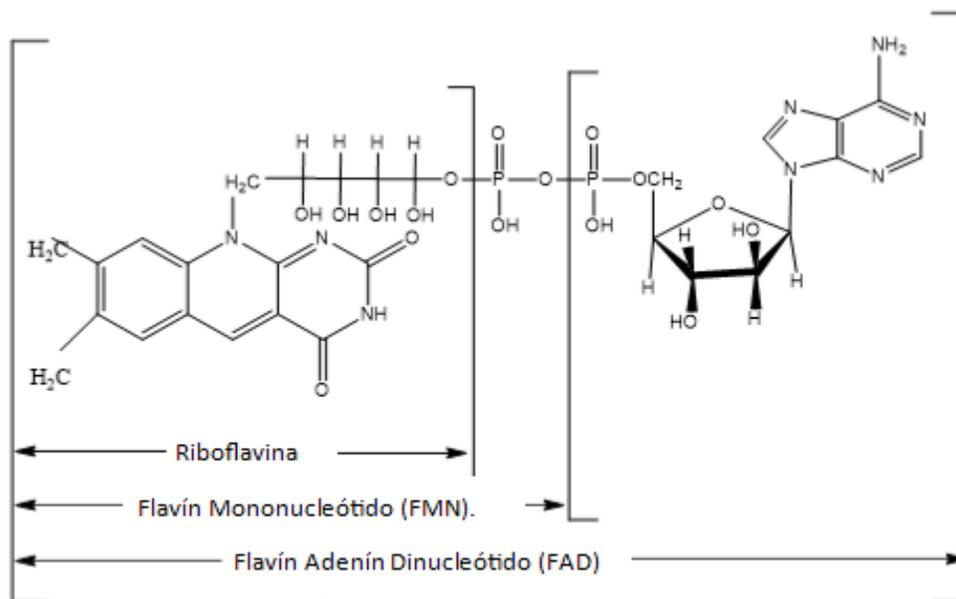


Figura N° 4. Estructura de la Riboflavina, Flavin Mononucleótido (FMN) y Flavin Adenín Dinucleótido (FAD).

El aislamiento y la caracterización de la enzima proteica amarilla originalmente de la levadura motivaron la realización de estudios sobre el carácter esencial del

pigmento flavínico de la enzima en el metabolismo del ser humano, el crecimiento y la salud.

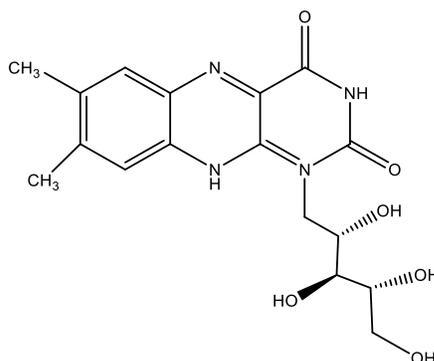


Figura N° 5. Estructura química de Riboflavina.

3.4.1.1 Características fisicoquímicas de la Riboflavina:

La Riboflavina es un polvo cristalino, de color amarillo-naranja que tiene un olor ligero. Cuando está seca no se afecta en grado apreciable por la luz difusa. En solución alcalina, es soluble con facilidad, pero es bastante inestable al calor y a la luz forma lumiflavina, un producto de degradación fluorescente que carece de actividad biológica.

La Riboflavina es más estable al calor en solución ácida, en particular de pH 1 a 6.5, pero ante la irradiación forma lumicromo que también carece de actividad biológica. Las soluciones de Riboflavina tienen una fluorescencia amarillo-verde característica, con una absorción máxima en 565 nm en el rango de pH ácido.

Un gramo se disuelve en 3,000 a 20,000 mL en agua, las variaciones de solubilidad se deben a diferencias de la estructura cristalina interna de la Riboflavina; es más soluble en solución isotónica de cloruro de sodio o alcalina que en agua, y es menos soluble en alcohol. Es insoluble en la mayoría de los solventes de lípidos y solventes orgánicos. La actividad de la Riboflavina se expresa en miligramos de la sustancia químicamente pura.

3.4.1.2 Incompatibilidades

La Riboflavina es incompatible con álcalis (descomposición), sales de metales pesados (precipitación), reductores y otras vitaminas hidrosolubles.

3.4.1.3 Farmacocinética

Absorción: Rápida por el tracto gastrointestinal superior, la absorción involucra el mecanismo de transporte activo y la extensión de la absorción GI, está limitada por la duración del contacto de la droga con el segmento de la mucosa especializado, donde ocurre la absorción. La Riboflavina 5-fosfato se absorbe rápida y casi completamente desfosforilada en el lumen GI, antes de que ocurra la absorción. La absorción de la Riboflavina se incrementa cuando se administra con alimentos, y disminuye en pacientes con hepatitis, cirrosis, obstrucción biliar, o en aquellos que están recibiendo probenecid. La Riboflavina libre está presente en la retina. Se almacena en cantidades limitadas en el hígado, bazo, riñones y alrededor del 60 % del DFA y MNF están unidos a proteínas. Vida media biológica: Alrededor de 66-84 minutos después de la administración oral o intramuscular de una sola dosis grande en individuos sanos. Excreción: Después de la ingestión de dosis fisiológicas usuales de Riboflavina, solamente alrededor del 90 % es excretada sin cambios en la orina. La excreción parece que involucra secreción tubular renal, así como filtración glomerular. Metabolismo: Hepático.

3.4.1.4 Mecanismo de acción

Funciona como una coenzima la Riboflavina 5-fosfato (mono nucleótido de flavina [MNF]), el MNF es convertido a otra enzima, el dinucleótido flavina denina (DFA). Estas coenzimas actúan como un acarreador de moléculas de hidrógeno para muchas enzimas (flavoproteínas), involucradas en la óxido-reducción de sustancias orgánicas y en el metabolismo intermediario. La Riboflavina también está involucrada, indirectamente, en el mantenimiento de la integridad eritrocítica. Participa en el sistema de transporte de electrones, en la conversión de la oxidación tisular a energía útil. La aplicación terapéutica de la Riboflavina

se ha establecido para la prevención y tratamiento de las enfermedades causadas por su deficiencia.

3.4.1.5 Usos terapéuticos de la Riboflavina.

La Riboflavina es utilizada para la prevención de bajos niveles de Riboflavina (deficiencia de Riboflavina), los dolores de cabeza de migraña. También se utiliza para el tratamiento de la deficiencia de Riboflavina. Algunas personas usan la Riboflavina para las enfermedades oculares como la fatiga ocular, las cataratas y el glaucoma. La vitamina B₂ (Riboflavina) proporciona energía al interior de las células y se necesita para producir enzimas decisivas en la liberación de la energía que tienen las grasas, los carbohidratos y las proteínas que ingerimos de los alimentos.

Esta vitamina hidrosoluble es vital para el crecimiento e importante en la reproducción celular y ayuda a producir glóbulos rojos sanos. Mantiene, además, la buena salud de la piel, las uñas y el cabello. Incluso es muy probable que ayude a la memoria ya que las personas mayores que tienen niveles normales de vitamina B₂, mantienen vivos sus recuerdos.

Así mismo ayuda al sistema inmunológico manteniendo en buen estado las membranas mucosas que forman el aparato respiratorio y el digestivo. Conserva además el estado de las superficies húmedas del cuerpo como los ojos, la boca, la lengua y la vagina.

Durante el embarazo, comer alimentos que contienen vitamina B₂, evita la malformación ósea y los trastornos en el desarrollo cerebral del feto. Beneficia también a los ojos, ya que oxigena la córnea y alivia la fatiga de éstos. La carencia de esta vitamina, muy frecuente entre adolescentes, embarazadas, ancianos y deportista; afecta también a quién usa de manera prolongada anticonceptivos y/o antidepresivos. Cuantas más calorías se agreguen a la dieta, más Riboflavina necesita el cuerpo.

Dosificación:

- Para el tratamiento de los niveles bajos de Riboflavina (deficiencia de Riboflavina) en adultos: 5-30 mg de Riboflavina (vitamina B₂) al día en dosis divididas.
- Para la prevención de los dolores de cabeza de migraña: 400 mg de Riboflavina (vitamina B₂) por día. Puede tomar hasta tres meses para obtener los mejores resultados.

3.5 Generalidades de la “Naranja” *Citrus aurantium*

3.5.1 Clasificación botánica del *Citrus aurantium*⁽¹⁰⁾

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Rutaceae
Subfamilia	Citroideae
Tribu	Citreae
Género	Citrus
Subgénero	Eucitrus
Especie	Citrus aurantium
Nombre común	Naranja agria

3.5.2 Características botánicas de la naranja *Citrus aurantium*

Nombre científico	<i>Citrus aurantium</i>
Nombre vernáculo	“Naranja agria”
Familia	Rutáceas
Descripción olfativa del jugo	Agrio, cítrico

Apariencia del jugo	Líquido amarillo claro
Aroma del jugo	Fresco y cítrico
Propiedades del jugo	Útil como estimulante digestivo y linfático, sedante, se usa para el tratamiento de la obesidad y la retención de líquidos.

3.5.3 Descripción botánica: ⁽¹⁰⁾

Árbol de hasta 6 m de alto con copa redonda, espinas largas y más bien flexibles. Hojas de 7 a 10 cm, agudas a acuminadas; pecíolo anchamente alado. Flores axilares de tamaño mediano, blancas. Fruto de 7 a 8 cm de diámetro, globoso, algo aplanado en el ápice, con 10 a 12 segmentos; pulpa ácida.



Figura N° 6. Descripción de *Citrus aurantium*.

3.5.4 Distribución geográfica:

Nativa de Asia, cultivada en regiones tropicales y subtropicales.

3.5.5 Estudio fitoquímico: ⁽¹⁰⁾⁽²⁷⁾

- La hoja contiene aceite esencial: linalool (11%), acetato de linalool; flavonoides: neodiosmina, neohesperidina, naringina y roifolina.

-La semilla tiene diversos triterpenos; el fruto contiene triterpenos: limonina, nomilina y ácido nomilínico y un alcaloide isoquinolínico: sinefrina

-La pulpa del fruto presenta grandes cantidades de ácidos orgánicos (cítrico y málico principalmente) y de vitamina C; el pericarpio posee pectina.

-La flor contiene aceite esencial («neroli») 0.05- 0.5%: limoneno, linalool, nerol y antranilato de metilo.

- El pericarpio ha sido ampliamente estudiado y contiene, entre otros componentes flavonoides: naringenina, hesperidina, neohesperidina; aceite esencial («curaçao») 2%: limoneno (90%).

La pectina se obtiene del mesocarpo de los frutos cítricos o del bagazo de las manzanas exprimidas por extracción con ácidos diluidos.

3.5.6 Usos populares: ⁽²⁷⁾

La decocción o infusión de hojas se usa para tratar afecciones digestivas (cólico, indigestión, hipo, náusea), respiratorias (asma, bronquitis, gripe, resfrío, tos), nerviosas (cefalea, epilepsia, insomnio, 138 palpitaciones), cardíacas y urinarias, hipertensión y fiebre. Las flores en jarabe o infusión se usan para tratar afecciones nerviosas (excitación, insomnio). La tintura del epicarpio se utiliza para afecciones digestivas y nerviosas. El jugo del fruto se utiliza para tratar afecciones digestivas (diarrea, gastritis) y respiratorias (catarro, inflamación de garganta, fiebre, resfrío, tos) y reumatismo. El aceite se utiliza en el tratamiento de bronquitis crónica. El jarabe y tintura de corteza se usan para el dolor de estómago, bronquitis, disentería e insomnio.

3.5.7 Porcentaje de pectina en frutos:

El mesocarpo de los cítricos es rico en pectina, modificándose su contenido según la estación y la variedad. Esta sustancia se asocia con la celulosa y le proporciona a la pared celular la habilidad de absorber grandes cantidades de

agua. La celulosa tiene un importante rol en la estructura ya que les da rigidez a las células, mientras que la pectina confiere la textura. Dentro de frutos con mayor rendimiento en la extracción de pectina se tienen: glicósidos saponínicos.

Tabla N° 3. Porcentajes de rendimiento de pectina por fruto. ⁽²⁵⁾

Fruto	% Pectina
Cítricos	20-35%
Manzana	10-15%
Girasol	15-25%
Remolacha	10-20%
Maracuyá	15-20%

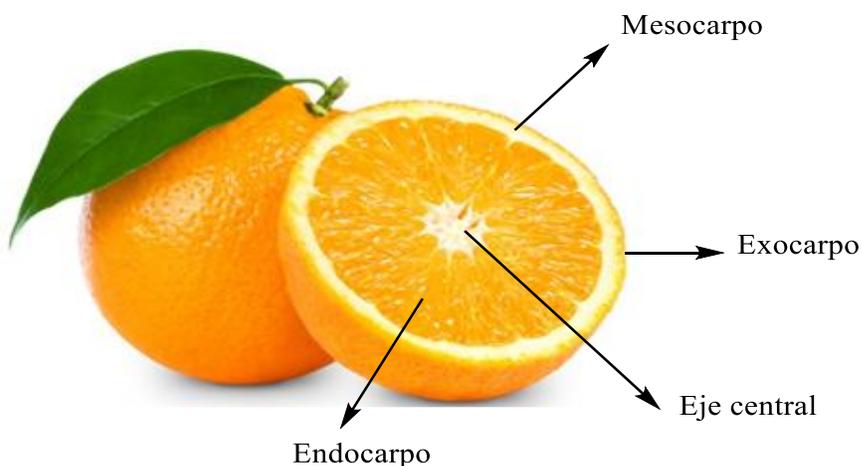


Figura N° 7. Partes de la "Naranja".

3.6 Generalidades físicas y químicas de la pectina ⁽¹⁾

3.6.1 La pectina sus orígenes

La pectina fue descubierta en 1790 cuando Vauquelin encontró primeramente una sustancia soluble de los zumos de fruta. El científico francés Braconnot continuó el trabajo de Vauquelin y encontró que "una sustancia ampliamente disponible de plantas vivas y ya observada en el pasado, tenía propiedades

gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución". La llamó "pectina ácida" del griego "pectos" que significa sólido, coagulado. (The Apple. The Pectin, Herbstreith).

La pectina fue definida por Kertesz (1951) como los ácidos pectínicos solubles en agua de grado de metilación variado que son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones determinadas. Esta definición abarca la gelificación con calcio de los ácidos pectínicos, definidos por Kertesz (1951) o como los ácidos poligalacturónicos coloidales aislados de plantas conteniendo una cierta proporción de grupos metiléster. De ahí que también el término pectina se usa colectivamente para incluir ácido péctico, la forma de pectina completamente desesterificada.

Las formas de pectina son generalmente reconocidas como seguras por la U.S. Food and Drug Administration (Food and Nutrition Encyclopedia, 1983). Las especificaciones legales para pectinas están enunciadas internacionalmente (Copenhagen Pectin).

3.6.2 Definición del término pectina

La pectina se define como un hidrato de carbono purificado que se obtiene de la porción interna de la cáscara (mesocarpo) de los frutos cítricos o del bagazo de las manzanas exprimidas por extracción con ácidos diluidos. La pectina es útil por su capacidad de formar geles o jaleas con compuestos polihidroxilados como los azúcares, donde actúan como agentes aglutinantes o de adhesión, sus células son polisacáridos altamente hidrofílicos que pueden absorber varias veces su peso en agua.

3.6.3 Sustancias pécticas ⁽²⁷⁾

Las sustancias pécticas son mezclas complejas de polisacáridos que constituyen una tercera parte de la pared celular de las plantas dicotiledóneas y de algunas monocotiledóneas, menor proporción de estas sustancias se

encuentran en las paredes celulares de las plantas herbáceas. Estas sustancias se encuentran en la pared celular primaria, en los intersticios entre los depósitos de celulosa y hemicelulosa. Las pécticas también actúan como cemento intercelular entre las paredes de las células vecinas. Químicamente son polímeros del ácido D-galacturónico unido por el enlace alfa 1,4-glucosídico.

3.6.4 Clasificación de las sustancias pécticas ⁽²⁵⁾

Según cuántos grupos carboxílicos están esterificados en la cadena o polímero, se clasifican en:

-Protopectinas: Si todos los carboxilos están esterificados. Éstas son insolubles en agua y se hallan en mayor cantidad en los tejidos de los frutos no maduros o verdes.

-Ácidos pectínicos: Si solo una parte, pero mayoritaria de los carboxilos está esterificada. Estos compuestos son capaces de formar geles si las condiciones de sólidos solubles y pH son adecuadas. Las sales de estos ácidos se llaman pectinatos.

-Pectinas: Son los ácidos pectínicos, solubles en agua caliente, con un contenido medio de éster metílico. La principal característica es su capacidad de formar geles en presencia de suficientes sólidos solubles, ácidos o iones polivalentes.

-Ácidos pécticos: Estos compuestos no poseen grupos carboxílicos esterificados. Las sales de estos se denominan pectatos y reaccionan fácilmente con los iones calcio de las células para producir compuestos insolubles en los jugos de frutas, dando un precipitado visible comúnmente en la separación de fases o abanderamiento en los néctares.

3.6.5 Estructura química de la pectina ⁽²⁷⁾

Estructuralmente la pectina son polisacáridos constituidos por cadenas largas de unidades de ácido D – galacturónico, unidas entre sí por enlaces α – 1- 4, de cadenas que forman el ácido poligalacturónico o ácido péctico, en las cuales un 50% - 60% de los grupos carboxilo están esterificados con alcohol metílico.

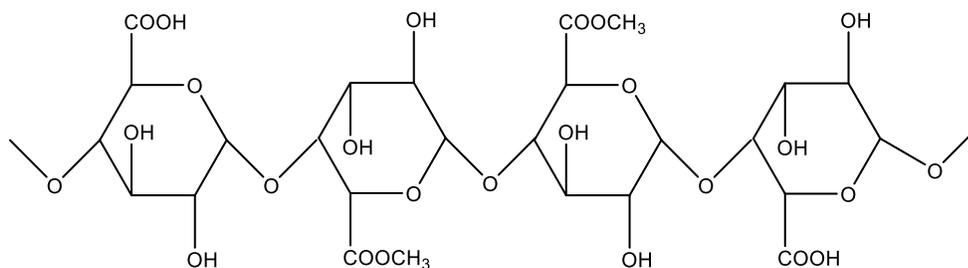


Figura N° 8. Estructura de la pectina.

Hay monómeros de ramnosa insertados dentro de la cadena principal de residuos de ácido galacturónico. Unido al extremo reductor de los mismos por enlaces ($1\alpha - 2\beta$) y al extremo no reductor del siguiente residuo urónico por enlaces ($1\beta - 4\alpha$). Debido a su compleja estructura el peso molecular de la pectina está comprendido entre 50.000 y 180.000 daltons.

3.6.6 Propiedades fisicoquímicas de las pectinas ⁽²⁷⁾

Las variaciones en el grado de metilación son causadas principalmente por ciertos factores como son:

- El grado de metilación que ocurra durante la extracción y purificación de la pectina.
- Diferentes contenidos de grupos metoxilos de las sustancias pécticas en su estado natural.
- Dilución de las sustancias pécticas por materiales adjuntos como son arabinosa y galactosa.

En cuanto a la preparación de las pectinas se puede obtener dos tipos fundamentales, dependiendo del grado de esterificación, así tenemos:

- Pectina de elevado grado de esterificación (HM) que contiene de 7 a 12% de grupos metoxilo.
- Pectina de bajo grado de esterificación (LM) con una cantidad de grupo metoxilo de 2.5 a 4.5%.

La determinación del grado de metoxilo se basa en el análisis cuantitativo del álcali que se requiere para la saponificación de un éster. La pectina rinde no

menos de 6.7% de grupos metoxílicos (-OCH₃) y no menos de 74% de ácido galacturónico (C₆H₁₀O₇). El porcentaje de grupos metoxílicos máximo es de 14% que corresponde a la pectina de bajo metoxilo, también llamadas pectinas de baja esterificación, el pH de la pectina varía de 2.5 – 3.4 como función del grado de esterificación.

La función biológica de la pectina en las plantas fija hasta un 30 % de los polisacáridos de muchas plantas. El ión calcio induce enlaces entrecruzados en la adhesión celular y textura del tejido, así como la extensibilidad de la pared celular. A pesar del alto grado de metilación de las pectinas en las partes crecientes de la planta.

3.6.7 Parámetros de Medición de la Calidad de la Pectina ⁽¹⁾⁽⁷⁾

La pureza de la pectina se mide mediante el porcentaje de ácido galacturónico, que representa la masa total de anillos de dicho ácido, sobre la masa total de pectina. Tiene un valor mínimo de 65 % según la FAO y la FDA, aunque, según lo normado por la USP 37 / NF 32 este porcentaje debe encontrarse por encima del 74 %. (Ver Anexo N°2)

Las características gelificantes están determinadas por el porcentaje de metoxilación de la pectina, calculado por la relación entre la masa total de grupos éster metílicos, sobre la masa total de pectina. Para pectinas de alto metoxilo, este porcentaje debe encontrarse por encima del 6,7 %₍₇₎. Porcentajes menores a este valor, corresponden a pectinas de bajo metoxilo.

Estos parámetros de calidad son los que se espera obtener en la pectina extraída durante la investigación, ya que de esta manera la pectina extraída podría ser usada como excipiente para la elaboración de productos farmacéuticos pues cumplirá con las exigencias. ⁽⁷⁾

3.6.7.1 Pectinas de alto metoxilo (HM) ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾

Son aquellas en las cuales más del 50% de los grupos carboxilos del ácido galacturónico del polímero se encuentra esterificado con metanol como se puede

ver en la Figura.1. El grado de esterificación de las pectinas de alto metoxilo influye mucho sobre sus propiedades, en particular, a mayor grado de esterificación, mayor es la temperatura de gelificación. Estas pectinas son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2.8 y 3.5 y un contenido de sólidos solubles (azúcar) entre 60% y 70%.

Las pectinas de alto metoxilo pueden subdividirse en 2 grupos: las de gelificación rápida (Rapidset), o sea menor a 5 minutos y tiene un grado de esterificación con metanol entre el 68 y el 75%. El otro grupo es de gelificación lenta (Slowset) es decir gelifican después de 5 minutos y tienen entre 60 y 68% de esterificación con metanol.

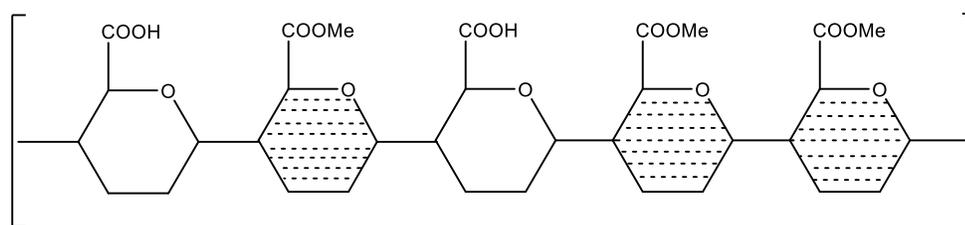


Figura N° 9. Pectinas con alto grado de metoxilo

3.6.7.2 Pectinas de bajo metoxilo (LM)

Son aquellas en las cuales menos del 50% de los grupos hidroxilo están esterificados con metanol. Para la formación del gel requieren la presencia de cationes divalente, generalmente se emplea calcio. En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces de dichos cationes con moléculas de pectina, formando una red tridimensional con los grupos carboxilo de ésta. Los geles se pueden obtener entre pH 1 a 7; el pH no afecta la textura del gel ni el intervalo de sólidos solubles y puede fluctuar entre 0 y 80%, pero la presencia de calcio (40 a 100mg) es el factor predominante en la formación del gel.

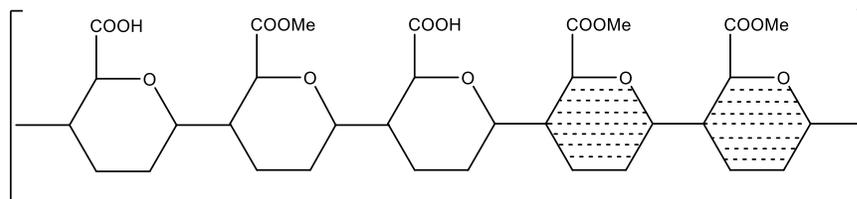


Figura N° 10. Pectinas con bajo grado de metoxilo

3.6.8 Usos farmacéuticos de la pectina ⁽²²⁾

La pectina se encuentra inscrita en la FDA como un aditivo seguro sin límites de consumo diario, por lo que ha sido ampliamente utilizada como excipiente en la formulación de comprimidos matriciales, geles, cubiertas de formas farmacéuticas, etc.

Los hidrogeles formados con polímeros naturales absorben y retienen grandes cantidades de agua y forman un material blando en contacto con los fluidos acuosos del organismo, lo cual contribuye a la biodegradabilidad y biocompatibilidad de este material. Considerando estas características Mishra y colaboradores [Mishra et al., 2008a] han desarrollado hidrogeles de pectina/polivinilpirrolidona (PVP) utilizando como agente reticulante el glutaraldehído. Los resultados obtenidos mostraron que se produce una interacción por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la pectina y los carboxilos de la PVP. Este hidrogel presenta hinchamiento pH-dependiente, que a su vez controla la liberación del fármaco modelo (ácido salicílico). Por otro lado, los ensayos de viabilidad sobre células del melanoma murino B₁₆ mostraron que todos los hidrogeles de pectina/PVP estudiados no producen ningún efecto citotóxico significativo en estas células, lo que pone de manifiesto su biocompatibilidad. Los resultados permiten concluir que los hidrogeles elaborados con pectina/PVP son candidatos prometedores para diferentes aplicaciones biomédicas. Posteriormente, estos mismos autores desarrollaron hidrogeles, en medio ácido, a partir de una pectina modificada químicamente con etanolamida, utilizando como agente reticulante el glutaraldehído. El hidrogel

obtenido resultó biocompatible y capaz de liberar por difusión el fármaco modelo (ácido salicílico), por lo que los autores consideran que esta membrana puede ser estudiada como sistema transdérmico de liberación de fármacos o como material de apósito para heridas.⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

Dado que la pectina por sí sola no resulta en todos los casos totalmente eficaz para conseguir formulaciones capaces de alcanzar de forma inalterada el colon, algunos autores han recurrido a formulaciones matriciales de pectina recubiertas con polímeros con solubilidad pH-dependiente que protejan la matriz de pectina durante su recorrido por la zona alta del digestivo. Así, se desarrollaron comprimidos con diferentes pectinas recubiertos con Eudragit® S100 con el fin de conseguir una liberación colónica de teofilina. Para mejorar las características de compresión de las pectinas se prepararon mezclas físicas con Emdex® (dextratos hidrosolubles). Los resultados pusieron de manifiesto que en todos los casos el recubrimiento con Eudragit® S100 permite mantener inalterada la formulación durante las 4 primeras horas del ensayo (2h a pH 1,1 y 2h a pH 6,8) para posteriormente, en el medio con pH 7,4, y en presencia de enzimas pectinolíticas, liberar el 100% del fármaco en un tiempo máximo de 4 horas, no teniendo incidencia el tipo de pectina utilizada (amidada y de alto y bajo grado de metoxilación).⁽¹⁹⁾

El uso de la pectina era bien valorado como agente gelificante sobre todo en la industria alimentaria en el 2011 presentaron un estudio que permitió la extracción, caracterización y evaluación de residuos del mesocarpo de la “naranja” para su posterior uso como excipiente farmacéutico, con esta investigación se obtuvo un panorama más amplio de las pruebas fisicoquímicas propuestas en la farmacopea para evaluar la pureza de dicho excipiente, cumpliendo con los parámetros deseados tanto en los estudios micrométricos y propiedades de flujo de la pectina en polvo como parámetros físicos de las tabletas formuladas con pectina del mesocarpo de “naranja”. El trabajo sugiere

que, con la metodología anterior, se puede obtener un buen rendimiento (18.69%) de pectina a partir de los residuos de dicha fruta cítrica. Además, la propiedad micromerítica y el comportamiento de flujo de la pectina derivada refuerzan el hecho de que puede usarse como excipiente para la elaboración de productos farmacéuticos.

En general, el trabajo concluye que la pectina derivada de la cáscara de naranja es un candidato potencial para ser utilizado como excipiente en formulaciones orales tanto como dispersante en liberación lenta como rápida.⁽³⁰⁾

3.6.9 Métodos de extracción de la pectina.⁽¹⁾

En cuanto a la extracción de la pectina no se cuenta con un procedimiento específico para obtener pectina a partir del mesocarpo de “naranja”. Pues existen diferentes métodos entre ellos tenemos:

-Precipitación con Alcohol Isopropílico o Etílico:

Ambos tipos de alcohol presentan la propiedad de precipitar la pectina directamente de la fuente vegetal. La precipitación de la pectina con alcohol va depender de la presencia de electrólitos, peso molecular y del grado de esterificación de la pectina. Cuando se utiliza ácido clorhídrico, cloruro de sodio y cloruro de calcio la pectina precipita completamente aún en soluciones diluidas.

Ventajas del uso de ácido clorhídrico en la precipitación:

- Es un buen neutralizante y electrolito
- Facilita la floculación
- Hidroliza fácilmente los azúcares como arabinosa, galactosa y xilosa que acompaña a la pectina.

Ventajas del método de precipitación con alcohol etílico:

- Puede recuperarse el solvente por medio de destilación y utilizarse de nuevo durante el proceso.
- Este método de extracción no es complicado.
- Buen rendimiento

- Bajo costo
- La bibliografía reporta este método como el más adecuado para la extracción de pectina cítrica.

-Precipitación con Acetona:

Cuando se utiliza cetona en presencia de pectina esta tiende a precipitar. Este método no es recomendado utilizarlo porque precipita otras materias no pécticas; aunque el grupo que se forma con cetona es más firme.

-Precipitación con Sales Metálicas:

Este método da una buena separación de pectina de los polisacáridos no urónicos, el tipo de grado de segregación son diferente a los obtenidos con los solventes orgánicos. Pero presenta la desventaja en cuanto al uso de sales metálica en su posterior removimiento del extracto de pectina, ya que la presencia de trazas de cobre o aluminio puede tener un efecto indeseable cuando son utilizados en los productos alimenticios.

-Precipitación como Pectato de Calcio:

En este método se forma el pectato de calcio que luego es regenerado con un ácido inorgánico. Una vez obtenido la solución de pectina acidulada se ajusta a un pH alrededor de 4, luego se le adiciona hidróxido de calcio poco a poco hasta clarificar la muestra, formándose un precipitado en el fondo del recipiente, en el cual por decantación se separa. El residuo que ha quedado se filtra y se lava con etanol acidulado hasta liberar el calcio presente, luego se da otro lavado con etanol, se prensa y se seca.

3.7 Polivinilpirrolidona ^{(15) (31)}

La polivinilpirrolidona (PVP) es conocida también como: poli (1-vinil-2-pyrrolidona), povidona o polividona.

La polivinilpirrolidona es un polímero sintético que se obtiene de la polimerización del radical N-vinilpirrolidona, los diferentes grados de

polimerización da lugar a polímeros de diferentes pesos moleculares. Es un polvo blanco, de flujo libre con olor característico débil y soluble en agua, actúa como un tensoactivo no-iónico, es higroscópico y de naturaleza amorfa, su peso promedio molecular se puede expresar de tres formas: el peso, el número y la viscosidad promedio. En general se caracterizan por su viscosidad en solución acuosa, relativa al agua, expresada como un valor K que puede estar entre el rango de 10 a 120.

El PVP fue sintetizado por primera vez por Walter Reppe y patentado en 1939 como uno de los derivados más interesantes de la química del acetileno. El PVP fue inicialmente utilizado como un expansor del plasma sanguíneo en la década de los 50 y más tarde en una amplia variedad de aplicaciones en medicina, farmacia, cosmética y producción industrial.

Es soluble en cloroformo, metanol, etanol, propilenglicol, trietanolamina y agua insoluble en ciclohexano, tolueno, parafina líquida y dietiléter. La naturaleza higroscópica del PVP es importante en muchas aplicaciones y depende de la humedad relativa del ambiente. Povidonas con un K igual o inferior a 30 son fabricados por secado por pulverización, esto hace que su forma sea como de esfera, y povidonas con un K mayor o igual a 90 son fabricados en un tambor de secado y se presentan como placas.

La povidona es utilizada en una variedad de productos farmacéuticos, aunque se utiliza principalmente en formas sólidas. En tabletas sirve como aglutinante, aumenta la biodisponibilidad de fármacos, ya que se ha demostrado que mejora la disolución de fármacos poco solubles en comprimidos, cápsulas, gránulos y otros.

3.8 Generalidades del almidón ⁽²⁾

El almidón es un polisacárido de origen vegetal que se almacena en las raíces, tubérculos y semillas de las plantas. Se encuentra el endospermo de todos los granos. El almidón proviene de diversas fuentes con diferentes estructuras

cristalinas. Los granos de cereal como maíz, trigo o arroz son fuentes de almidón, así como las raíces, tubérculos y legumbres, etc. Los granos de almidón o gránulos contienen polímeros de glucosa de cadena larga y son insolubles en agua. A diferencia de las moléculas pequeñas de sal o azúcar, los polímeros más largos de almidón no forman una solución verdadera.

Los gránulos de almidón forman una suspensión temporal cuando se agitan en agua; estos sin cocer pueden hincharse ligeramente a medida que absorben agua. Sin embargo, una vez que el almidón se cuece, el hinchamiento es irreversible. Esta característica de los gránulos de almidón permite que el almidón se use como espesante. Globalmente las características de los almidones están determinadas por:

- La procedencia del almidón
- La temperatura de calentamiento
- La concentración de almidón usada en una formulación.
- Estas condiciones permiten la producción de muchos tipos de almidones y en algunos casos existen almidones modificados.

3.8.1 Composición química de los almidones ⁽²⁾

El almidón es la forma principal de reservas de carbohidratos en los vegetales, es una mezcla de dos sustancias: amilosa, un polisacárido esencialmente lineal, y amilopectina, un polisacárido con una estructura muy ramificada. Las dos formas de almidón son polímeros de α -D-Glucosa. Los almidones naturales contienen 10-20% de amilosa y 80-90% de amilopectina. La amilosa forma una dispersión coloidal en agua caliente, mientras que la amilopectina es completamente insoluble debido a sus ramificaciones.

Las moléculas de amilosa consisten típicamente de 200 a 20,000 unidades de glucosa que se despliegan en forma de hélice como consecuencia de los ángulos en los enlaces entre las moléculas de glucosa.

La amilopectina se distingue de la amilosa por ser muy ramificada. Cadenas laterales cortas conteniendo aproximadamente 30 unidades de glucosa, se unen con enlaces $1\alpha\rightarrow6$ cada veinte o treinta unidades de glucosa a lo largo de las cadenas principales. Las moléculas de amilopectina pueden contener hasta dos millones de unidades de glucosa. En función de la proporción amilosa/amilopectina así serán las dos propiedades fundamentales que presentan: Absorción y Retención de agua y Capacidad de formación de gel. Así mismo esta proporción determinará las propiedades funcionales de los almidones.

3.8.2 Almidones Modificados ⁽²⁾

Los almidones naturales se pueden modificar químicamente para producir cambios físicos que contribuyan a la estabilidad, apariencia, funcionamiento y mejoras en los productos que se desarrollan a partir de él. Estas modificaciones permiten adecuar las propiedades a la finalidad tecnológica que se requiera, permitiendo la generación de productos con mejores características y de mayor calidad.

Starch 1500®

Es un almidón de maíz parcialmente pregelatinizado fabricado exclusivamente para la industria farmacéutica.

El procedimiento de producción implica una modificación física del almidón que resulta en los beneficios combinados de la funcionalidad soluble e insoluble. Starch 1500® imparte propiedades efectivas de desintegración de tabletas y ventajosas propiedades de unión y granulación en agua fría. La estructura física de Starch 1500® también imparte buenas propiedades de compactibilidad, flujo y lubricación.

El almidón de maíz se compone de dos polímeros, amilosa y amilopectina, que están estrechamente unidos en una determinada estructura esferocristalina. A través de un proceso de pregelatinización parcial que es exclusivo de Colorcon, el enlace entre las partes de los dos polímeros se rompe, lo que proporciona a Starch 1500® un equilibrio funcional efectivo y propiedades extraordinarias.

La amilosa tiene una estructura molecular de cadena lineal, que exhibe una unión intermolecular muy fuerte. La amilosa se hincha significativamente cuando se moja, dándole excelentes características de desintegración. La amilopectina tiene una cadena ramificada molecular. Estructura, que lo hace soluble en agua fría. La amilopectina funciona como un aglutinante en la granulación húmeda.

Ventajas del uso de Starch 1500® en la formulación de productos farmacéuticos ⁽²⁾

-Un desintegrante efectivo y económico en compresión directa: el Starch 1500® reemplaza los rellenos problemáticos y proporciona una acción desintegrante tan eficazmente como los súper desintegrantes, lo que reduce los costos de fabricación.

-Excelente estabilidad para drogas sensibles a la humedad: las propiedades de Starch 1500® lo convierten en un excelente diluyente para mejorar la estabilidad de los medicamentos sensibles a la humedad. Starch 1500® inhibe la actividad del agua dentro de la formulación y retrasa la interacción con el principio activo sensible a la humedad.

-Mejora la consistencia y uniformidad del contenido de las formulaciones.

-Brinda flexibilidad en el proceso de granulación: en aplicaciones de granulación húmeda, Starch 1500® presenta una doble funcionalidad como aglutinante y desintegrante.

3.9 Modelos para evaluar la cinética de liberación de los fármacos. ⁽³²⁾⁽¹²⁾⁽²⁶⁾

Conocer la forma en la que se liberan los principios activos es crucial para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas; sin embargo, es un fenómeno complejo que depende de muchos factores: estructura química, cantidad de fármaco, solubilidad, tamaño del fármaco, condiciones del medio de liberación, entre otras.

Tratar de modelar la liberación del fármaco es complicado, por ello en las últimas décadas se ha hecho un esfuerzo importante por intentar comprender los modelos y mecanismos de liberación, desarrollando numerosas ecuaciones; pese a todo el trabajo realizado la información para conocer los factores reales que controlan la liberación de los fármacos no es del todo contundente, en la Tabla N° 4 se muestran algunos de los modelos propuestos para explicar el proceso de liberación en diversas formas farmacéuticas.

Tabla N° 4. Modelos de Cinética de liberación de fármacos

MODELOS MATEMATICOS		
Tipo de mecanismo	Característica	Aplicaciones
Orden Cero	La velocidad de disolución es constante e independiente de la cantidad de fármaco disuelto.	Sistemas de liberación modificada tipo osmótico reservorio y matriciales.
Primer Orden	La velocidad de disolución es proporcional a la primera potencia de la concentración de fármaco disuelto.	Sistemas de liberación prolongada, fármacos solubles en matrices insolubles de distintas geometrías.
Modelo Hixson-Crowell o de la Raíz Cubica	Este modelo asume que la forma del sólido es esférica, que la disolución ocurre de manera perpendicular a la superficie del sólido, y que debe haber agitación del medio.	Formas geométricas que se mantienen constantes, con una ligera disminución de la superficie.
Raíz Cuadrada o Higuchi	Este se puede aplicar a matrices porosas donde el medio de disolución debe entrar a través de los poros.	Pomadas Matrices homogéneas y granulares Matrices porosas
Ley de Potencia o Modelo de Peppas	Es un modelo semiempírico que surge cuando los modelos anteriores no terminan de explicar el comportamiento de liberación	Diversas matrices con diferentes exponentes de liberación (n). Matrices con poros (n<0.5). Matrices poliméricas hinchables (n=1)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio

-Exploratorio: ya que esta investigación se llevó a cabo con el fin de proporcionar información fundamental y efectiva en investigaciones futuras, por consiguiente, los resultados obtenidos en la investigación podrán ser de utilidad en nuevas investigaciones de sistemas matriciales para liberación modificada de fármacos a través del buen uso de polímeros naturales como la pectina.

-Experimental: en la investigación se extrajo pectina cítrica y se efectuaron las respectivas pruebas de control de calidad de la misma, verificando si puede utilizarse como componente de sistemas matriciales para liberación retardada de Riboflavina; esta parte práctica, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de investigación en Productos Naturales y en el Laboratorio de Control de calidad de productos farmacéuticos de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

- Prospectivo: se plantea como un antecedente para investigaciones futuras por que los resultados obtenidos en la investigación serán de utilidad para nuevos estudios de sistemas matriciales para liberación modificada de fármacos a través del buen uso de recursos naturales como la pectina.

4.2 Investigación bibliográfica

Se realizaron consultas en libros y publicaciones de revistas científicas en las siguientes bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Universidad Alberto Masferrer (USAM)

4.3 Investigación de campo

Se realizaron dos viajes de campo hacia la Finca la Ilusión ubicada en El cantón Santa Rita Almendro, en el Municipio de Santiago Nonualco, departamento de la Paz. Durante el primer viaje se observó el hábitat del árbol *Citrus aurantium*, obteniéndose una muestra completa de la especie vegetal que fue llevada a la curadora del Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) para su identificación y la asignación del número de voucher (Ver Anexo N°3), de esta manera establecer reproducibilidad si se desea continuar con el estudio. Una vez identificada, se realizó el segundo viaje para recolectar 50 “Naranjas” de la variedad *Citrus aurantium*. Se seleccionaron aleatoriamente las muestras, con ayuda de un recolector (persona reconocida en la zona por desempeñar esa labor). Las muestras recolectadas presentaron las siguientes características: frutas, con buen grado de maduración, recién cortadas, textura firme, color uniforme y sin signos de deterioro. Posteriormente fueron trasladadas a las instalaciones de los Laboratorios de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de El Salvador, para su proceso.

Universo: sistemas de liberación retardada.

Muestra: matrices con diferentes concentraciones de Starch 1500, pectina (extraída en el laboratorio y comercial) y manteniendo las mismas concentraciones de polivinilpirrolidona y Riboflavina (20 mg), haciendo un total de 4 matrices de las cuales 3 contendrán pectina extraída en el laboratorio (1 A, 2 A y 3 A) y 1 de pectina comercial (2 B).

4.4 Parte experimental

Ver preparación de reactivos en anexo N°4.

Ver equipos y materiales en anexo N°5.

Se llevó a cabo en las instalaciones de los Laboratorios de Investigación en Productos Naturales y Control de Calidad de productos farmacéuticos de la

Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, de septiembre de 2019 a febrero de 2020, el desarrollo experimental se detalla a continuación:

4.4.1 Procedimiento general para extracción de pectina

Ver procedimiento general para la extracción de pectina en anexo N°6.

Recepción de Materia Prima para extracción de pectina.

Se colectaron aproximadamente 50 "Naranjas" de la clase de *Citrus aurantium*, de la Finca la Ilusión ubicada en El cantón Santa Rita Almendro, en el Municipio de Santiago Nonualco, departamento de La Paz. Las frutas a coleccionar deben tener las siguientes características: buen grado de maduración, recién cortadas, textura firme, color uniforme y sin signos de deterioro. Una vez recolectada la muestra de acuerdo a los criterios establecidos, se llevó en un recipiente adecuado el cual permitió el traslado a las instalaciones de los Laboratorios de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de El Salvador, para su tratamiento.

Una vez las muestras se llevaron al laboratorio se realizó el siguiente tratamiento que consiste en:

Tratamiento previo ⁽¹³⁾⁽²⁹⁾

1. **Limpieza del fruto:** Lavar las naranjas con suficiente agua y jabón.
2. **Pelado:** Pelar las naranjas procurando solamente remover el flavedo, intentando mantener intacto mesocarpo.
3. **Extracción del jugo:** Exprimir las naranjas con cuidado para extraer la mayor cantidad de jugo posible
4. **Molienda:** Cortar en trozos pequeños el mesocarpo y proceder a la molienda.

Extracción de la pectina (Ver anexo N° 7)

Hidrólisis:

- Pesar 25 g de material vegetal
- Añadir un litro de agua y agregar de 6 a 8 mL de ácido clorhídrico al 37%
- Determinar el pH con ayuda de un pHmetro hasta obtener un valor igual a pH1.5
- Calentar esta solución a 60°C durante 60 minutos con agitación constante y mantener el pH y la temperatura constantes durante todo el proceso.
- Luego de transcurrido los 60 minutos de la hidrólisis colocar inmediatamente el recipiente con la solución en un ultrasonido y ultrasonificar por 30 minutos.

Centrifugación:

Transferir la solución resultante de la hidrólisis a tubos falcon para centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos.

Separación del líquido sobrenadante:

Decantar el líquido sobrenadante y colocar en un vaso de precipitado de 1000 mL y enfriar a temperatura de 15°C.

Precipitación:

- A la solución péctica agregar etanol al 95% para precipitar la pectina (usar un volumen del 60% de etanol con respecto a la solución obtenida en el proceso de hidrólisis).
- Dejar en reposo por una hora.

Centrifugación:

Transferir la solución precipitada a tubos falcon y centrifugar a 1000 rpm durante 10 min.

Filtrado:

- Filtrar el líquido sobrenadante contenido en los tubos falcon con ayuda de un colador cubierto con gazas.
- Lavar el precipitado de pectina con 15 mL de etanol 95% previamente enfriado a 15°C.

Secado y trituración:

- Secar la pectina húmeda en horno a 40 °C, durante 24 horas.

-La masa sólida obtenida se tritura mediante un mortero hasta un tamaño aproximado de 3 mm.

El rendimiento teórico varía entre 24.37% y 26.67%.⁽¹³⁾

4.4.2 Determinación de la calidad fisicoquímica: de la pectina extraída del mesocarpo de la “naranja” *Citrus aurantium* y a la pectina comercial.

Se caracterizó la pectina obtenida de la extracción y a la vez pectina comercial para determinar su calidad de acuerdo a lo que establece la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP37 / NF32.⁽⁷⁾

Determinaciones que se realizaron a la pectina (extraída y comercial):

a. Identificación

b. Ensayo de grupo metoxilo

c. Ensayo para ácido galacturónico.

d. Pérdida por secado

a. Identificación. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

1. Calentar 1 gramo de muestra con 9 mL de agua en un baño de vapor, reponiendo el agua pérdida en la evaporación, hasta que se forme una solución: se forma un gel firme al enfriarse.
2. A la solución anterior se le adiciona 10 mL de alcohol hasta que se forma un precipitado gelatinoso traslúcido.
3. A 5 mL de una solución de pectina, se le agrega 1 mL de Hidróxido de Sodio 2 N y dejar reposar por 15 minutos, se forma un gel.
4. Al gel obtenido en el literal 3, acidificar con ácido clorhídrico 3 N y mezclar, se formará un precipitado gelatinoso voluminoso e incoloro, que por ebullición se torna blanco y floculento, indicando presencia de ácido péctico. (Ver Anexo N° 8)

b. Valoración de grupos metoxilo. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

1. Colocar 5.0 g de pectina en un vaso de precipitado de 200 mL y agitar durante 10 minutos con una mezcla de 5 mL de ácido clorhídrico y 100 mL de alcohol al 60 % (v/v), filtrar.
2. Lavar con 6 porciones de 15 mL de una mezcla de ácido clorhídrico y alcohol al 60 % hasta que el gel filtrado esté libre de cloruros.
3. Lavar con 20 mL de alcohol y secar por una hora a 105 °C, enfriar y pesar.
4. Transferir exactamente una décima parte del peso neto de la muestra seca (que representa 500 miligramos de la muestra original sin lavar) a un erlenmeyer de 250 mL y humedecer con 2 mL de alcohol.
5. Agregar 100 mL de agua libre de bióxido de carbono, tapar y agitar hasta que la pectina esté completamente disuelta.
6. Agregar 5 gotas de fenolftaleína y titular con una solución de NaOH 0.1N VS, anotar el valor como valoración inicial.
7. Agregar exactamente 20 mL de NaOH 0.5 N VS. Tapar, agitar vigorosamente y dejar reposar por 15 minutos.
8. Agregar exactamente 20 mL de HCL 0.5 N VS y agitar hasta que desaparezca el color rosado.
9. Agregar 3 gotas de fenolftaleína TS y valorar con solución de NaOH 0.1N VS, hasta obtener una coloración rosada débil que persista después de agitar fuertemente la mezcla.
10. Anotar el dato obtenido como valor de saponificación. (Ver anexo N° 9)

Nota:

Cada mL de NaOH 0.1 N VS consumido, es equivalente a 3.10 miligramos de grupos metoxilos (-OCH₃), en muestra tomada.

c. Valoración de ácido galacturónico. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Cada mL de solución de NaOH 0.1 N VS consumido en la valoración total (valoración inicial + valoración de saponificación en los grupos metoxílicos) es equivalente 19.41 mg. de ácido galacturónico (C₆H₁₀O₇).

d. Pérdida por secado. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

1. Tarar una cápsula de porcelana a 105°C por 30 minutos en una estufa, dejar enfriar en un desecador por aproximadamente por 15 minutos.
2. Pesar la cápsula vacía, anotar su peso
3. Pesar de 1 a 2 gramos de muestra en la cápsula de porcelana.
4. Colocar inmediatamente la cápsula de nuevo en la estufa y secar la muestra a 105°C por 3 horas.
5. Transcurrido el tiempo de secado transferir la cápsula con la muestra a un desecador y pesar la cápsula con la muestra seca
6. Anotar el peso. (Ver anexo N° 10)

Nota: La muestra no debe perder más de 10% de su peso.

4.4.3 Formulación de las matrices

Consiste en la formulación cualitativa y cuantitativa de las matrices. A continuación, se presentan los excipientes y principio activo con su respectiva función.

Tabla N° 5. Funciones de los componentes de la matriz.

Componente	Función
Riboflavina	Principio activo
Polivinilpirrolidona (PVP K 30)	Aglutinante, cumple esta función al adicionarse a la mezcla de polvos seca y por adición de agua permite la aglutinación de la matriz.
Starch 1500	Desintegrante, diluyente y auxiliar de relleno
Pectina	Agente gelificante pH dependiente, forma hidrogeles que permita la liberación colónica del principio activo.

En la formulación se variaron las concentraciones de Starch 1500 de forma que sirva como auxiliar de relleno para compensar las diferentes variaciones en las concentraciones de pectina, de tal manera que todas las cápsulas posean el mismo peso (250 mg).

Diseño de las diferentes matrices para el estudio.

Se elaboraron 2 tipos de matrices con una concentración constante de polivinilpirrolidona y Riboflavina, pero con diferentes concentraciones de Starch 1500® y de pectina en cada matriz.

4.4.3.1 Diseño cualitativo de los componentes de las matrices.

Se realizaron 2 tipos de matrices: una conformada por pectina comercial la cual fue comprada a un proveedor y la otra fue extraída en el laboratorio a partir del mesocarpo de la “naranja”; las cuales se codifican como Matriz A y Matriz B:

MATRIZ A: Matriz elaborada con pectina extraída del mesocarpo de la “naranja”.

MATRIZ B: Matriz elaborada con pectina comercial.

La evaluación de las matrices se llevó a cabo en dos experimentos los cuales se desarrollaron de la siguiente forma:

Experimento Inicial:

En este ensayo se elaboró la matriz A, conteniendo la pectina en 3 concentraciones diferentes (1A= 60%,2A=41% y 3A=22% de pectina extraída), estas matrices se evaluaron por el método de disolución y mediante el análisis de varianza ANOVA para determinar cuál de ellas presentaba las mejores características para ser utilizada como posible excipiente en la liberación retardada de fármacos, la matriz que resultara mejor evaluada en las pruebas de disolución fue utilizada en la comparación del experimento final.

Experimento Final:

Este ensayo permitió comparar el desempeño de la matriz que presentó mejores características en el experimento inicial contra una matriz elaborada con las mismas concentraciones en sus componentes pero sustituyendo únicamente el tipo de pectina ya que esta será de origen comercial.

En la formulación de las matrices se tomaron en cuenta las siguientes materias primas variando los porcentajes dentro de la formulación.

Tabla N° 6. Componentes de las matrices (cualitativamente)

Componentes	
Matriz A	Matriz B
Starch 1500®	Starch 1500®
Polivinilpirrolidona	Polivinilpirrolidona
Pectina cítrica del <i>Citrus aurantium</i>	Pectina comercial
Riboflavina	Riboflavina

4.4.3.2 Diseño cuantitativo de los componentes de las matrices.

Cuantitativamente las matrices se elaboraron con 3 concentraciones diferentes (1A= 60%,2A=41% y 3A=22% de pectina) y Starch 1500®, las cuales fueron codificadas de la siguiente manera 1A, 2A y 3A, para evaluar qué proporción presentaba las mejores características en la liberación del fármaco y poder compararla con una matriz elaborada de pectina comercial (Matriz B) en la misma proporción que la matriz A; a continuación se presenta la composición cuantitativa de las matrices A si se deseaba que cada matriz tuviera un peso total de 250.0 mg:

Matrices elaboradas para el experimento inicial:

Tabla N° 7. Composición de las matrices para el experimento inicial
(Cuantitativamente)

Componentes	Matriz 1 A		Matriz 2 A		Matriz 3 A	
	Cantidad de mg/cápsula	%	Cantidad de mg/cápsula	%	Cantidad de mg/cápsula	%
Riboflavina	20 mg	8	20 mg	8	20 mg	8
PVP	25 mg	10	25 mg	10	25 mg	10
Starch 1500®	55 mg	22	102.5 mg	41	150 mg	60
Pectina extraída	150 mg	60	102.5 mg	41	55 mg	22
Total	250 mg	100	250 mg	100	250 mg	100

Destacando:

Matriz 1 A: contiene 60% de pectina extraída.

Matriz 2 A: contiene 41% de pectina extraída.

Matriz 3 A: contiene 22% de pectina extraída.

Matrices elaboradas para el experimento final:

Para elaborar las matrices a evaluar en esta parte de la investigación, se partió de los resultados obtenidos en el experimento inicial, debido a que la matriz elaborada fue la matriz que presentó mejor desempeño luego de realizar el análisis estadístico del experimento inicial, obteniéndose que la matriz 2 A y 2 B serían las matrices a comparar las cuales presentan la siguiente composición:

Destacando:

Matriz 2 A: contiene 41% de pectina extraída.

Matriz 2 B: contiene 41% de pectina comercial.

Tabla N° 8. Composición de las matrices para el experimento final
(Cuantitativamente)

Componentes	Matriz 2 A		Matriz 2 B	
	Cantidad de mg/cápsula	%	Cantidad de mg/cápsula	%
Riboflavina	20	8	20	8

Tabla N° 8. Continuación.

PVP	25	10	25	10
Starch 1500®	102.5	41	102.5	41
Pectina extraída/ comercial	102.5	41	102.5	41

4.4.4 Elaboración de las matrices e incorporación del principio activo.

Se elaboraron 4 tipos de matrices de las cuales 3 fueron elaboradas con pectina extraída (Matriz 1A, 2A y 3A) y 1 matriz elaborada con pectina comercial (Matriz 2B).

Procedimiento para la elaboración de las matrices:

4.4.4.1 Elección de la forma farmacéutica para la realización de los ensayos de liberación ⁽¹⁾(6)

Se eligió la forma farmacéutica que se utilizó de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de las matrices a evaluar, las cuales pueden ser utilizarlas tanto en la elaboración de tabletas (comprimidos) o en cápsulas; para este estudio se utilizó la forma farmacéutica de una cápsula debido a que poseen una composición más sencilla y no es necesario la incorporación de más excipientes como lo es en los comprimidos, además se omite el proceso de compresión. Al encapsular las diferentes matrices fue posible evaluar la liberación de la Riboflavina (principio activo) utilizando el método de disolución con 3 diferentes medios.

4.4.4.2 Procedimiento para determinar el tamaño de cápsula a utilizar.

Para determinar el tamaño de cápsula que se utilizó en la investigación, se elaboraron 12 gramos de cada matriz por separado llevándose a cabo los siguientes pasos:

1. Pesar cada uno de los componentes por separado de las matrices teniendo en cuenta que se realiza un total de 12 gramos de cada matriz y elaborar las matrices.
2. Pesar 10 gramos de la matriz elaborada.
3. Utilizar una probeta de 25 mL y colocar en ella los 10 gramos de matriz pesada previamente.
4. Medir el volumen ocupado por la matriz y anotar el resultado obtenido.
5. Compactar el contenido de la probeta con leves golpes verticales sobre una superficie plana, realizar el movimiento durante 1 minuto teniendo los cuidados pertinentes.
6. Medir el volumen compactado que ocupa la matriz en la probeta y anotar el resultado obtenido.
7. Calcular la densidad aparente y compactada de cada una de las matrices utilizando la siguiente ecuación:
$$\text{densidad aparente} = \frac{\text{masa}}{\text{volumen aparente}}$$
8. Con la densidad aparente y compactada calcular el volumen aparente y compactado.
9. Calcular el número de cápsula a utilizar para la matriz (Ver anexo N° 11 y 12), si el peso deseado de cada una será de 250 mg (tener en cuenta la densidad aparente obtenida e identificar cada materia prima con su respectiva etiqueta ver anexo N°13).
10. Pesar la cápsula vacía y anotar el resultado.

4.4.4.3 Elaboración de las matrices e incorporación de la Riboflavina.

1. Pesar cada uno de los componentes de la matriz por separado en una balanza analítica e identificar cada materia prima con su respectiva etiqueta (ver anexo N°13).
2. Incorporar cada uno de los componentes de la matriz a un mezclador de polvos adicionando los componentes del menor al de mayor porcentaje en la formulación.

3. Incorporar la mezcla de polvos con movimientos rotatorios durante 5 minutos o hasta que se encuentre homogénea.
4. Transferir la mezcla de polvos a un beaker de 250 mL y seguidamente adicionar 5 mL de agua desmineralizada mezclando con agitación mecánica con la ayuda de un agitador de vidrio hasta que la mezcla sea homogénea.

Note: se adiciona agua para favorecer la acción aglutinante del PVP de manera que al agregarse permita la aglutinación de la matriz.

5. Transferir la mezcla a un vidrio reloj previamente pesado esparciendo uniformemente en la superficie.
6. Trasladar el vidrio reloj con la matriz a una estufa y secar por 24 horas a 50°C.
7. Fraccionar la matriz seca con ayuda de mortero y pistilo y transferir a un beaker de 50 mL.
8. Colocar la matriz seca en un desecador y pesar hasta obtener un peso constante.
9. Tamizar la matriz seca en un tamiz número de Mesh # 50 y recibir en un vidrio reloj de tamaño adecuado.
10. Seleccionar el número de cápsula a utilizar (ver: Procedimiento para la elección del tamaño de cápsula)
11. Rellenar las cápsulas con 250 mg del polvo de la matriz.
12. Pesar cada cápsula por separado verificando que el peso sea el adecuado. (Ver procedimiento general para la elaboración de las matrices en anexo N°14)

Nota: Repetir el procedimiento para las diferentes matrices a elaborar, tomando en cuenta las variaciones en los porcentajes de los componentes de cada matriz.

4.4.5 Estudio *in vitro* de la liberación de la Riboflavina

Para determinar la cantidad de Riboflavina que se liberó a partir de las matrices se realizó una curva de calibración con un estándar de trabajo de Riboflavina cuya pureza rotulaba de 91.64%.

Compensación del estándar de trabajo:

Datos:

Cantidad empleada: 10.0 mg

Pureza del estándar de trabajo: 91.64%

10.0 mg.....91.64%

X100.0%

X=10.91 mg

4.4.5.1 Preparación de la curva de calibración del estándar de Riboflavina.

La curva de calibración del estándar de referencia estará formada por las siguientes concentraciones (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0) $\mu\text{g/mL}$, para las cuales se partirá de una solución patrón de concentración conocida (100 $\mu\text{g/mL}$) (Ver Anexo N° 15)

1. Pesar con exactitud 10.00 mg de Estándar de Referencia de Riboflavina (tomando en cuenta la pureza).
2. Transferir a un balón volumétrico de 100.00 mL.
3. Adicionar 50 mL del medio de disolución, agitar hasta disolver el Estándar de Riboflavina (de ser necesario colocar en un ultrasonido por 5 minutos).
4. Llevar a aforo con el medio de disolución.
5. A partir de la solución patrón se tomarán alícuotas de 5, 1, 2 y 2.5 mL para obtener las concentraciones mencionadas anteriormente.

4.4.5.2 Preparación de las muestras

1. Colocar cada matriz (cápsula) en el equipo disolutor con 900 mL del medio de disolución.
2. Programar el Aparato Disolutor de la siguiente manera: aparato 2, 50 rpm, por 45 min.
3. Extraer 10 mL la muestra de cada uno de los vasos del Disolutor luego de concluido el tiempo.
4. Filtrar cada una de ellas y tapar con papel aluminio cada muestra. (Ver Anexo N°16)

Nota: Repetir este procedimiento para cada una de las soluciones filtradas anteriormente, la concentración a obtener será 22.22 µg/mL

4.4.5.3 Procedimiento para realizar las disoluciones

Para determinar la cantidad de Riboflavina que se libera de cada matriz se utilizará el método de disolución descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos.

Se tomó en cuenta los valores de pH que describe la literatura la cual indica que para evaluar las formas farmacéuticas de liberación modificada los pH de los medios de disolución deben oscilar entre valores de 1.2 a 7.5. ⁽²⁶⁾⁽²⁸⁾

A partir de esto las disoluciones se llevaron a cabo en 3 medios, los cuales permitieron evaluar el comportamiento de las matrices en diferentes condiciones de pH, lo medios utilizados fueron:

- Solución de ácido clorhídrico pH 1.2
- Agua destilada pH 6.2
- Buffer fosfato pH 7.6

4.4.5.4 Disoluciones realizadas en el Experimento Inicial

Se preparó cada medio por separado, realizándose dos disoluciones con cada medio obteniéndose 6 disoluciones en total de las cuales se obtuvieron 3 datos de cada matriz en cada medio, este ensayo se realizó con el objetivo de obtener resultados que al someterse al análisis estadístico de ANOVA, Test de Tukey y Diagrama de cajas se determinó cuál de las 3 matrices (1A, 2A y 3A) cumplía con las características similares a un sistema de liberación retardada y que posteriormente fue comparada con una matriz elaborada con pectina comercial bajo las mismas concentraciones que las elegida en este experimento. Las matrices fueron distribuidas de la siguiente forma:

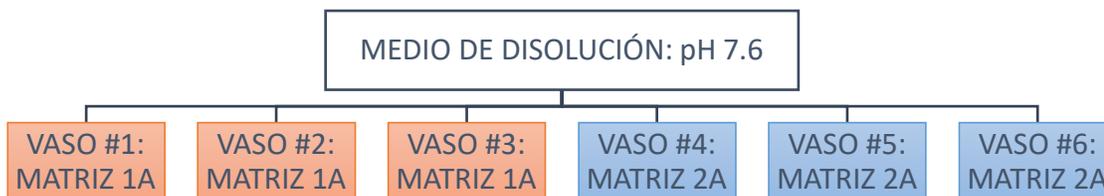


Figura N° 11. Distribución de matrices a pH 7.6.

Nota: para las matrices 3A y las disoluciones cuyos medios son pH 6.2 y pH 1.2 se siguió la misma distribución.

4.4.5.5 Diluciones realizadas en el Experimento Final:

En este experimento se evaluaron las matrices 2A y 2B. Se preparó cada medio por separado, realizándose una disolución con cada medio obteniéndose 3 disoluciones en total, de las cuales se obtuvieron 3 datos de cada matriz en cada medio, este experimento se realizó con el fin de determinar cuál de las matrices poseía las mejores características para ser utilizada como posible sistema de liberación retardada.

Las matrices fueron distribuidas de la siguiente forma:

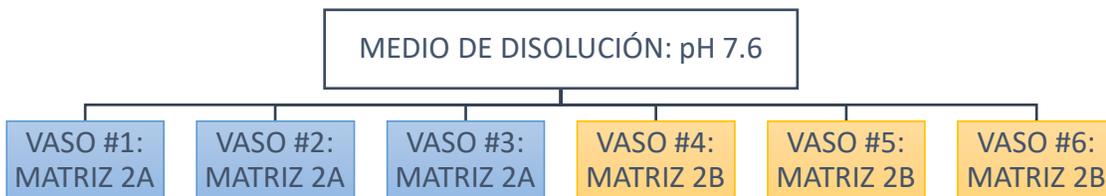


Figura N° 12. Distribución de las matrices en la disolución de pH 7.6.

Nota: para las disoluciones de los medios de pH 6.2 y pH 1.2 se siguió la misma distribución.

4.4.5.6 Procedimiento para la medición de las absorbancias en el espectrofotómetro UV-vis.

1. Encender y programar el espectrofotómetro UV-Vis a 444 nm.
2. Colocar las soluciones de la curva patrón en cada una de las celdas del equipo.
3. Medir patrones de la curva del estándar (Verificando que el coeficiente de correlación sea cercano a 1)
4. Ir a cuantificación en el equipo y colocarlas soluciones de las muestras en las celdas.
5. Seleccionar medir muestra.
6. Anotar las absorbancias.

4.4.6 Determinación de la cinética de liberación de la Riboflavina.

Para determinar la cinética que explica mejor la disolución de la matriz que contiene la Riboflavina, los parámetros utilizados con mayor frecuencia se pueden clasificar en:

- a) Parámetros puntuales empíricos.
- b) Parámetros funcionales.
- c) Parámetros no funcionales: modelo independiente de la cinética del proceso.

Se utilizó los parámetros funcionales que posibilitan una descripción más exacta y completa del curso evolutivo de un proceso de disolución: lo que se traduce a que los datos experimentales se ajustan a modelos matemáticos. Por lo que la estimación de estos parámetros requiere disponer de una función que describa con suficiente fiabilidad la cantidad de fármaco disuelto en cualquier momento (tiempo) de la experiencia. En este experimento se desarrollaron los modelos con base fisicoquímica: modelos de orden cero, orden uno y dos.

En los estudios de la velocidad de disolución el tratamiento de los datos experimentales se realizaron a partir de una tabla experimental de cantidad de activo disuelta acumulada en función del tiempo.

Con base a lo anterior se determinó la cinética de liberación de la Riboflavina a partir de las concentraciones obtenidas en muestras de las matrices (2A y 2B) tomadas en diferentes intervalos de tiempo y leídas en un espectrofotómetro para la obtención de las absorbancias, las muestras fueron tomadas de la prueba de disolución de la cual el medio que se utilizó fue Buffer fosfato pH 7.6, ya que el pH gastrointestinal tiende a ser básico y es aquí donde se deseaba se liberará el principio activo. (Ver Anexo N°17)

Se demuestra que la cinética de liberación a partir de los modelos propuestos para explicar el proceso de liberación de la Riboflavina en diversas matrices.

Para determinar la cinética de liberación se graficó lo siguiente:

Tabla N° 9. Modelos para cinética de orden de reacción.

Orden de reacción	Orden 0	Orden 1	Orden 2
Gráfico	[] vs t	ln [] vs t	1/ln [] vs t

Donde:

[]= Concentración en mg/ mL de riboflavina de la muestra

ln = Logaritmo natural

t = tiempo en minutos

Únicamente se medirán las absorbancias a los 5, 15, 25, 35 y 45 minutos para de las matrices 2A y 2B para determinar la cinética de liberación de la Riboflavina. Para las demás disoluciones las lecturas de las absorbancias serán únicamente a los 45 minutos. Esta prueba se realizará por triplicado.

Luego de graficar los resultados se determinará el orden de reacción con base a la linealidad que presente la relación entre la concentración de Riboflavina liberada con respecto del tiempo representado el coeficiente de correlación (R^2) cercano a uno.

4.5 Método estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó a través de un Diseño de experimentos Multifactorial (ANOVA) por medio, software estadístico R (Dark and Stormy night) versión 3.6 con el fin de determinar si los diferentes factores evaluados tienen significancia sobre la cantidad de Riboflavina liberada por las matrices. Debido a que eran muchas variables en estudio se evaluó la liberación del principio activo en dos partes realizándose para ello un experimento inicial con 2 factores en análisis y un experimento denominado como final que también presentaba dos factores diferentes.

Para realizar los análisis se tomaron como factores los siguientes parámetros:

Experimento Inicial:

FACTOR 1: Los 3 diferentes pH de los medios en los que se evalúan las diferentes matrices.

FACTOR 2: Concentración de Starch 1500® y Pectina que tendrá 3 niveles que corresponden a las diferentes concentraciones.

Tabla N° 10. Factores a evaluar en el estudio de Liberación de Riboflavina (Experimento inicial).

FACTORES	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Factor 1: pH	Solución de ácido clorhídrico pH 1.2	Agua destilada pH 6.2	Buffer fosfato pH 7.6
Factor 2: Pectina extraída y Starch 1500	Matriz 1 A Contiene 60% de pectina extraída.	Matriz 2 A Contiene 41% de pectina extraída.	Matriz 3 A Contiene 22% de pectina extraída.

Experimento Final:

FACTOR 1: Los diferentes pH de los medios en los que se evalúan las diferentes matrices el cual se divide en 3 niveles.

FACTOR 2: Tipo de Pectina que tendrá 2 niveles que corresponden a la pectina comercial y pectina extraída.

Tabla N° 11. Factores a evaluar en el estudio de Liberación de Riboflavina (Experimento final).

Factores	Niveles
Factor 1: pH	1° pH: solución de ácido clorhídrico pH 1.2
	2° pH: agua destilada pH 6.2
	3° pH: buffer fosfato pH 7.6
Factor 2: Tipo de pectina	Extraída
	Comercial

Estos 2 factores se tomaron como variables independientes, siendo la variable dependiente las cantidades de principio activo liberadas, puesto que la cantidad de activo liberada depende de las condiciones de los factores antes mencionados.

Posterior a la toma de muestra y recolección de resultados se utilizará el programa Excel para la digitación y codificación de los datos en columnas con esto se realizará el análisis en el software estadístico R (Dark and Stormy night)

versión 3, con el fin de obtener los valores de F crítico y el P valor con estos se podrán evaluar los resultados obtenidos para emitir las conclusiones.

Planteamiento de las hipótesis a comprobar:

1. H₀:

El tipo de pectina y la concentración de Starch 1500 no influyen significativamente en la liberación de la Riboflavina.

H₁:

El tipo de pectina y la concentración de Starch 1500 si influyen significativamente en la liberación de la Riboflavina.

2. H₀:

El pH no influye significativamente en la liberación de la Riboflavina.

H₁:

El pH si influyen significativamente en la liberación de la Riboflavina.

3. H₀:

El tipo de pectina, la concentración de Starch 1500 y el pH no influyen significativamente en la liberación de la Riboflavina.

H₁:

El tipo de pectina, la concentración de Starch 1500 y el pH si influyen significativamente en la liberación de la Riboflavina.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizaron dos viajes de campo hacia la Finca la Ilusión ubicada en El cantón Santa Rita Almendro, en el Municipio de Santiago Nonualco, departamento de la Paz.

Identificación botánica:

Durante el primer viaje se observó el hábitat del árbol *Citrus aurantium* y se recolectó una muestra completa, la que fue llevada a Licenciada Jenny Menjívar curadora del Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) para su respectiva identificación botánica y asignación de un número de Voucher (Ver anexo N° 3).

Recolección de muestra:

Con la muestra ya identificada, se realizó el segundo viaje para recolectar 50 “Naranjas” de la variedad *Citrus aurantium*. Se seleccionaron aleatoriamente las muestras, con ayuda de un recolector (persona reconocida en la zona por desempeñar esa labor). Se recolectaron las muestras tomando en cuenta las siguientes características: frutas, con buen grado de maduración, recién cortadas, textura firme, color uniforme y sin signos de deterioro. Posteriormente fueron llevadas a las instalaciones de los Laboratorios de Investigación en Productos naturales de la universidad de El Salvador, para su proceso.

5.1 Extracción de pectina del mesocarpo de “*Citrus aurantium*”

Obtención de pectina y cálculo del rendimiento:

Para cada extracción se utilizaron 25 g de material vegetal seco el proceso de la extracción de la pectina cítrica se llevó a cabo por el método de hidrólisis ácida utilizando ácido clorhídrico hasta un pH de 1.5, controlando la temperatura a 60°C y el tiempo 60 min; el procedimiento que se siguió fue el descrito en el marco metodológico.

Cálculo de rendimiento:⁽²⁵⁾⁽⁵⁾

% de rendimiento = $\text{Peso de pectina extraída} / \text{Peso pectina comercial} \times 100\%$

Sustituyendo datos:

% de rendimiento: $(3.0058\text{g} / 25.00\text{g}) \times 100\% = 12.0232\%$

Los valores de rendimiento de 6 extracciones realizadas utilizando 25.00 g de material vegetal para cada una se exponen en la Tabla N°12.

Tabla N° 12. Rendimientos obtenidos y condiciones de extracción de pectina a partir del mesocarpo de *Citrus aurantium*.

Parámetros (T, pH y t)	Extracciones	Material vegetal seco (g)	Pectina extraída (g)	Rendimiento (% p/p)
T= 60 °C pH= 1.5 t = 60 min	1	25.0	3.0058	12.0232
	2	25.0	3.8012	15.2048
	3	25.0	3.2864	13.1456
	4	25.0	3.0547	12.2188
	5	25.0	3.0117	12.0468
	6	25.0	3.8544	15.4176
	Total	150.0	20.0142	80.0568
Promedio			3.3357	13.3428

La tabla N°12 muestra los resultados experimentales del rendimiento de pectina, en cada extracción se utilizó 25.0 g de material vegetal seco obteniéndose en la primera muestra 3.0058 g de pectina, por lo que la sumatoria del total de material vegetal seco en las 6 extracciones utilizado fue de 150.0 g, obteniendo un resultado de 20.0142 g de pectina. Al comparar los datos teóricos (24.37 % y 26.67 %)⁽¹³⁾ respecto a los obtenidos experimentalmente el rendimiento es de 13.3428 % que resulta ser menor a lo esperado, por lo que se realizaron varias extracciones para obtener la cantidad necesaria. El bajo rendimiento puede estar condicionado por diversos factores que influyen en la cantidad de pectina

obtenida tales: como la variedad del fruto, temperatura y pH bajo utilizadas durante el proceso de hidrólisis.

5.2 Determinación de la calidad fisicoquímica de la pectina extraída del mesocarpo de las “naranjas” *Citrus aurantium*:

Las pruebas de determinación de la calidad de la pectina extraída y a la pectina comercial siguiendo la metodología planteada en la Farmacopea de los Estados Unidos USP 37 / NF 32 de la cual se seleccionaron 4 pruebas para evaluar la calidad de la misma.

a. Identificación. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Luego de llevar a cabo el procedimiento descrito en el marco metodológico tanto para la pectina extraída como la pectina comercial se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla N° 13. Resumen de los resultados obtenidos de diferentes pruebas de identificación.

Pruebas de identificación	Resultado	
	Pectina extraída	Pectina comercial
Pectina+ Agua (en baño de vapor)	Gel firme	Gel firme
Solución de pectina + alcohol	Precipitado traslúcido-gelatinoso	Precipitado traslúcido-gelatinoso
Solución de pectina + NaOH 2N	Formación de gel	Formación de gel
Solución de pectina + HCL 3N (calentando)	Precipitado floculento color blanquecino	Precipitado floculento color blanquecino

La Tabla N°13 presenta los resultados de las pruebas de identidad para pectina extraída y comercial. Con base a los resultados antes expuestos se confirma que los polvos amarillentos con olor característico, obtenido por el método de hidrólisis ácida corresponden a la pectina extraída. La misma prueba de identificación se realizó a la pectina comercial comprobando su identidad. Dicha información permitió la pauta para continuar la investigación.

b. Valoración de grupos metoxilo ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Se detallado la valoración realizando 6 titulaciones, 3 titulaciones con cada tipo de pectina, se tabularon los datos y se realizaron los cálculos necesarios aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Grupos metoxilos} = 3.10 \times (V_s/W) \times 100$$

En donde:

3.10 = Valor constante (equivalente a mg de -OCH₃)

V_s = título de saponificación (mL)

W = peso de la pectina original, calculado respecto a la sustancia seca, tomado para preparar la solución para la valoración (mg).

Ejemplo del cálculo para la determinación del porcentaje de grupos metoxilo:

$$\text{Grupos metoxilos} = 3.10 \times (12 \text{ mL} / 500 \text{ g}) \times 100 = 7.44$$

Tabla N° 14. Resultados obtenidos de la valoración de la prueba de grupos metoxilo.

Pectina	Peso de muestra (mg)	Título de saponificación (mL)	% Metoxilo obtenido	Promedio
Pectina extraída	500.00	12.00	7.44	7.39
		12.00	7.44	
		11.80	7.31	
Pectina comercial	500.00	11.20	6.94	7.02
		11.40	7.06	
		11.40	7.06	

Especificación para determinación del porcentaje de grupos metoxilos (-OCH₃) según USP 37 / NF 32: para esta prueba la pectina debe tener no menos de 6.7% de grupos metoxilo (-OCH₃). En ambos casos el valor obtenido experimentalmente fue mayor a lo establecido, obteniéndose para la pectina

extraída en el laboratorio un valor de 7.39% y en la pectina comercial 7.02%. Por lo que ambos tipos de pectina cumplen con la especificación siendo de alto metoxilo.

c. Valoración de ácido galacturónico⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Para la obtención de los resultados del porcentaje de ácido galacturónico en las muestras se desarrolló el procedimiento experimental descrito en la valoración de grupos metoxilo, utilizando para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\% = 19.41 \times [(V_I + V_S) / W] \times 100$$

En donde:

V_I = Volumen inicial gastado en la titulación (título inicial)

V_s = Volumen de saponificación gastado en la titulación (título de saponificación)

W = peso de pectina tomado para preparar la solución para la valoración en miligramos.

Nota: Cada mL de NaOH 0.1 N usado en la valoración es equivale a 19.41 mg de ácido galacturónico en la porción de pectina tomada.

Sustituyendo: $\% = 19.41 \times ((7.6+12) / 500) \times 100 = 76.08\%$

Tabla N° 15. Resultados obtenidos en la determinación de porcentaje de ácido galacturónico.

N° de muestra	Tipo de pectina	Volumen inicial (mL)	Volumen de saponificación (mL)	Porcentaje (%)	Promedio
1	Pectina extraída	7.60	12.00	76.08	75.82
2		7.70	12.00	76.47	
3		7.50	11.8	74.92	
1	Pectina comercial	7.00	11.20	70.65	72.20
2		7.40	11.40	72.98	
3		7.40	11.40	72.98	

Especificación para determinación del porcentaje de ácido galacturónico según USP 37 / NF 32: no menos de 74,0 por ciento de ácido galacturónico ($C_6H_{10}O_7$).

La tabla N°15 describe los resultados obtenidos para la determinación de ácido galacturónico. Luego de realizar el procedimiento experimental se determinó que la pectina extraída en el laboratorio contenía 75.82% de ácido galacturónico por lo que cumple con la especificación de la monografía; por otro lado, en la pectina comercial se obtuvo un 72.20% de ácido galacturónico encontrándose que no cumple con la especificación.

El porcentaje de ácido galacturónico es importante ya que de este depende el poder de gelificación y la viscosidad, debido a que el ácido proporciona iones hidrogeno que neutralizan las cargas lo suficiente para que las moléculas de pectina dispersas no se repelan una con la otra, permitiendo el arreglo estético de las moléculas dando lugar a una red tridimensional (gel).

Las pectinas de bajo grado de esterificación son las que tienen menos del 50% de unidades esterificadas del ácido galacturónico y están en el rango de 3 a 6.5% de metoxilos. Pueden formar geles estables con poca o ninguna cantidad de azúcar, pero requieren de la presencia de cationes divalentes como el calcio para formar entrecruzamientos moleculares. Debido a que la pectina obtenida en el laboratorio y la pectina comercial poseen buen grado de metoxilación y porcentaje de ácido galacturónico no necesitan la presencia de cationes divalentes para que se dé el entrecruzamiento molecular y la formación del gel.

d. Pérdida por secado⁽⁷⁾⁽⁸⁾

En total se realizaron 6 pérdidas llevándose a cabo 3 repeticiones por cada muestra de pectina (extraída y comercial) para luego obtener un promedio de cada una.

Luego de realizar la parte experimental se obtuvieron los siguientes resultados:

Ejemplo del cálculo para la prueba de pérdida por secado (Cálculo en muestra de pectina comercial)

Datos:

Peso de cápsula vacía: 26.2289g

Peso de cápsula + muestra: 27.2297g

Peso de la muestra:

P (peso de cápsula + muestra) - P (peso de cápsula vacía) =

27.2297g - 26.2289g=1.0008g (Pi)

P (peso de cápsula + muestra seca) - P (peso de cápsula vacía) =

27.1659g - 26.2289g= 0.9370g (Pf)

% Humedad = ((Pi -Pf) / Pi) X 100

En donde:

Pi= Peso inicial de la muestra en g

Pf= Peso final de la muestra en g

100= constante

Sustituyendo:

%Humedad = (1.0008 g -0.9370 g/1.0008 g) x 100

% Humedad = 6.3749%

Tabla N° 16. Resultados obtenidos en la prueba de pérdida por secado.

Pesos	Peso inicial (g)	Peso final(g)	Pérdida por secado (%)	Promedio
Pectina				
Pectina extraída	1.0005	0.9456	5.4872	5.3604
	1.0006	0.9501	5.0469	
	1.0005	0.9450	5.5472	

Tabla N°16. Continuación

Pectina comercial	1.0008	0.9370	6.3749	6.3872
	1.0002	0.9361	6.4087	
	1.0003	0.9365	6.3780	

Especificación: No pierde más del 10% de su peso luego de secar por 3 horas a 105°C.

En la tabla N°16 se describen los datos obtenidos de la prueba de pérdida por secado, en dicha tabla se observa que la pectina comercial en el proceso de secado perdió 6.3872% de agua cuyo porcentaje de pérdida es mayor que el de la pectina extraída la cual perdió 5.3604%, ambas pruebas cumplen con la especificación de la farmacopea; esta prueba permite dar a conocer el contenido de humedad en las muestras, el cual es importante debido a que sí existe mucha humedad en la pectina se podría generar el crecimiento de microorganismos no deseados y que a su vez podrían deteriorar la pectina. Además, un gran contenido de humedad genera error en el momento del pesado de la materia prima debido a que la molécula almacena mucha agua en su interior.

5.3 Formulación de matrices y elección de la forma farmacéutica

Para determinar el tamaño de cápsula se elaboraron 12 g de cada matriz 2B con el objetivo de poder calcular el volumen aparente y compactado utilizado para definir el número de cápsula a utilizar. Por lo que se pesaron cada uno de los componentes de las matrices por separado obteniéndose los siguientes resultados:

Nota:

Los 12 g de cada matriz (1B, 2B, 3B) fueron elaboradas con dos objetivos:

1. Determinar las densidades aparentes y compactadas para la elección del tamaño de cápsula. (Esta determinación no se realizó con pectina extraída debido a la gran cantidad requerida para determinar el tamaño de la cápsula, de modo que este paso solo se llevó a cabo con matrices elaboradas con pectina comercial).

2. La matriz 2B elaborada en este paso se encapsulo y se utilizó en el experimento final para ser comparada con la matriz 2 A.

Tabla N° 17. Resultados obtenidos para formulación de matrices (1B, 2B, 3B).

Código de matriz	Materia prima	Peso teórico (g)	Peso Real (g)
1B	Riboflavina	0.9600	0.9602
	PVP	1.2000	1.2004
	Pectina	7.2000	7.2001
	Starch 1500	2.6400	2.6399
	Total	12.000	12.0042
2B	Riboflavina	0.9600	0.9602
	PVP	1.2000	1.2007
	Pectina	4.9200	4.9202
	Starch 1500	4.9200	4.9201
	Total	12.000	12.0012
3B	Riboflavina	0.9600	0.9603
	PVP	1.2000	1.2003
	Pectina	2.6400	2.6402
	Starch 1500	7.2000	7.2004
	Total	12.000	12.0012

En la Tabla N°17 se presentan los datos de las materias primas utilizadas en la preparación de las matrices con su respectivo código, además la cantidad a pesar para cada componente adicionado (peso teórico) y el peso real obtenido.

Luego de elaborar las matrices se procedió a realizar los cálculos necesarios para determinar el número de cápsula.

-Determinación del tamaño de cápsula.

Se calculó la densidad aparente y compactada de cada una de las matrices utilizando la siguiente ecuación:

Densidad aparente= masa/volumen aparente

Al tener los resultados de la densidad aparente y compactada se calculó el volumen aparente y compactado que sirve para determinar el número de cápsula a utilizar, (teniendo en cuenta que el peso que se desea encapsular era 250 mg). Con base a lo anterior se buscó en tabla el número de cápsula más adecuado para encapsular las matrices.

Cálculos para seleccionar el número de cápsula:

Ejemplo: Matriz 1B

-Cálculo para la determinación de la densidad aparente y compactada a partir de los 10g de cada matriz pesada:

ρ (aparente)=Peso de la matriz /volumen aparente

$$\rho \text{ (aparente)}=10 \text{ g} / 14 \text{ mL} =0.71 \text{ g/mL}$$

ρ (compactada)=Peso de la matriz /volumen compactado

$$\rho \text{ (compactada)}= 10 \text{ g} / 12.5 \text{ mL}=0.80 \text{ g/mL}$$

-Cálculo para la determinación del volumen aparente y compactado (teniendo en cuenta que el peso que se quería encapsular era 250 mg):

V (aparente)= (peso de la matriz/unidad de dosis) /densidad aparente

$$V \text{ (aparente)}=0.25 \text{ g} / 0.71 \text{ g/mL}=0.3521 \text{ mL}$$

V (compactado)= (peso de la matriz/unidad de dosis) /densidad compactada

$$V \text{ (compactado)}=0.25 \text{ g} / 0.80 \text{ g/mL}=0.3125 \text{ mL}$$

Luego de realizar los cálculos para cada matriz se tabularon los datos obtenidos los cuales se presentan en la tabla N° 18:

Tabla N° 18. Resultados de volumen aparente y compactado.

Tipo de matriz	Densidad aparente (g/mL)	Densidad compactada (g/mL)	Volumen aparente (mL)	Volumen compactado (mL)
1B	0.71	0.80	0.3521	0.3125
2B	0.69	0.80	0.3623	0.3125
3B	0.69	0.80	0.3623	0.3125

Según los resultados obtenidos que se presentan en la tabla N° 18 los volúmenes se compararon con los tamaños de capsulas ver anexo N° 11 y 12, en donde la cápsula # 3 es la que mejor se aproxima al peso de 250 mg que se deseaba encapsular. Ya que para este número de cápsula el valor que se puede encapsular oscila entre 222 mg a 444 mg, si la mezcla posee un volumen aparente cercano a 0.37 mL.⁽³⁾⁽¹⁴⁾

-Formulación de matrices (Ver anexo N°14)

Tabla N° 19. Resultados en la elaboración de las matrices (1A, 2A y 3A).

Código de matriz	Materia prima	%	Peso teórico (g)	Peso real (g)
1 A	Riboflavina	8	0.3000	0.3002
	PVP	10	0.2400	0.2400
	Pectina	22	1.8000	1.8006
	Starch 1500	60	0.6600	0.6606
Total		100	3.000	3.0014
2 A	Riboflavina	8	0.3000	0.3003
	PVP	10	0.2400	0.2400
	Pectina	41	1.2300	1.2300
	Starch 1500	41	1.2300	1.2300
Total		100	3.0000	3.0003
3 A	Riboflavina	8	0.3000	0.3004
	PVP	10	0.2400	0.2401

Tabla N° 19. Continuación

	Pectina	60	0.6600	0.6602
	Starch 1500	22	1.8000	1.8004
Total		100	3.000	3.0011

En la Tabla N°19 se presentan los datos de las materias primas utilizadas en la preparación de las matrices con su respectivo código, además el porcentaje y la cantidad a pesar para cada componente adicionado (peso teórico), al final de cada cuadro se presenta el total de la matriz preparada.

Nota: Estas matrices (1A, 2A y 3A) fueron elaboradas para llevar a cabo el experimento inicial. Además, la matriz 2A elaborada en este paso se encapsuló y se utilizó en el experimento final para ser comparada con la matriz 2B.

5.4 Elaboración de las matrices e incorporación del principio activo.

Se elaboraron 4 tipos de matrices de las cuales 3 fueron elaboradas con pectina extraída (Matriz 1A, 2A y 3A) y 1 matriz elaborada con pectina comercial (Matriz 2B), la realización de estas matrices permitió la evaluación del comportamiento de los diferentes tipos de pectina en la forma farmacéutica en investigación.

5.5 Estudio *in vitro* de la liberación de la riboflavina.

Para la determinación de la liberación de Riboflavina de las matrices elaboradas se realizó una curva de calibración con el estándar de referencia, el cual se utilizó como base para determinar la cantidad de miligramos liberada de Riboflavina luego de transcurrido el tiempo de cada disolución, dicha curva de calibración se realizó por triplicado realizándose una curva de calibración por día de análisis, para luego obtener un resultado promedio y este ser comparado con los datos obtenidos de cada matriz en los diferentes medios de disolución, los resultados obtenidos de las curvas de calibración son las siguientes:

Tabla N° 20. Absorbancias obtenidas en las curvas de calibración del estándar.

N°	Concentración de estándares (µg/mL)	Absorbancias			
		Curva N°1	Curva N°2	Curva N°3	Promedios
1	2.5	0.050	0.062	0.063	0.058
2	5.0	0.108	0.121	0.125	0.118
3	10.0	0.222	0.239	0.260	0.240
4	20.0	0.454	0.474	0.502	0.476
5	25.0	0.568	0.591	0.638	0.599
	Coefficiente de correlación	0.9999	0.9998	0.9998	0.9999

Luego de la tabulación de las absorbancias obtenidas de las curvas de calibración se elaboró un gráfico de absorbancias promedios Vs concentraciones (µg/mL).

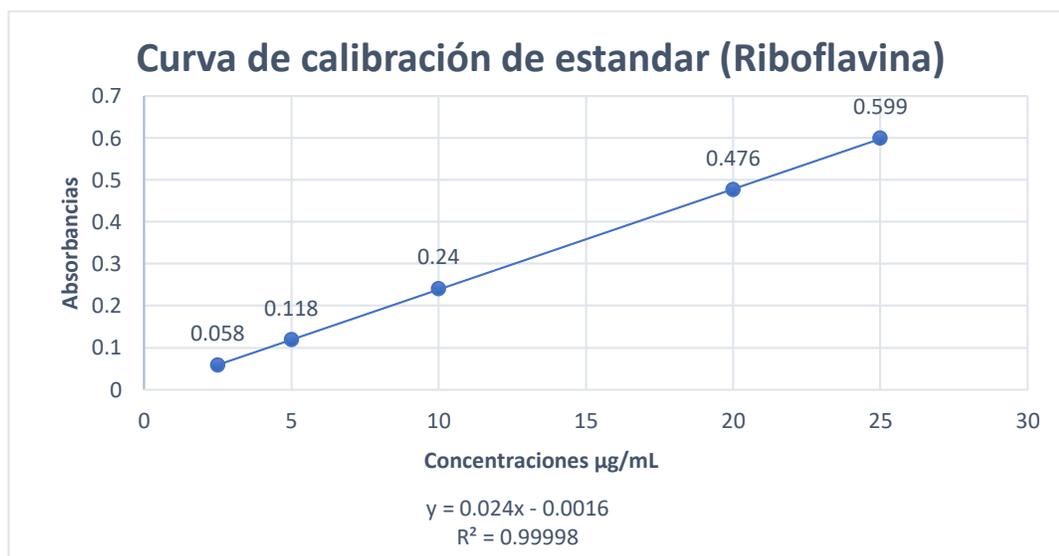


Figura N° 13. Curva de calibración promedio del estándar.

Como se explica en el diseño metodológico el desarrollo de la liberación se dividió en dos partes, la primera parte que comprende un experimento inicial que

es la selección de la matriz, en la cual se probó cual concentración de la matriz A y que medio de disolución presentaban las características idóneas para ser utilizada para la liberación retardada de fármacos y así luego poder compararla en un experimento final con la matriz B, dichos experimentos se llevaron a cabo con el fin de determinar qué matriz es la más indicada para el tipo de liberación en estudio.

EXPERIMENTO INICIAL: Selección de matriz.

Se preparó cada medio por separado, realizándose dos disoluciones con cada medio obteniéndose 6 disoluciones en total de las cuales se obtuvieron 3 datos de cada matriz en cada medio, este experimento se realizó con el fin de obtener resultados que al ser evaluados por medio del análisis estadístico de ANOVA, Test de Tukey y Diagrama de cajas se determinó cuál de las 3 matrices (1A, 2A y 3A) cumplía con las características similares a un sistema de liberación retardada. Posteriormente, fue comparada con una matriz elaborada con pectina comercial bajo las mismas concentraciones que las elegidas en este experimento.

Tabla N° 21. Parámetros para llevar a cabo cada disolución.

Parámetro	Valor
Abs. Mx:	0.3980
Abs. ST:	0.4760
Factor de Dilución:	900
Peso de la muestra:	250.0 mg
Peso del estándar:	20.0mg
[ST] en mg:	0.020 mg/mL
Rótula:	20mg
Dosis:	1 cápsula
PP3:	250.00mg

-Distribución de las matrices en cada disolución:



Figura N° 14. Distribución de matrices en disolución 1 y 2

Nota: para las matrices 3A y las disoluciones cuyos medios son pH 6.2 y pH 1.2 se siguió la misma distribución.

-Cálculo para la determinación del porcentaje de lo rotulado:

$$\% \frac{S}{R} = \frac{\text{Abs Mx} \times [\text{St}] \times \text{FD} \times \text{DOSIS} \times \text{PP3} \times 100\%}{\text{Abs St} \times \text{Pmx} \times \text{Rotula}}$$

Donde:

Abs Mx= Absorbancia de la muestra

[St]= Concentración del estándar de Riboflavina

FD= Factor de dilución de la muestra

Dosis= Dosis de Riboflavina

PP3= Peso promedio de 3 matrices

100%= constante

Abs St= Absorbancia del estándar

Pmx= Peso de la muestra

Rotula=mg de Riboflavina por matriz

Sustituyendo los valores se obtiene el siguiente ejemplo:

$$\% \frac{S}{R} = \frac{0.398 \times 0.020 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 900 \times 1 \times 250.0\text{mg} \times 100\%}{0.4760 \times 250.0\text{mg} \times 20.0\text{mg}} = 75.25 \%$$

Luego de determinar el porcentaje de lo rotulado para cada matriz (cápsula) se realiza una regla de tres para obtener la cantidad de mg de Riboflavina liberada en cada matriz teniendo en cuenta que cada matriz contenía 20.0 mg de principio activo:

20.0 mg.....100.0 %

X.....75.25 %

X=15.05 mg de Riboflavina liberada por matriz

Nota: para la realización de los cálculos de forma ordenada se utilizó una hoja de Excel ver anexo N° 18.

-Resultados para cada matriz en los diferentes medios se ilustran a continuación:

Tabla N° 22. Resultados obtenidos en Matriz 1 A, 2 A y 3 A a pH 1.2

Medio: Solución ácido clorhídrico pH 1.2						
Medio de disolución	Matriz 1 A		Matriz 2 A		Matriz 3 A	
	Abs	mg de PA liberado	Abs	mg de PA liberado	Abs	mg de PA liberado
Solución de ácido clorhídrico pH 1.2	0.272	10.29	0.233	8.81	0.315	11.91
	0.273	10.32	0.229	8.66	0.309	11.68
	0.273	10.32	0.225	8.51	0.312	11.80
Promedio	0.272	10.31	0.229	8.66	0.312	11.80

Tabla N° 23. Resultados obtenidos en Matriz 1 A, 2 A y 3 A a pH 6.2

Medio: Agua destilada pH 6.2						
Medio de disolución	Matriz 1 A		Matriz 2 A		Matriz 3 A	
	Abs	mg de PA liberado	Abs	mg de PA liberado	Abs	mg de PA liberado
Agua pH 6.2	0.398	15.05	0.329	12.44	0.419	15.85
	0.397	15.01	0.330	12.48	0.421	15.92

Tabla N° 23. Continuación

	0.395	14.94	0.326	12.33	0.421	15.92
Promedio	0.397	15.00	0.328	12.42	0.420	15.90

Tabla N° 24. Resultados obtenidos en Matriz 1 A, 2 A y 3 A a pH 7.6

Medio: Buffer fosfato pH 7.6						
Medio de disolución	Matriz 1 A		Matriz 2 A		Matriz 3 A	
	Abs	mg de PA liberado	Abs	mg de PA liberado	Abs	mg de PA liberado
Buffer fosfato pH 7.6	0.464	17.55	0.467	17.66	0.453	17.13
	0.464	17.55	0.461	17.43	0.452	17.09
	0.461	17.43	0.466	17.62	0.453	17.09
Promedio	0.463	17.51	0.461	17.57	0.452	17.11

Observando los resultados obtenidos en las tablas N°22, N°23 y N°24 de la liberación de riboflavina correspondientes a los diferentes pH (1.2, 6.2 y 7.6) se puede observar que:

La matriz que más Riboflavina libera en pH 1.2 es la matriz 3A (11.80 mg de PA), en pH 6.2 la matriz que más riboflavina liberó fue la matriz 3A (15.90 mg de PA) y en pH 7.6 fue la matriz 2A (17.57 mg). Se puede observar que la matriz que permite liberar más riboflavina es la 2A en el pH 7.6, sin embargo lo anterior debe confirmarse, de modo que pueda determinarse cuál de las matrices en estudio libera poca cantidad de principio activo en un medio ácido (similar al pH del estómago) y que además libere mayor cantidad de Riboflavina en un medio básico (similar al pH intestinal). Por ello los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico que permitió definir con exactitud cuál de las matrices en estudio presentó el comportamiento antes mencionado.

Para ejecutar el análisis de los resultados obtenidos de las disoluciones del Experimento inicial se utilizó el programa estadístico R versión 3.6.2 Dark and

Stormy nighth, mediante el Método de análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, ya que este es el método más apropiado para comparar varios grupos de una variable cuantitativa que en este caso son pH del medio de disolución, tipo de pectina y concentración (de pectina y Starch 1500®). A partir de esto se realizó la comparación entre los resultados para establecer si existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos y poder establecer con mayor seguridad cuál de las matrices posee las características idóneas que represente el sistema matricial que se busca desarrollar.

Experimento Inicial: Factores

Factor 1:

Diferentes pH de los medios en los cuales se evaluarán las diferentes matrices en la disolución.

Factor 2:

Diferentes concentraciones de Starch 1500 y pectina extraída; este factor se divide en 3 niveles los cuales corresponden a las diversas matrices elaboradas 1A, 2A y 3A.

Tabla N° 25. ANOVA para comparación de matrices A (matriz elaborada con pectina extraída) con 95% de confianza.

Factores	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de suma de cuadrados	Valor F crítico	Valor P
Factor 1: Medios de disolución	2	231.59	115.79	15,500.56	0.0000%
Factor 2: concentración	2	19.72	9.86	1,319.58	0.0000%
Interacción del factor 1 y 2	4	15.03	3.76	503.01	0.0000%
Residuos	18	0.13	0.01		0.0000%

La tabla N°25 representa el análisis de varianza de la matriz A con los diferentes factores en análisis al comparar el valor crítico de F obtenido experimentalmente

con respecto a la tabla de valores teóricos de la distribución de F (0.05) (Ver anexo 21), la cual dicta que para 2 grados de libertad en el numerador y 18 en el denominador se obtiene un valor teórico de 3.555. Por tanto, al ser nuestro valor F crítico de 15,500.56 para el factor 1, y 1,319.58 para el factor 2, se observa que ambos valores son mucho mayores que el teórico por lo que se rechaza la hipótesis nula.

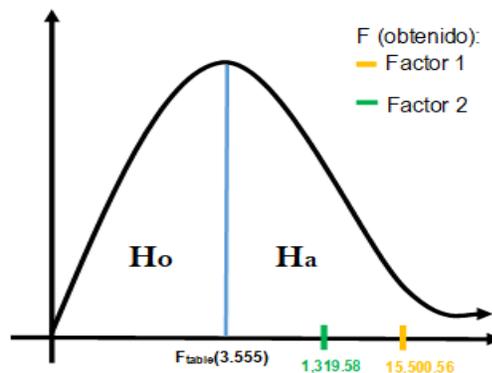


Figura N° 15. Distribución del valor de F crítico obtenido en la investigación con respecto a las hipótesis.

Como se puede apreciar en la figura anterior si se obtenía un valor crítico de F menor de 3.55 que es el valor teórico (Ver anexo N° 19), la hipótesis alterna (H_a) se rechazaría, pero si el valor era superior al teórico la hipótesis alterna (H_a) sería aceptada, experimentalmente los valores obtenidos en la investigación para ambos factores son mucho mayores que el teórico dado por la tabla de distribución de F, aceptándose la hipótesis alterna.

Si además se observa el dato de la columna P valor, al ser menor que el 5%, puede observarse que existe un efecto estadísticamente significativo del factor 1 en la liberación de Riboflavina, de igual modo pasa con el factor 2.

Por lo tanto, al ser el valor de P menor que el 5%, puede concluirse que existe un efecto significativo de la interacción del factor 1 el cual representa los medios de disolución con respecto al factor 2 el cual representa las concentraciones para la liberación de Riboflavina, con un nivel de confianza del 95.0%.

Luego de confirmar que sí existe una diferencia significativa entre los factores para la liberación de Riboflavina se volvió necesario utilizar un modelo estadístico que permita evaluar de manera más profunda la relación entre los **niveles** de cada factor por lo que se utilizó el Test de Tukey tanto para el factor 1 como el 2 (confianza 95%) para verificar la diferencia estadísticamente significativa entre los **niveles** existentes presentándose a continuación los resultados.

Tabla N° 26. Test de Tukey para el factor 1 (confianza 95%).

Factor 1: medios de disolución	Diferencia	Menor Diferencia	Mayor diferencia	Valor P
pH 1.2 (ácido) - pH 6.2 (agua)	-4.18	-4.29	-4.08	0.0000%
pH 7.6 (básico) - pH 6.2 (agua)	2.96	2.85	3.06	0.0000%
pH 7.6 (básico) - pH 1.2 (ácido)	7.14	7.03	7.24	0.0000%

Cabe recordar que para el factor 1 existen 3 niveles, por lo que con el Test de Tukey se pretendía determinar si existe diferencia significativa entre estos 3 niveles los cuales representan los medios con los que se evaluó la liberación de la Riboflavina en las matrices en estudio.

En la Tabla N°26 se puede observar que la diferencia de la media de la liberación de Riboflavina entre el pH 1.2 (ácido) y el pH 6.2 (agua) tiene un valor de -4.18 lo que significa que la Riboflavina se libera en mayor cantidad en el pH 6.2 (agua) en comparación con el pH 1.2 (ácido), además si se compara la liberación en el pH 7.6 (básico) respecto al pH 6.2 (agua) la diferencia es 2.96 lo que significa que la liberación de Riboflavina es mayor en el pH 7.6 (básico), por último si comparamos la liberación de Riboflavina en el pH 7.6 (básico) con respecto al pH 1.2 (ácido) confirmamos nuevamente que en el pH 7.6 (básico) presenta la mayor cantidad de Riboflavina liberada.

Por lo tanto, al ser el valor de P menor que el 5%, puede concluirse que existe un efecto significativo de la interacción entre los tres niveles del factor 1 en la liberación de Riboflavina, con un nivel de confianza del 95.0%.

Luego de analizar el factor 1 se procedió al análisis estadístico del factor 2:

Tabla N° 27. Test de Tukey para el factor 2 (confianza 95%).

Factor 2: Concentración	Diferencia	Menor diferencia	Mayor diferencia	Valor P
2 A - 1 A	-1.39	-1.50	-1.29	0.0000%
3 A - 1 A	0.66	0.55	0.76	0.0000%
3 A - 2 A	2.05	1.95	2.15	0.0000%

En la Tabla N°27 se puede observar que la diferencia de la media de la liberación de Riboflavina entre la matriz 2 A y 1 A, tiene un valor de -1.39 lo que significa que la matriz 1A permite mejor liberación de Riboflavina en comparación con la matriz 2 A, además si se compara la liberación de la matriz 3A respecto a la matriz 1A la diferencia es 0.66 lo que significa que la matriz 3 A libera más Riboflavina que la 1 A, por último si comparamos la liberación de Riboflavina en la matriz 3A con respecto a la matriz 2 A confirmamos nuevamente que la matriz 3 A presenta la mayor cantidad de Riboflavina liberada.

Por consiguiente, al ser el valor de P menor que el 5% en todos los niveles, puede concluirse que existe un efecto significativo de la interacción entre los niveles del factor 2 en la liberación de Riboflavina, con un nivel de confianza del 95.0%.

Según el análisis estadístico anterior y relacionando los dos factores se tiene que, la matriz 3 A libera mayor cantidad de Riboflavina y el medio en el que mejor se comportan las matrices para permitir la liberación del fármaco es el pH 7.6 (básico), sin embargo estos resultados por separados no proporcionan una respuesta que demuestre el comportamiento que debería tener un sistema de liberación retardado, por lo que se acudió a realizar un análisis que integre ambos factores y que estos a su vez puedan ser relacionados, de manera que proporcione una respuesta con la que se confirme cuál matriz tiene un comportamiento similar a un sistema de liberación retardado. Por lo que se

recurrió a utilizar un diagrama de cajas para tener una demostración visual de la diferencia en las medias de la liberación de Riboflavina en cada medio de disolución y concentración. Este se representa a continuación:

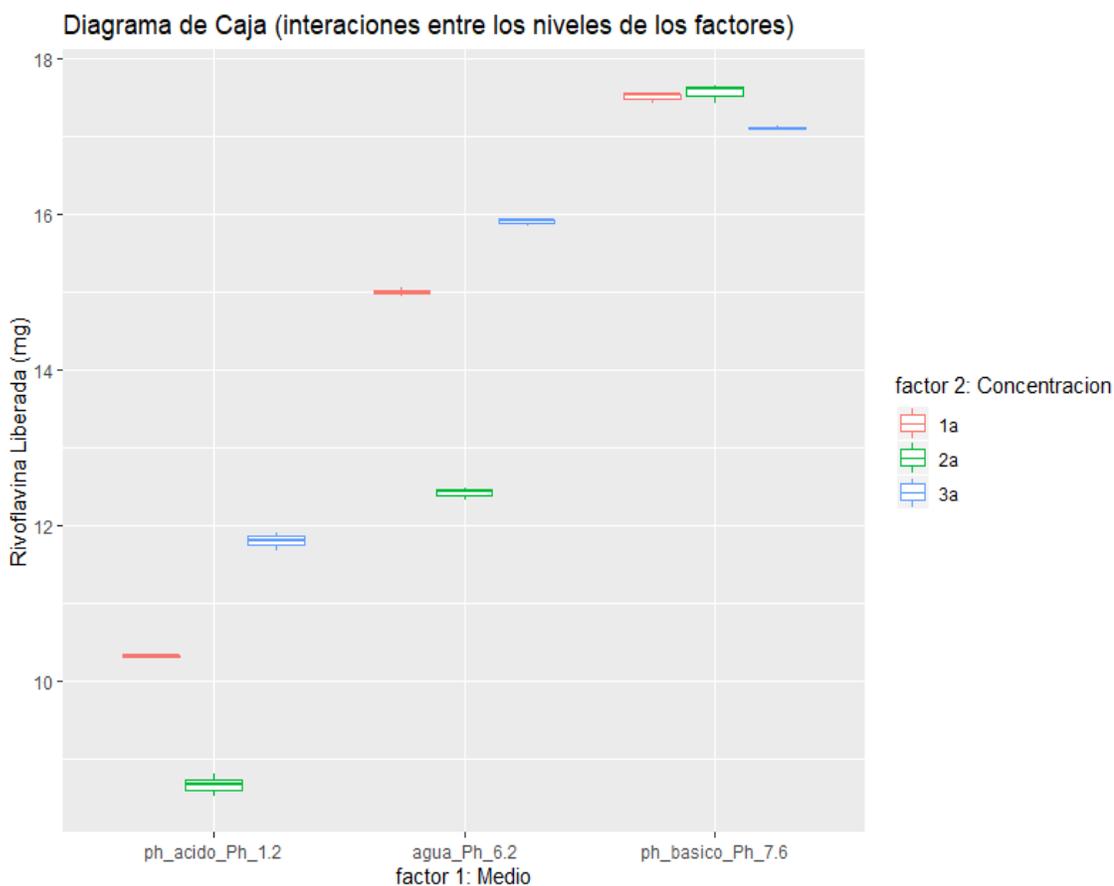


Figura N° 16. Diagrama de caja para la interacción entre los factores y sus niveles (Prueba inicial)

En la gráfica anterior se presenta la comparación de la relación que tiene el medio de disolución con las matrices, teniendo en cuenta que lo que se busca para un sistema de liberación retardado es que el sistema matricial libere poca cantidad de principio activo en un pH ácido y que a su vez libere gran cantidad de principio activo en un pH básico, ya que se espera que el efecto farmacológico sea desarrollado en el tracto gastrointestinal cuyo pH tiende a ser básico.

Analizando la figura N°16 y la tabla N°27 podemos observar la relación que tiene el medio de disolución con las matrices, buscando que matriz posee las características mencionadas anteriormente para un sistema de liberación retardada, si analizamos el pH 6.2 y la matriz 3 A es la que mejor liberación de Riboflavina presenta y la matriz 2 A es la que menor liberación de Riboflavina permite, en el pH 1.2 la matriz que mayor Riboflavina liberó fue la matriz 3 A y la que menor liberación de Riboflavina presento sigue siendo la 2 A, por último y no menos importante en el pH 7.6 la matriz que mayor liberación de Riboflavina presentó fue la 2 A y la que menor cantidad de Riboflavina liberó fue la 3 A, por lo que se confirma que la matriz que cumple con las características para ser utilizada como posible sistema de liberación retardada es la **matriz 2 A**, ya que es la que menos cantidad de Riboflavina libera en pH 1.2 (ácido) y la que mayor cantidad de Riboflavina libera en el pH de 7.6 (básico).

Obteniéndose los datos anteriores se procedió al desarrollo del experimento final, con este experimento se pretendía determinar cuál matriz poseía las mejores características para ser utilizada como posible sistema de liberación retardada comparando dos matrices con diferentes pectinas (extraída y comercial) pero con iguales concentraciones, dicha comparación fue realizada en los 3 medios de disolución propuestos.

EXPERIMENTO FINAL: comparación de matriz elaborada con pectina extraída (2A) y matriz elaborada con pectina comercial (2B).

Luego del análisis de los resultados en los que se muestra que la matriz idónea para ser utilizada como posible sistema de liberación retardada es la matriz 2 A, se tomó la decisión de evaluar el comportamiento de la matriz 2 A y 2 B, las cuales fueron sometidas a pruebas de disolución utilizando los mismos reactivos y parámetros establecidos en el experimento inicial.

Disoluciones realizadas en el Experimento Final:

En este experimento se evaluaron las matrices 2A y 2B. Se preparó cada medio por separado, realizándose una disolución con cada medio obteniéndose 3 disoluciones en total, de las cuales se obtuvieron 3 datos de cada matriz en cada medio, este experimento se realizó con el fin de comparar los resultados de ambas matrices por medio del análisis estadístico de ANOVA, Test de Tukey y Diagrama de cajas para determinar cuál de las dos matrices en estudio refleja las características que presentan un sistema de liberación retardada

Las matrices fueron distribuidas de la siguiente forma:

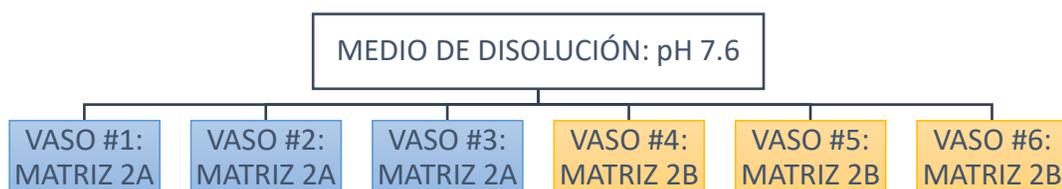


Figura N° 17. Distribución de las matrices en la disolución de Buffer pH7.6

Nota: La misma distribución que tienen las matrices en el ejemplo anterior se siguió para los medios de pH 7.6 y pH 1.2

-Parámetros del equipo disolutor₍₇₎:

RPM: 50

Tiempo: 45 minutos

Temperatura: 37± 0.5 °C

-Parámetros del espectrofotómetro UV-VIS:

Longitud de onda: 444nm

Tabla N° 28. Resultados obtenidos en la disolución (Ácido).

DISOLUCIÓN: pH 1.2			
Matriz 2 A		Matriz 2 B	
Absorbancias (A)	mg de PA liberado	Absorbancias (A)	mg de PA liberado
0.212	8.02	0.257	9.72

Tabla N°28. Continuación

0.224	8.47	0.273	10.32
0.216	8.17	0.281	10.63
Promedio	8.22	Promedio	10.22

Tabla N° 29. Resultados obtenidos en la disolución (Medio agua).

DISOLUCIÓN: pH 6.2			
Matriz 2 A		Matriz 2 B	
Absorbancias (A)	mg de PA liberado	Absorbancias (A)	mg de PA liberado
0.295	11.16	0.356	13.46
0.296	11.19	0.345	13.05
0.286	10.82	0.353	13.35
Promedio	11.05	Promedio	13.29

Tabla N° 30. Resultados obtenidos en la disolución (Medio Buffer fosfato).

DISOLUCIÓN: pH 7.6			
Matriz 2 A		Matriz 2 B	
Absorbancias (A)	mg de PA liberado	Absorbancias (A)	mg de PA liberado
0.520	19.66	0.442	16.71
0.521	19.70	0.445	16.83
0.526	19.89	0.451	17.05
Promedio	19.89	Promedio	16.87

Mediante los resultados obtenidos en las diferentes disoluciones realizadas en el experimento final, al igual que en el experimento inicial se utilizó el programa estadístico R versión 3.6.2 Dark and Stormy night para analizar los datos mediante el Método de análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. Se realizó la comparación entre los resultados para establecer si existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos y poder establecer claramente cuál

pectina ya sea comercial o extraída presentaba las características idóneas para ser utilizada en la formulación matricial como posible sistema de liberación retardada de fármacos hidrosolubles, para ello se procedió al análisis de los factores.

Experimento final: Factores

Factor 1: Diferentes pH de los medios en los cuales se evaluarán las diferentes matrices en la disolución.

Factor 2: Diferentes tipos de pectina, este factor se divide en 2 niveles los cuales corresponden a la pectina extraída (2 A) y pectina comercial (2 B)

Tabla N° 31. Resultados de ANOVA para experimento final (comparación de matrices 2 A y 2 B).

Factores	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de suma de cuadrados	Valor de F crítico	Valor P
Factor 1: medio de disolución	2	250.16	125.08	1,882.60	0.0000%
Factor 2: tipo de pectina	1	0.53	0.53	7.93	1.556%
Interacción: factor 1 y 2	2	23.68	11.84	178.22	0.000%
Residuos	12	0.80	0.07		

En el anexo N°31 se observa que el valor de F teórico dado en la tabla de valores críticos de distribución de F (0.05) es 3.885 (Ver anexo N°19) y el obtenido experimentalmente es 1,882.60, ya que el valor obtenido en la investigación es mayor se rechaza la hipótesis nula, al mismo tiempo el valor obtenido de P es menor al 5%, por lo tanto hay un efecto estadísticamente significativo del factor 1 en la liberación de Riboflavina, al igual que ocurrió en el experimento inicial. Si evaluamos el factor 2 se observa en la tabla N°31 que su valor F crítico es de 7.93 que es mayor que el teórico encontrado en la tabla de valores críticos de distribución de F (0.05) que tiene un valor de 4.747, por lo que se rechaza la

hipótesis nula, por otro lado refiriéndose al valor de P este es 1.556% siendo menor al 5% por lo tanto hay un efecto estadísticamente significativo del factor 2 en la liberación de Riboflavina.

Además, confirmamos que sí existe un efecto significativo de la interacción del factor 1 y 2 en la liberación de Riboflavina ya que el valor P es menor al 5% con el 95% de confianza.

Luego de confirmar que sí existe una diferencia significativa entre los factores para la liberación de Riboflavina, en el experimento final se volvió necesario utilizar el Test de Tukey nuevamente tanto para el factor 1 como el 2 (confianza 95%) para verificar la diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de cada factor.

Tabla N° 32. Resultados del Test de Tukey para el Factor 1 (confianza 95%)

Factor 1: Medio	Diferencia	Menor diferencia	Mayor diferencia	Valor P
pH 1.2 (ácido) - pH 6.2 (agua)	-2.79	-3.19	-2.39	0.0000%
pH 7.6 (básico) - pH 6.2 (agua)	6.14	5.74	6.53	0.0000%
pH 7.6 (básico) - pH 1.2 (ácido)	8.93	8.53	9.32	0.0000%

La tabla N° 32 muestra la diferencia de la liberación de Riboflavina entre el pH 1.2 y pH 6.2 la cual es -2.79 lo que significa que la liberación es mayor en el pH 6.2 y se confirma ya que el valor de P es menor del 5%, si analizamos el pH 7.6 y el pH 6.2 podemos observar que la diferencia de la liberación de Riboflavina es de 6.14 por lo tanto la liberación es mayor en el pH se 7.6 mismo que se confirma ya que el valor de P es menor del 5%, por último la diferencia entre pH 7.6 y pH 1.2 es de 8.93 lo que significa que la liberación de Riboflavina es mucho mayor en el pH 7.6 que en el pH 1.2 y nuevamente el valor de P es menor al 5%.

Evaluación del factor 2:

Tabla N° 33. Resultados del Test de Tukey para el Factor 2 con un nivel de confianza de 95%.

Factor 2: tipo de pectina	Diferencia	Menor diferencia	Mayor diferencia	Valor P
2 B – 2 A	0.34	0.08	0.61	1.5562%

En la Tabla N°33 se puede observar que la diferencia de la liberación de riboflavina entre la matriz 2 B y 2 A tiene un valor 0.34 lo que significa que la matriz 2 B que es elaborada con pectina comercial permite mejor liberación de Riboflavina en comparación con la matriz 2 A.

Además, al ser el valor de P menor que el 5%, puede concluirse que existe diferencia significativa en la liberación de Riboflavina entre los niveles del factor 2, con un nivel de confianza del 95.0%.

Según el análisis estadístico anterior la matriz 2B libera mayor cantidad de Riboflavina y el medio en el que mejor se comportan las matrices para permitir la liberación es el pH de 7.6; sin embargo, estos resultados por separados no proporcionan una respuesta que permita valorar en conjunto ambos factores, de forma que se demuestre el comportamiento que debería tener un sistema de liberación retardado, por lo que se acudió a realizar un análisis que integre ambos factores y puedan ser relacionados, de manera que proporcione una respuesta con la que se confirme el comportamiento que debe presentar la matriz que simulara a un sistema de liberación retardado en el medio de disolución (pH 7.6) semejante al del tracto gastrointestinal donde se liberara por completo el sistema para realizar el efecto farmacológico.

A partir del análisis estadístico anterior se recurre a realizar un diagrama de cajas que permita describir cómo van a comportarse la matriz 2A y 2B en los diferentes pH, con este diagrama podrá definirse entonces cuál de las formulaciones

presenta las características idóneas para ser utilizado como un posible sistema de liberación retardada.

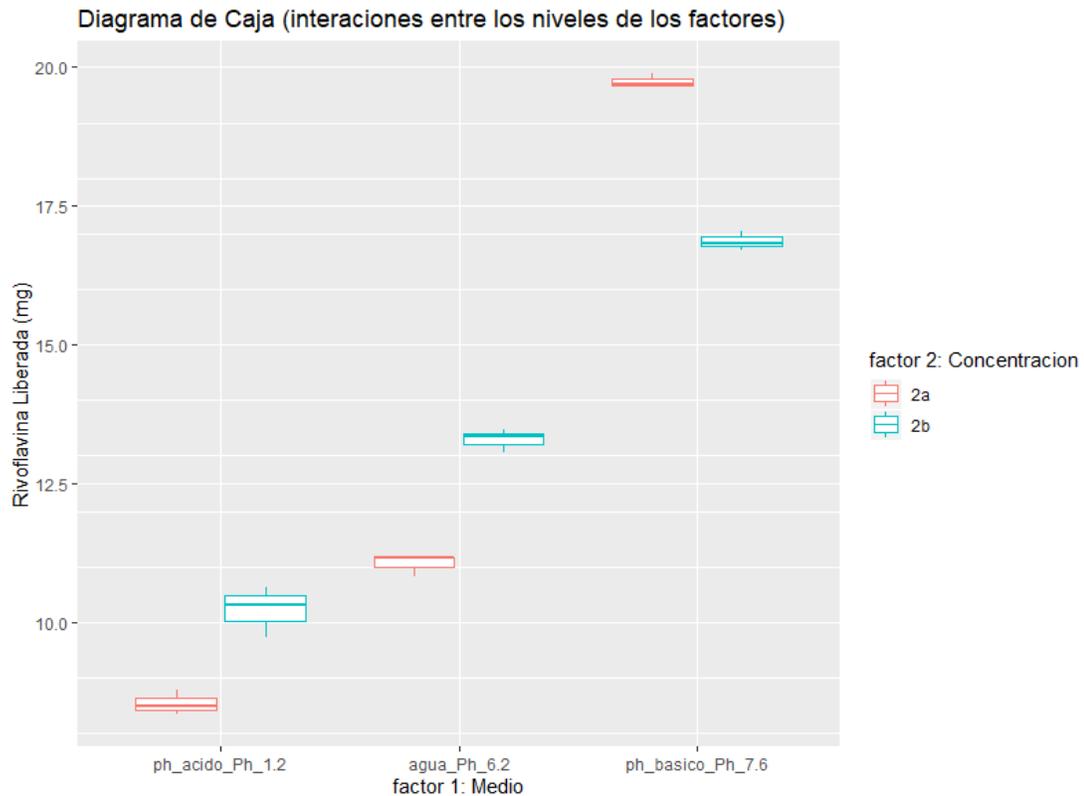


Figura N° 18. Diagrama de caja de interacción entre niveles de los factores (Prueba final).

En la figura N°18 se compara el comportamiento de las matrices 2A y 2B que han sido sometidas a pruebas de disolución bajo las mismas condiciones en 3 medios diferentes, donde es posible apreciar que en el 1.2 y pH 6.2 la matriz 2B libera mayor cantidad de Riboflavina que la matriz 2A, sin embargo cuando se analiza el comportamiento de ambas matrices en el pH de 7.6 la matriz que mayor cantidad de Riboflavina libera es la matriz 2A, teniendo en cuenta que este pH es el de interés debido a que es en este donde la Riboflavina debe ser liberada para efectuar su función.

Con base en lo anterior es evidente que la matriz 2 A elaborada con pectina extraída es la que presenta un comportamiento similar a un sistema de liberación retardada, esto se debe a que dicha matriz permite poca liberación del principio activo en un pH ácido (similar al estómago) y a la vez permite una mejor liberación de la Riboflavina en un pH básico (similar al intestino delgado)⁽⁹⁾.

La pectina, como otros polisacáridos, es capaz de atravesar de forma inalterada la mayor parte del tracto digestivo, caso contrario es el del Starch 1500 el cual al entrar en contacto con soluciones de ácidos fuertes cuyos pH son menores a 4.5 sufre hidrólisis por lo que se desactivan las cadenas de enlaces glucosídicos α (1,4), por lo que no llega intacto al intestino. Si se hace referencia a la pectina y PVP estos producen una interacción por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidróxido de la pectina y los carboxilos de la PVP; por lo que es de suma importancia la formación del hidrogel con hinchamiento pH-dependiente, dado que la pectina por sí sola no resulta en todos los casos totalmente eficaz para conseguir formulaciones capaces de alcanzar de forma inalterada el tracto gastrointestinal permitiendo la liberación del fármaco modelo (Riboflavina).

En base a lo anterior y luego de tener los resultados del análisis estadístico se demuestra que la matriz 2A es la que más se adecua al mecanismo mencionado anteriormente y a la vez reúne las características que son más cercanas a un sistema de liberación retardado, por poseer los componentes en las concentraciones que mejores resultados presentaron a lo largo de la investigación.

5.6 Determinación de la cinética de liberación del principio activo.

Para la determinación de la cinética de liberación de Riboflavina de las matrices (2A y 2B) se realizó 1 disolución, utilizando como medio buffer fosfato pH 7.6; además se conservó para dicha prueba los mismos parámetros en el equipo

(temperatura y RPM). Los tiempos de muestreo fueron 5, 15, 25, 35 y 45 minutos y en ellos se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla N° 34. Resultados de la cinética de liberación de Riboflavina matriz 2 A.

CINETICA: MATRIZ 2 A				
MEDIO: BUFFER pH 7.6				
Tiempo transcurrido (min)	Abs (A)	mg de PA liberado	ln [] en mg	1 / ln [] en mg
5	0.006	0.23	-1.470	-0.680
15	0.144	5.45	1.696	0.590
25	0.272	9.91	2.294	0.436
35	0.392	14.82	2.696	0.371
45	0.471	18.01	2.891	0.346

En la tabla N°34 se presentan los resultados de las concentraciones de Riboflavina tomada a diferentes tiempos de muestreo, además se presentan dos columnas que muestran (ln []) y (1 / ln []) valores con los que se determinará el orden 0, orden 1 y orden 2 respectivamente. Con lo anterior se definirá la cinética de liberación de Riboflavina de la matriz A2 en buffer pH 7.6.

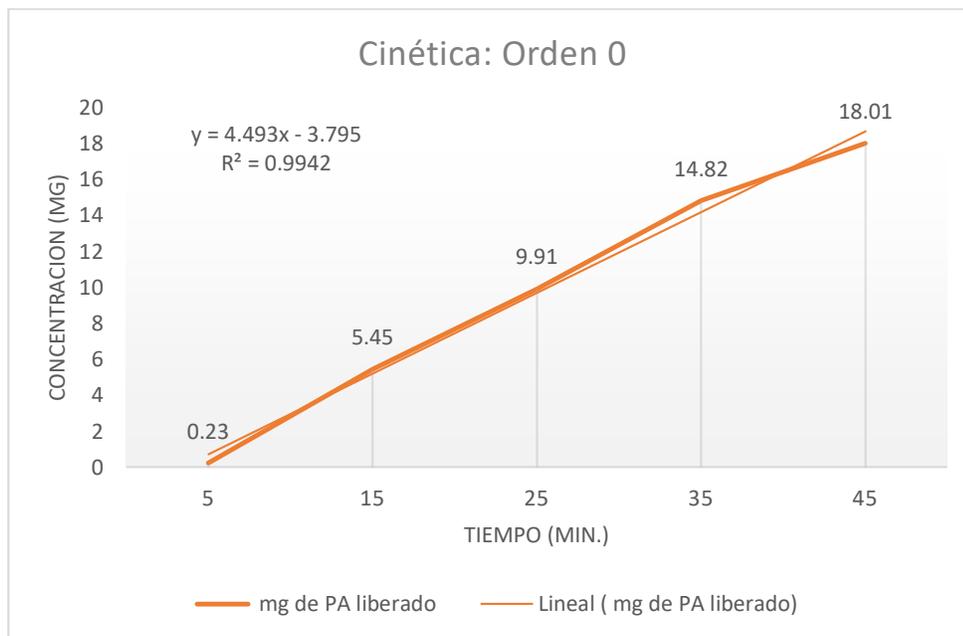


Figura N° 19. Liberación de Riboflavina ([] vs tiempo) contenida en matriz 2A, ajuste para el modelo de orden 0.

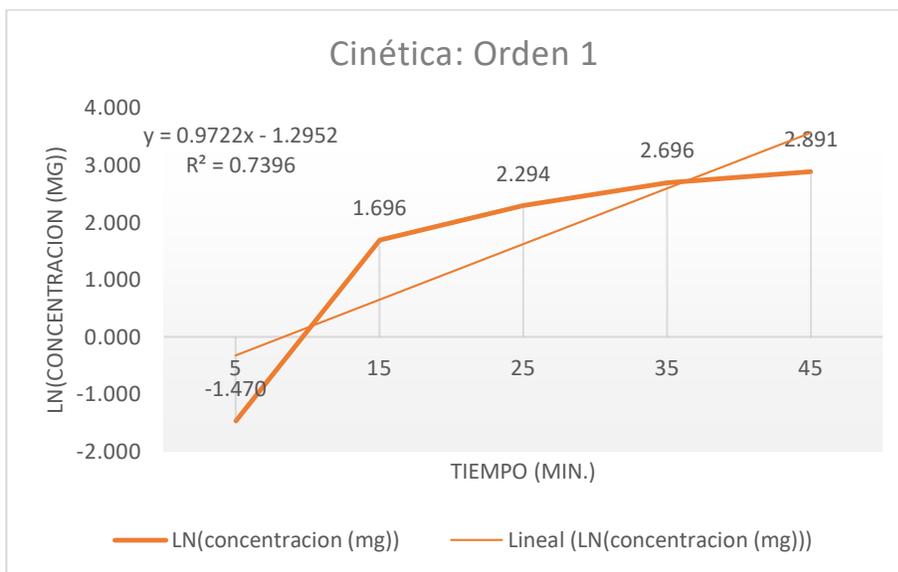


Figura N° 20. Liberación de Riboflavina (ln [] vs tiempo) contenida en matriz 2A, ajuste para el modelo de orden 1.

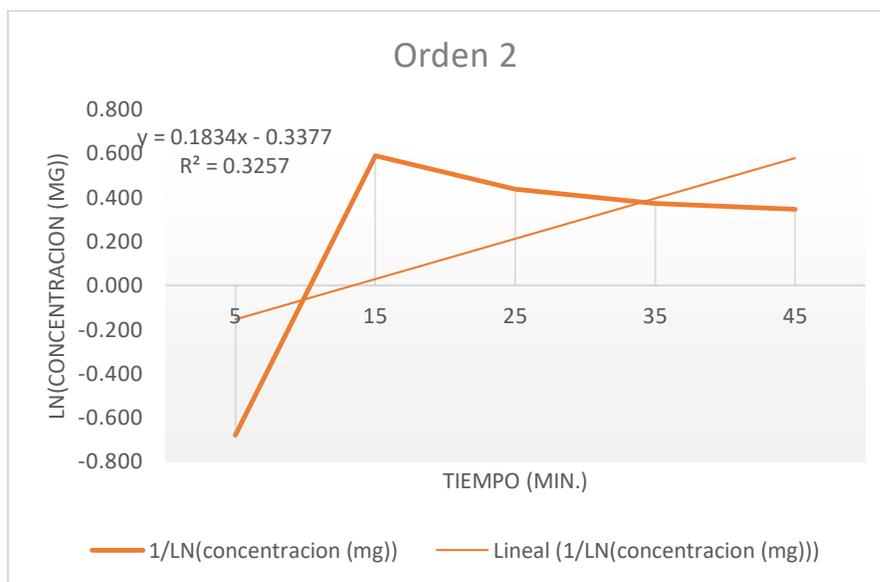


Figura N° 21. Liberación de Riboflavina (1/ln [] vs tiempo) contenida en matriz 2A, ajuste para el modelo de orden 2.

En las figuras N°19, N°20 y N°21 se han representado los resultados experimentales correspondientes a ([] vs tiempo), (Ln [] vs tiempo) y (1/Ln [] vs

tiempo) respectivamente. En el primer caso para el modelo de orden 0 (Figura N°19) se observa linealidad en la relación entre la concentración de Riboflavina liberada con respecto del tiempo, esto es evidente ya que el valor de $R^2=0.9942$, por lo que los resultados experimentales obtenidos para la matriz 2 A demuestran que el orden de la cinética de liberación que más se apega es el modelo de orden 0, algo que no sucede en los ajustes para los modelos de orden 1 y orden 2 ya que ambos presentan puntos de inflexión al minuto 15 y por lo tanto no se muestra linealidad constante. Si se analizan sus valores de R^2 se pone de manifiesto la escasa correlación existente entre los resultados experimentales y el modelo de orden 1 ($R^2=0.7396$) y orden 2 ($R^2=0.3257$). En consecuencia, de lo anterior, se determinó que el modelo propuesto para orden 0, es el más indicado para describir el comportamiento de la liberación de la Riboflavina contenida en la matriz 2A.

Tabla N° 35. Resultados de la cinética de liberación de Riboflavina matriz 2B en buffer pH 7.6

CINETICA: MATRIZ 2 A				
MEDIO: BUFFER pH 7.6				
Tiempo transcurrido (min)	Abs (A)	mg de PA liberado	ln [] en mg	1 / ln [] en mg
5	0.028	1.91	0.647	1.545
15	0.264	5.98	1.788	0.559
25	0.385	10.33	2.335	0.428
35	0.431	14.73	2.690	0.372
45	0.435	17.12	2.840	0.352

En la tabla N°35 se presentan los resultados de las concentraciones de Riboflavina tomada a diferentes tiempos de muestreo, además se presentan dos columnas que muestran (ln []) y (1/ ln []) los valores con los cuales se determinó el orden 0, orden 1 y orden 2 respectivamente. Con lo anterior se definió la cinética de liberación de Riboflavina de la matriz 2 B en Buffer fosfato pH 7.6.

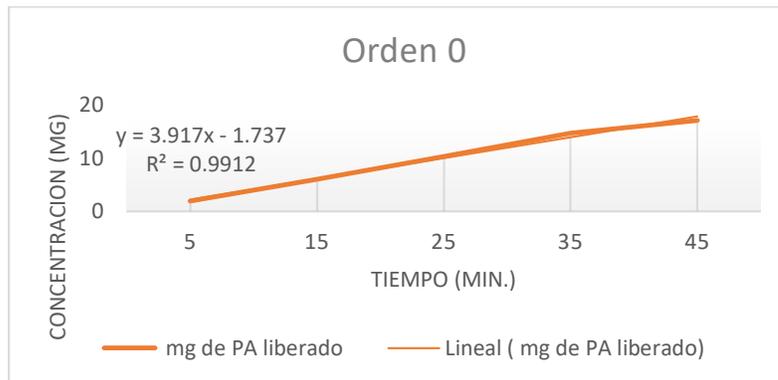


Figura N° 22. Liberación de Riboflavina contenida en matriz 2 B, ajuste para el modelo de orden 0.

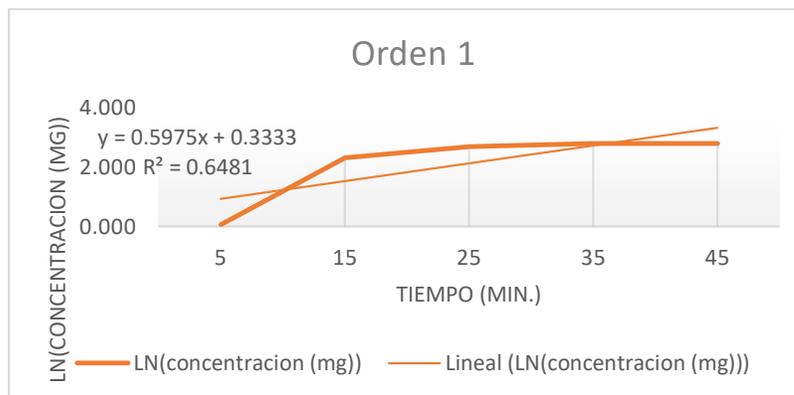


Figura N° 23. Liberación de Riboflavina contenida en matriz 2B, ajuste para el modelo de orden 1.

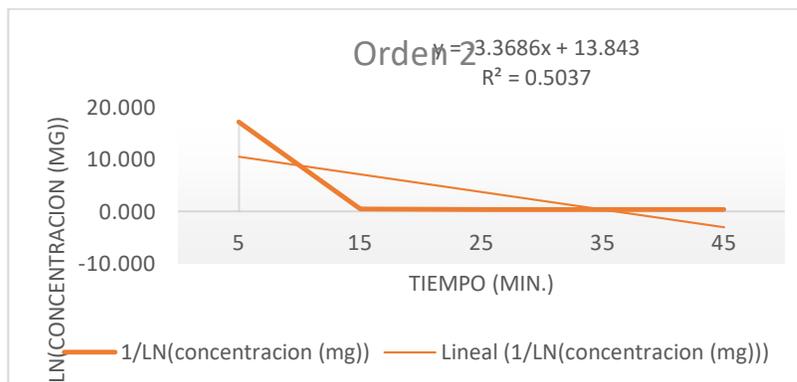


Figura N° 24. Liberación de Riboflavina contenida en matriz 2B, ajuste para el modelo de orden 2.

En las figuras N° 22, N° 23 y N° 24 se han representado los resultados experimentales correspondientes a [] vs tiempo, Ln [] vs tiempo y 1/Ln [] vs tiempo respectivamente. En el primer caso para el modelo de orden 0 (Figura N°22) a pesar que no se observa completa linealidad en la relación entre la concentración de Riboflavina liberada con respecto del tiempo posee un valor de $R^2 = 0.9912$ por lo que es el modelo que mejor se ajusta de los resultados experimentales obtenidos, algo que no sucede los modelos de orden 1 (Figura N°23) y orden 2 (Figura N°24) ya que ambos presentan valores de R^2 bastante bajos, ($R^2 = 0.6481$) para el modelo de orden 1 y ($R^2 = 0.5737$) para el orden 2, lo que refleja la escasa correlación existente entre los resultados experimentales y dichos modelos. Teniendo en cuenta lo anterior se evidencia que el comportamiento que desarrollaron tanto de la matriz 2A como la 2B para la liberación de Riboflavina tiene una cinética de liberación muy semejante al de orden 0.

**CAPITULO VI
CONCLUSIONES**

6.0 CONCLUSIONES

1. La variedad *Citrus aurantium* proporcionó un rendimiento promedio de pectina en cada extracción del 13.3428 %, partiendo de 25 g de material vegetal seco, utilizando el método de hidrólisis ácida para la extracción.
2. Luego de realizar las pruebas de identificación, valoración de grupos metoxilos y pérdida por secado establecidas en la USP 37 / NF 32, en ambos tipos de pectina se cumplen con las especificaciones.
3. Al evaluar en el primer experimento el factor uno (diferentes pHs) y el factor dos (diferentes concentraciones de Starch 1500 y pectina extraída), la matriz que contiene una concentración de 41% para ambos componentes es la que mejor comportamiento presentó en cada medio de disolución.
4. Al comparar en un segundo experimento la matriz elaborada con pectina comercial contra una elaborada con pectina extraída en las mismas concentraciones, la matriz elaborada con pectina extraída (2A) es la que presento un comportamiento similar a un sistema de liberación retardada, debido a la que es la que menor liberación de principio activo presenta en un pH similar al estómago y a la vez mayor liberación en un pH similar al intestino delgado.
5. La cinética de liberación evidencio que el modelo de orden de reacción que más se ajusta a los resultados experimentales y permite describir el comportamiento de liberación de la Riboflavina en los sistemas estudiados, es el modelo de orden 0.
6. De acuerdo con los resultados obtenidos de la liberación de Riboflavina, esta investigación es prometedora para el posterior avance del desarrollo

de nuevas formulaciones y selección de nuevos excipientes de origen natural.

7. El desarrollo de sistemas matriciales con pectina cítrica es capaz de modular la liberación de fármacos hidrosolubles en distintas zonas del tracto gastrointestinal.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. En futuras investigaciones realizar la extracción de pectina en una hidrólisis cuyo pH no sea menor a 2, ni a temperaturas mayores de los 90°C, para evitar que se degrade la pectina y no se obtenga el producto esperado.
2. Que se desarrollen ensayos utilizando un polímero diferente al Starch 1500, que sea insoluble a pH ácido, de manera que disminuya el porcentaje disuelto del principio activo a un pH ácido y lo favorezca a un pH básico.
3. Que se realice el estudio de sistemas de liberación con matrices, cambiando la forma farmacéutica de cápsula a tableta, para evaluar si el cambio de forma farmacéutica de las matrices modifica, en alguna medida, la liberación del principio activo.
4. En futuros estudios en los que se contemple la formulación de sistemas matriciales con pectina, se sugiere se evalúen mayor cantidad de matrices con diferentes proporciones de pectina.
5. Que se evalúen las matrices en medios de disolución a pHs que oscilen en rangos de 1.2 a 7.6, para valorar el comportamiento más completo de la disolución de las matrices.
6. Llevar acabo en futuras investigaciones un proceso de purificación y controles microbiológicos a la pectina extraída.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfonso, E. (2010). Estudio del comportamiento reologico de las pectinas con diferente grado galacturónico obtenida a partir de *Citrus paradisi* (GRAY FRUIT). *Universidad De El Salvador*, 31.32.
2. Barraza C. y Rodriguez K. (2010). Caracterización fisicoquímica del almidón de raíz de *Sechium edule* (güisquil) verde sin espinas de El Salvador, no modificado y pregelatinizado, comparado con el almidón comercial. *Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador*.
3. Biyani, M. K. (2008). Selección de cápsulas: información relevante. *Pharmaceutical Technology*, Volumen 15.
4. Bustillo, C., & Romero, E. (2008). Obtención de riboflavina (Vitamina B2), por proceso de fermentación sumergida en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*. *Trabajo de graduación para optar al grado de Licenciatura En Química y Farmacia. Facultad de Quimica y Farmacia, Univerisidad de El Salvador, El Salvador*.
5. Cáceres Castellon, K., & Rivas Castro, M. V. (2004). Comparación del poder de Gelificación de la Pectina comercial con pectina extraída de la cascara de naranja variedad valencia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador.
6. Castellanos, J., & Gonzales, C. (2014). Evaluación de matrices de

quitosano y gel de *Aloe vera l.* (sabila) como sistema de liberación sostenida para riboflavina. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador.

7. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2014). USP 37, NF 32, Vol.1 y Vol.2
8. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2007).USP 30, NF 25, Vol. 1 y Vol. 2.
9. Costa, E., Arancibia, A., & Aiache, J. M. (2004). Sistemas matriciales. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(2), 259–265.
10. Delens, M., García, M., Herrera, J., Morón, F., Sáenz, D., & Solís, P. (2005). “Farmacopea Vegetal Caribeña.” Segunda edición actualizada.
11. Domeneche, J., Martínez, J., & Plá, D. (2000). *Biofarmacia y Farmacocinética*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. España.
12. Guerra, W. (2013). Diseño y Evaluación IN VITRO de comprimidos de liberación sostenida de Ibuprofeno usando matrices hidrofílicas e hidrofóbicas.
13. Henao, E. C., & Guerra, Adrian Fernando Henao, C. A. (2012). Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción. Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias., 1(28 (3)), 13–15.

14. López, S. (2017). Cápsulas de gelatina dura. Catedra de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. El Salvador.

15. Martínez, Y. (2013). Desarrollo de matrices biopolímericas basadas en polivinil alcohol para la liberación controlada de antibióticos y biomoléculas. Centro de Investigaciones y Desarrollo En Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

16. Ministerio de Salud Política nacional de los medicamentos/Ministerio de Salud (MINSAL), Organización Panamericana de la Salud (OPS) .1ª Ed. San Salvador.

17. Mishra, R. K., Datt, M., Pal, K., & Banthia, A. K. (2008). Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Doi:10.1007/s10856-007-3310-4

18. Mishra, Rakesh K., Datt, M., & Banthia, A. K. (2008). Synthesis and characterization of pectin/pvp hydrogel membranes for drug delivery system. *AAPS PharmSciTech*. Doi:10.1208/s12249-008-9048-6

19. Mura, P., Maestrelli, F., Cirri, M., González Rodríguez, M. L., & Rabasco Alvarez, A. M. (2003). Development of enteric-coated pectin-based matrix tablets for colonic delivery of theophylline. *Journal of Drug Targeting*.

20. Pineda, A., Fernández, A., Gómez, R., Horta, A., Martínez, N., & Lara, C. (2005). Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia. *Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra*, 13, 5–8.
21. Praveen, S., & Radendra, N. (2008). Controlled release hydrophilic matrix tablet formulations of isoniazid: Design and in vitro studies. *AAPS*
22. Pseidy Luz Mamani Crispin. (2012). Estudio comparativo de pectina e hidroxipropilmetilcelulosa en la formulación de comprimidos matriciales para la liberación controlada de fármacos hidrosolubles. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia.
23. R. Sánchez, R. Damas, P Domínguez, P. C. (2010). Uso de la Hidroxipropilmetilcelulosa en liberación modificada de fármacos. Departamento de Investigación y Desarrollo, Farmespaña Industrial.
24. Rodríguez, C. V. Z. (2016). “Aprovechamiento de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*): extracción de pectina para elaboración de mermelada”. Universidad Dr. José Matías Delgado, San Salvador, El Salvador.
25. Rodriguez, K., & Roman, A. (2004). Extracción y evaluación de pectina a partir de la cascara de la naranja de las variedades *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi* y propuesta de diseño de una planta piloto para su producción. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador.

26. Sandoval, P. A., Rajabi-Siahboomi, A., & D'León, L. F. P. (2015). Análisis comparativo de la cinética de liberación de diclofenaco sódico a partir de matrices hidrofílicas en medios de disolución convencionales y biorrelevantes. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, Volumen 44.
27. Savier Cristian, L. S. (2013). Elaboración de una colección de referencia y fortalecimiento de la información botánica y farmacológica de 31 especies de plantas utilizadas en la elaboración de medicina natural. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
28. Siew, A. (2017). Pruebas de disolución. *Pharmaceutical Technology*, Volumen 15.
29. Silva, N. C., Benites, E. A., & Gomero, J. C. M. (2008). Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial*, (26), 175–199. Doi:ISSN 1025-9929
30. Srivastava, P., & Malviya, R. (2011). Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - an overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(1), 10–18.
31. Veloso, F. (2011). Evaluación de un agente dispersante y una dispersión sólida, sobre la liberación de albendazol desde sistemas matriciales lipídicos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Chile.
32. Viscasillas, A. (2008). Aportación al diseño de un nuevo excipiente tipo

“Coprocessed Product ” para compresión directa, 25–31.

33. Viseras, M. (2008). Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico con halloysita. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, 1–65.

GLOSARIO

Formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM): preparaciones en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas, es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía. ⁽²²⁾

Excipientes: sustancias, aparte de los principios activos, adecuadamente evaluadas en su seguridad he incluidas en un sistema de administración de fármacos, ya sea para ayudar en su procesado, elaboración, protección, soporte, mejora de la estabilidad, biodisponibilidad, aceptación por parte de paciente, ayudar en la identificación del producto, o realzar cualquier otra cualidad de la seguridad y de la eficacia del conjunto durante el almacenamiento o uso de las formas farmacéuticas. ⁽³²⁾

Mesocarpo: Constituye la sección intermedia del futo, en algunos es carnoso, generalmente es la región comestible. ⁽¹¹⁾

Hidrólisis: Es un proceso mediante el cual se descompone el agua en sus elementos constituyentes hidrógeno y oxígeno, por acción de la corriente eléctrica o se rompe una molécula por la acción del agua. ⁽¹⁾

Pectina grado farmacéutico: Toda pectina obtenida que cumple con estándares de calidad USP. ⁽¹⁾

Protopectina: Es una matriz de sustancia péptica que por hidrólisis da lugar a la pectina o al ácido pectínico. Protopectina es el término utilizado para describir las sustancias pépticas insolubles en agua encontradas en los tejidos vegetales y de las cuales se forman las sustancias pépticas solubles. ⁽¹⁾

Ácido galacturónico: El ácido D-galacturónico es un monosacárido de 6 átomos de carbono correspondiente a la forma oxidada de la D-galactosa, por lo que también. Pertenece al grupo de los azúcares ácidos. Es el principal componente de las pectinas, donde puede encontrarse en forma de ácido poligalacturónico. Presenta un grupo aldehído en el carbono 1 y un grupo carboxilo en el carbono 6. ⁽¹⁾

Valoración de saponificación: La saponificación es una reacción química entre un ácido graso (o un lípido saponificable, portador de residuos de ácidos grasos) y una base o álcali, en la que se obtiene como principal producto la sal de dicho ácido y de dicha base. Estos compuestos tienen la particularidad de ser anfipáticos, es decir tienen una parte polar y otra apolar (o no polar), con lo cual pueden interactuar con sustancias de propiedades dispares.⁽⁵⁾

Nomograma: Representación gráfica que permite realizar con rapidez cálculos numéricos aproximados.⁽³⁾

ANEXOS

ANEXO N° 1

MONOGRAFÍA DE RIBOFLAVINA SEGÚN USP 37/ NF 32

- I_u = fluorescence of the *Sample solution*
 I_s = fluorescence of the *Standard solution*
 C_s = concentration of USP Riboflavin RS in the *Standard solution* ($\mu\text{g/mL}$)
 C_u = concentration of Riboflavin in the *Sample solution* ($\mu\text{g/mL}$)

Acceptance criteria: 98.0%–102.0% on the dried basis

IMPURITIES

- **RESIDUE ON IGNITION (281):** NMT 0.3%

- **LIMIT OF LUMIFLAVIN**

Alcohol-free chloroform: Shake 20 mL of chloroform gently but thoroughly with 20 mL of water for 3 min, draw off the chloroform layer, and wash twice more with 20-mL portions of water. Finally, pass the chloroform through a dry filter paper, and shake it for 5 min with 5 g of powdered anhydrous sodium sulfate. Allow the mixture to stand for 2 h, and decant or filter the clear chloroform.

Sample solution: Shake 25 mg of Riboflavin with 10 mL of *Alcohol-free chloroform* for 5 min, and filter.

Blank: Alcohol-free chloroform

Instrumental conditions

(See *Spectrophotometry and Light-Scattering (851)*.)

Analytical wavelength: 440 nm

Cell: 1 cm

Analysis

Samples: *Sample solution* and *Blank*

Measure the absorbances of the *Sample solution* and *Blank*. Correct the absorbance of the *Sample solution* with that of the *Blank*.

Acceptance criteria: Absorbance is NMT 0.025.

SPECIFIC TESTS

- **OPTICAL ROTATION, Specific Rotation (7815)**

Sample solution: 5 mg/mL in 0.05 M carbonate-free sodium hydroxide

Analysis: Measure the specific rotation within 30 min of preparation.

Acceptance criteria: -115° to -135°

- **LOSS ON DRYING (731):** Dry 500 mg at 105° for 2 h. It loses NMT 1.5% of its weight.

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight, light-resistant containers
- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**
USP Riboflavin RS

Riboflavin Injection

» Riboflavin Injection is a sterile solution of Riboflavin in Water for Injection. It contains not less than 95.0 percent and not more than 120.0 percent of the labeled amount of $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$. It may contain niacinamide or other suitable solubilizers.

Packaging and storage—Preserve in light-resistant, in single-dose or in multiple-dose containers, preferably of Type I glass.

USP Reference standards (11)—

USP Riboflavin RS
USP Endotoxin RS

Identification—It responds to the *Identification* test under *Riboflavin*.

Bacterial endotoxins (85)—It contains not more than 7.1 USP Endotoxin Units per mg of riboflavin.

pH (791): between 4.5 and 7.0.

Other requirements—It meets the requirements under *Injections (1)*.

Assay—Dilute an accurately measured volume of not less than 1 mL of Injection to make a solution containing approximately 0.1 μg of riboflavin per mL. Using this as the *Assay Preparation*, proceed as directed under *Riboflavin Assay (481)*. Calculate the quantity, in mg, of $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ in each mL of the Injection taken by the formula:

$$C(A/B)$$

in which C is the concentration, in mg per mL, of $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ obtained for the *Assay Preparation*, A is the test specimen dilution volume, in mL, and B is the volume, in mL, of Injection taken.

Riboflavin Tablets**DEFINITION**

Riboflavin Tablets contains NLT 95.0% and NMT 115.0% of the labeled amount of riboflavin ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$).

ASSAY

- **RIBOFLAVIN ASSAY (481)**

Assay preparation: Transfer a portion of the powder from NLT 20 finely powdered Tablets, equivalent to 20 mg of riboflavin, to a 250-mL flask, and add 150 mL of 0.1 N hydrochloric acid. Shake vigorously, and wash down the sides of the flask with sufficient 0.1 N hydrochloric acid to ensure that the pH remains below 1.5 during the subsequent period of heating. Heat the mixture on a steam bath, with frequent agitation, until the riboflavin has dissolved, or in an autoclave at 121° for 30 min. Cool, and with vigorous agitation, adjust the mixture with 1 N sodium hydroxide to a pH of 5–6. Transfer to a 1000-mL volumetric flask, and dilute with water to volume. If the solution is not clear, filter through paper known not to adsorb riboflavin. Dilute an aliquot of the clear solution with water to a final volume that contains 0.1 μg /mL of riboflavin.

Analysis: Proceed as directed in the chapter. Calculate the percentage of the labeled amount of riboflavin ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$) in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (I_u/I_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

I_u = corrected fluorescence value from the *Assay preparation*

I_s = corrected fluorescence value from the *Standard Preparation*

C_s = concentration of USP Riboflavin RS in the *Standard Preparation* ($\mu\text{g/mL}$)

C_u = nominal concentration of riboflavin in the *Assay preparation* ($\mu\text{g/mL}$)

Acceptance criteria: 95.0%–115.0%

PERFORMANCE TESTS

- **DISSOLUTION (711)**

Medium: Water; 900 mL

Apparatus 2: 50 rpm

Time: 45 min

Standard solution: Known concentration of USP Riboflavin RS in *Medium*

Sample solution: Filtered portion of the solution under test, suitably diluted with the *Medium* if necessary

Mobile phase: A mixture of methanol, glacial acetic acid, and water (27:1:73) containing 1.40 mg/mL of sodium 1-hexanesulfonate

Chromatographic system(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

Mode: LC

Detector: UV 280 nm

Column: 3.9-mm × 30-cm; packing L1

Flow rate: 1 mL/min

Injection size: 10 µL

System suitability

Sample: Standard solution

Suitability requirements

Relative standard deviation: NMT 3.0%

Analysis

Samples: Standard solution and Sample solution

Calculate the percentage of the labeled amount of riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆) dissolved:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S \times D \times V/L) \times 100$$

r_U = peak area of riboflavin from the Sample solutionr_S = peak area of riboflavin from the Standard solutionC_S = concentration of USP Riboflavin RS in the Standard solution (mg/mL)

D = dilution factor for the Sample solution

V = volume of Medium, 900 mL

L = label claim (mg/Tablet)

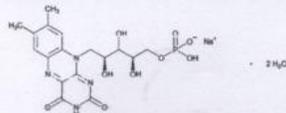
Tolerances: NLT 75% (Q) of the labeled amount of riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆) is dissolved.

- **UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS (905):** Meet the requirements

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight, light-resistant containers.

- **USP REFERENCE STANDARDS (11):** USP Riboflavin RS

Riboflavin 5'-Phosphate SodiumC₁₇H₂₀N₄NaO₉P · 2H₂O

514.36

C₁₇H₂₀N₄NaO₈P

478.33

Riboflavin 5'-(dihydrogen phosphate), monosodium salt,

dihydrate;

Riboflavine 5'-(sodium hydrogen phosphate), dihydrate

Anhydrous [130-40-5].

DEFINITIONRiboflavin 5'-Phosphate Sodium contains NLT the equivalent of 73.0% and NMT the equivalent of 79.0% of riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆), calculated on the dried basis.**IDENTIFICATION**

- **A. COLOR AND FLUORESCENCE OF SOLUTION**

Sample solution: 0.01 mg/mL in water

Analysis: Alternately expose to transmitted light and long-wavelength UV light.

Acceptance criteria: The solution is pale greenish yellow by transmitted light, and it exhibits an intense yellowish green fluorescence by reflected light under long-wavelength UV light that disappears upon the addition of mineral acids or alkalis.

- **B. IDENTIFICATION TESTS—GENERAL, Sodium (191) and Phosphate (191)**

Sample solution: To 0.5 g add 10 mL of nitric acid.

Evaporate the mixture on a water bath to dryness, and ignite the residue until the carbon is removed. Dissolve the residue in 5 mL of water, and filter.

Acceptance criteria: The Sample solution meets the requirements.

ASSAY

- **PROCEDURE**

[NOTE—Conduct the assay so that all solutions are protected from actinic light at all stages, preferably by using low-actinic glassware.]

Standard solution: 0.35 µg/mL prepared as follows.

Transfer 35 mg of USP Riboflavin RS to a 250-mL conical flask. Add 20 mL of pyridine and 75 mL of water, and dissolve the riboflavin by frequent shaking. Transfer the solution to a 1000-mL volumetric flask, and dilute with water to volume. Transfer 10.0 mL of this solution to a second 1000-mL volumetric flask, add sufficient 0.1 N sulfuric acid (about 4 mL) so that the final pH of the solution is between 5.9 and 6.1, and dilute with water to volume.

Sample solution: Transfer 50 mg of Riboflavin 5'-Phosphate Sodium to a 250-mL conical flask. Add 20 mL of pyridine and 75 mL of water, and dissolve the riboflavin by frequent shaking. Transfer the solution to a 1000-mL volumetric flask, and dilute with water to volume. Transfer 10.0 mL of this solution to a second 1000-mL volumetric flask, add sufficient 0.1 N sulfuric acid (about 4 mL) so that the final pH of the solution is between 5.9 and 6.1, and dilute with water to volume.

Blank: Proceed as directed in the Analysis, omitting the test specimen.

Instrumental conditions(See *Spectrophotometry and Light-Scattering* (851).)

Mode: Fluorescence

Excitation wavelength: 440 nm

Emission wavelength: 530 nm

Analysis

Samples: Standard solution, Sample solution, and Blank

Determine the maximum fluorescence intensities of the solutions against the Blank.

Calculate the percentage of riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆) in the portion of Riboflavin 5'-Phosphate Sodium taken:

$$\text{Result} = (I_U/I_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

I_U = fluorescence intensity from the Sample solutionI_S = fluorescence intensity from the Standard solutionC_S = concentration of USP Riboflavin RS in the Standard solution (µg/mL)C_U = concentration of Riboflavin 5'-Phosphate Sodium in the Sample solution (µg/mL)

Acceptance criteria: 73.0%–79.0% on the dried basis

IMPURITIES

- **FREE PHOSPHATE**

Acid molybdate solution: Prepare a 70-mg/mL solution of ammonium molybdate in water. Dilute 25 mL of this solution with water to 200 mL. To this dilution slowly add 25 mL of 7.5 N sulfuric acid.

Ferrous sulfate solution: 100 mg/mL of ferrous sulfate in 0.15 N sulfuric acid, prepared just before use

Standard solution: 44.0 µg/mL of monobasic potassium phosphate in water.

Sample solution: 3 mg/mL of Riboflavin 5'-Phosphate Sodium in water

Blank: Water

ANEXO N° 2
MONOGRAFÍA DE PECTINA SEGÚN USP 37/ NF 32

Chromatographic system—Proceed as directed in the Assay, except to chromatograph the *Standard solution*.

Procedure—Separately inject equal volumes (about 20 μ L) of a portion of the solution under test, previously passed through a suitable 0.45- μ m membrane filter, and the *Standard solution* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the responses for the major peaks. Calculate the quantity of $C_{19}H_{20}FNO_3$ dissolved based on the peak responses obtained from the solution under test and the *Standard solution*.

Tolerances—Not less than 80% (Q) of the labeled amount of $C_{19}H_{20}FNO_3$ is dissolved in 60 minutes.

Uniformity of dosage units (905): meet the requirements.

PROCEDURE FOR CONTENT UNIFORMITY—

Buffer solution, Mobile phase, and Chromatographic system—Proceed as directed in the Assay.

Standard solution—Use the *Standard preparation*, prepared as directed in the Assay.

Test solution—Place 1 Tablet in a suitable volumetric flask, and add a volume of a hydrochloric acid solution (7 in 1000), equivalent to about 25% of the flask volume. Allow the Tablet to disintegrate, dilute with methanol to volume, and mix to obtain a solution containing about 0.1 mg of paroxetine per mL. Centrifuge a portion of the solution.

Procedure—Proceed as directed in the Assay. Calculate the quantity, in mg, of $C_{19}H_{20}FNO_3$ in the Tablet taken by the formula:

$$VC_s (329.37/365.83)(r_u / r_s)$$

in which V is the volume of the flask used; C_s is the concentration, in mg per mL, of USP Paroxetine Hydrochloride RS in the *Standard solution*; 329.37 and 365.83 are the molecular weights for paroxetine and paroxetine hydrochloride, respectively; and r_u and r_s are the peak responses obtained from the *Test solution* and the *Standard solution*, respectively.

Assay—

Buffer solution—Prepare a mixture of water, phosphoric acid, and triethylamine (100:0.6:0.3).

Mobile phase—Prepare a filtered and degassed mixture of *Buffer solution* and acetonitrile (7:3). Make adjustments if necessary (see *System Suitability under Chromatography* (621)).

Standard preparation—Dissolve an accurately weighed quantity of USP Paroxetine Hydrochloride RS in methanol, and dilute quantitatively, and stepwise if necessary, with methanol to obtain a solution having a known concentration of about 0.1 mg per mL.

Assay preparation—Weigh and finely powder not fewer than 20 Tablets. Transfer an accurately weighed portion of the powder, equivalent to about 100 mg of paroxetine, to a 200-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with methanol to volume, and mix. Centrifuge a portion of this solution for 6 minutes. Transfer 20 mL of the supernatant to a 100-mL volumetric flask, dilute with methanol to volume, and mix.

Chromatographic system (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 295-nm detector and a 4.6-mm \times 3.3-cm column that contains 3- μ m packing L7. The flow rate is about 2.0 mL per minute. Chromatograph the *Standard preparation*, and record the peak responses as directed for *Procedure*: the column efficiency is not less than 750 theoretical plates; the tailing factor is not more than 4; and the relative standard deviation for replicate injections is not more than 2.0%.

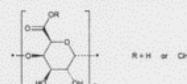
Procedure—Separately inject equal volumes (about 5 μ L) of the *Standard preparation* and the *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the responses for the major peaks. Calculate the quan-

ty, in percent of tablet label claim, of paroxetine ($C_{19}H_{20}FNO_3$) in the portion of Tablets taken by the formula:

$$100(C_s / C_u)(329.37/365.83)(r_u / r_s)$$

in which C_s is the concentration, in mg per mL, of USP Paroxetine Hydrochloride RS in the *Standard preparation*; C_u is the nominal concentration of paroxetine, in mg per mL, based on the tablet label claim, in the *Assay preparation*; 329.37 and 365.83 are the molecular weights for paroxetine and paroxetine hydrochloride, respectively; and r_u and r_s are the peak responses obtained from the *Assay preparation* and the *Standard preparation*, respectively.

Pectin



Pectin [9000-69-5].

DEFINITION

Pectin is a purified carbohydrate polymer consisting mainly of a linear backbone of partially methoxylated alpha (1-4) linked D-galacturonic acid. It is obtained from the dilute acid extract of the rind of citrus fruits or from apple pomace. No organic solvents other than methanol, ethanol, and isopropanol are used during its production. Pectin yields NLT 74.0% of galacturonic acid ($C_6H_{10}O_7$), calculated on the dried basis.

[NOTE—Commercial pectin for the production of jellied food products is standardized to the convenient "150 jelly grade" by addition of dextrose or other sugars, and sometimes contains sodium citrate or other buffer salts. This monograph refers to the pectin to which no such additions have been made.]

IDENTIFICATION

PROCEDURE

Sample stock solution: Transfer a quantity of Pectin, equivalent to 0.05 g on the dried basis, to a suitable container, and moisten with 250 μ L of 2-propanol. Add 50 mL of water to the container, and mix the solution using a magnetic stirrer. Use 0.5 N sodium hydroxide to adjust the pH of the solution to 12, stop the stirrer, and allow the solution to stand undisturbed at room temperature for 15 min. Adjust with 0.5 N hydrochloric acid to a pH of 7.0, and dilute with water to 100 mL.

Tris buffer solution: Transfer 6.055 g of tris(hydroxymethyl)aminomethane and 0.147 g of calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) to a 1000-mL volumetric flask containing 950 mL of water. Adjust with 1 N hydrochloric acid to a pH of 7.0, and dilute with water to volume.

Enzyme solution: Mix pectate lyase¹ with *Tris buffer solution* to make a solution (1 in 100).

Sample blank: Mix 0.5 mL of *Tris buffer solution*, 1.0 mL of *Sample stock solution*, and 1.0 mL of water in a quartz cuvette.

Enzyme blank: Mix 0.5 mL of *Tris buffer solution*, 1.5 mL of water, and 0.5 mL of *Enzyme solution* in a quartz cuvette.

Sample solution: Mix 0.5 mL of *Tris buffer solution*, 1.0 mL of *Sample stock solution*, 0.5 mL of water, and 0.5 mL of *Enzyme solution* in a quartz cuvette.

¹ A suitable pure enzyme is available from Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland (www.megazyme.com).

Analysis

Samples: Sample blank, Enzyme blank, and Sample solution

Perform the test with the Samples using a suitable UV/visible spectrophotometer (see *Spectrophotometry and Light-Scattering* (851)) and using water as a blank. Measure the absorbance at 235 nm immediately after mixing the solutions well, and record the value at time 0 for the Enzyme blank, A_{0-EB} ; for the Sample blank, A_{0-TB} ; and for the Sample solution, A_{0-TS} . After incubation at room temperature for 10 min, determine the absorbance again at 235 nm for the Enzyme blank, A_{10-EB} ; for the Sample blank, A_{10-TB} ; and for the Sample solution, A_{10-TS} . Calculate the corrected absorbance A_0 at time 0 and the corrected absorbance A_{10} at 10 min:

$$A_0 = A_{0-TS} - (A_{0-EB} + A_{0-TB})$$

$$A_{10} = A_{10-TS} - (A_{10-EB} + A_{10-TB})$$

Calculate the quantity of unsaturated product produced:

$$\text{Result} = (A_{10} - A_0) / (\epsilon_{235} \times L)$$

ϵ_{235} = molar extinction coefficient of the reaction product ($4600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

L = path length of the reaction cuvette, 1 cm

Acceptance criteria: The amount of unsaturated product is NLT 0.5×10^{-3} M.

ASSAY**• DEGREE OF ESTERIFICATION**

Sample: 5.0 g

Analysis: Transfer the Sample to a suitable beaker, and stir for 10 min with a mixture of 5 mL of hydrochloric acid and 100 mL of 60% alcohol. Transfer to a sintered-glass filter (30- to 60-mL crucible or Büchner type, coarse), and wash with six 15-mL portions of the hydrochloric acid–60% alcohol mixture, followed by 60% alcohol until the filtrate is free from chlorides. Finally wash with 20 mL of alcohol, dry for 1 h at 105° , cool, and weigh. Transfer exactly one-tenth of the total net weight of the dried Sample (representing 500 mg of the original unwashed Sample) to a 250-mL conical flask, and moisten with 2 mL of alcohol. Add 100 mL of carbon dioxide-free water, insert the stopper, and swirl occasionally until the Pectin is completely dissolved. Add 5 drops of phenolphthalein TS, and titrate with 0.1 N sodium hydroxide VS. Perform a blank determination, and make any necessary correction. Record the results as the initial titer, V_i (mL). Add 20.0 mL of 0.5 N sodium hydroxide VS, insert the stopper, shake vigorously, and allow to stand for 15 min. Add 20.0 mL of 0.5 N hydrochloric acid VS, and shake until the pink color disappears. Add phenolphthalein TS, and titrate with 0.1 N sodium hydroxide VS to a faint pink color that persists after vigorous shaking. Perform a blank determination, and make any necessary correction. Record this value as the saponification titer, V_s (mL). Calculate the degree of esterification:

$$\text{Result} = [V_s / (V_i + V_s)] \times 100$$

V_s = saponification titer (mL)

V_i = initial titer (mL)

Acceptance criteria: The value for Degree of Esterification is within the range stated on the label.

- **GALACTURONIC ACID:** Each mL of 0.1 N sodium hydroxide used in the total titration (the initial titer added to the saponification titer) in the Assay for Degree of Esterification is equivalent to 19.41 mg of $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$. Calculate the per-

centage of galacturonic acid in the portion of Pectin taken:

$$\text{Result} = 19.41 \times [(V_i + V_s) / W] \times 100$$

V_i = initial titer (mL)

V_s = saponification titer (mL)

W = weight of the original unwashed and dried Pectin taken to prepare the solution for titration (mg)

Acceptance criteria: NLT 74.0%

- **METHOXY GROUPS:** Each mL of 0.1 N sodium hydroxide used in the saponification titer in the Assay for Degree of Esterification is equivalent to 3.10 mg of $-\text{OCH}_3$. Calculate the percentage of methoxy groups in the portion of Pectin taken:

$$\text{Result} = 3.10 \times (V_s / W) \times 100$$

V_s = saponification titer (mL)

W = weight of the original unwashed and dried Pectin taken to prepare the solution for titration (mg)

Acceptance criteria: The percentage of methoxy groups is within the range stated on the label.

IMPURITIES

- **ARSENIC, Method II (211):** NMT 3 ppm

• **LEAD**

Standard stock solution: 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lead. [NOTE—Use a commercially available certified solution.]

Standard solution: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lead, prepared immediately before use by pipetting 0.10 mL of Standard stock solution into a 50-mL volumetric flask containing 30 mL of water, 4 mL of 20% hydrochloric acid, and 4 mL of 0.1 M EDTA. Dilute with water to volume, and mix.

Reference solution: 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lead, prepared by pipetting 5.0 mL of the Standard solution into a 25-mL volumetric flask containing 10 mL of water, 2 mL of 20% hydrochloric acid, and 2 mL of 0.1 M EDTA. Dilute with water to volume, and mix.

Sample solution: Transfer 2.0 g of Pectin to a clean, 100-mL glass beaker, add 25 mL of 70% nitric acid, cover with a watch glass, and heat at low to moderate heat on a hot plate in a fume hood for 2 h. Remove the watch glass, and continue to heat until the sample is dry with no visible fumes. Add 0.5 mL of 70% nitric acid, and heat to dryness. Cool to room temperature, and add 2 mL of 20% hydrochloric acid and 2 mL of 0.1 M EDTA. Quantitatively transfer the solution to a 25-mL volumetric flask, dilute with water to volume, and mix.

Blank solution: Add 30 mL of water, 4 mL of 20% hydrochloric acid, and 4 mL of 0.1 M EDTA into a 50-mL volumetric flask. Dilute with water to volume, and mix.

Analysis: Lead is determined using an inductively coupled plasma–atomic emission spectrometer (ICP–AES) (see *Plasma Spectrochemistry* (730)) by measuring the emission at 220.35 nm with the settings optimized as directed by the manufacturer. Instrument performance must be verified to conform to the manufacturer's specifications for resolution and sensitivity. Before analyzing samples, the instrument must pass a suitable performance check. Calibrate the instrument with the Blank solution and the Standard solution. Then analyze the Reference solution and the Sample solution.

Acceptance criteria: The concentration in the Sample solution is NMT that in the Reference solution, corresponding to NMT 5 ppm of lead.

- **SULFUR DIOXIDE, Method V (525)**

Sample: 100 g

Analysis: Suspend the Sample in 500 mL of methanol, then transfer this mixture to the flask (C). Prepare a mixture of 20 mL of hydrochloric acid and 10 mL of water, and transfer it to the separatory funnel (B). Add

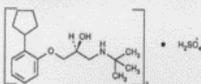
- **LOSS ON DRYING (731)**
Analysis: Dry a sample at 105° for 3 h.
Acceptance criteria: NMT 10.0%

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight containers. Store in a cool and dry place.
- **LABELING:** Label it to indicate whether it is of apple or of citrus origin. Label it to indicate the range of the degree of esterification and the range of the percentage of methoxy groups. The labeling also indicates the presence of sulfur dioxide if the residual sulfur dioxide concentration is greater than 10 ppm.

Change to read:**USP REFERENCE STANDARDS (11)**

- ▲ **USP 2-Butanol RS**
- USP Methyl Alcohol RS
- USP 2-Propanol RS

Penbutolol Sulfate

- (C₁₈H₂₉NO₂)₂ · H₂SO₄ 680.94
 2-Propanol, 1-(2-cyclopentylphenoxy)-3-[(1,1-dimethylethyl)amino]-, (S)-, sulfate (2:1) (salt).
 (S)-1-(tert-Butylamino)-3-(o-cyclopentylphenoxy)-2-propanol sulfate (2:1) (salt) [38363-32-5].

» Penbutolol Sulfate contains not less than 98.0 percent and not more than 102.0 percent of (C₁₈H₂₉NO₂)₂ · H₂SO₄, calculated on the anhydrous basis.

Packaging and storage—Preserve in tight, light-resistant containers.

USP Reference standards (11)—
 USP Penbutolol Sulfate RS

Identification—

- A: *Infrared Absorption* (197M).
 B: A solution (10 mg per mL) responds to the tests for Sulfate (191).

Loss on drying (731)—Dry it at 105° for 3 hours: it loses not more than 1.0% of its weight.

Residue on ignition (281): not more than 0.2%.

Specific rotation (7815): between −22° and −26°, determined at 20°.

Test solution: 10 mg per mL, in methanol.

Chromatographic purity—

Organic phase—Prepare a mixture of methanol and acetonitrile (610:390). Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Aqueous phase—Dissolve 11 g of sodium 1-heptanesulfonate in 1000 mL of water, add 5.0 mL of triethylamine, adjust with phosphoric acid to a pH of 2.70 ± 0.05, and filter through a filter having a porosity of 0.5 μm or finer. Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Solvent mixture—Prepare a mixture of *Organic phase* and *Aqueous phase* (600:400).

Test solution—Transfer about 50 mg of Penbutolol Sulfate to a 25-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with *Solvent mixture* to volume, and mix.

Diluted test solution—Transfer 1.0 mL of the *Test solution* to a 100-mL volumetric flask, dilute with *Solvent mixture* to volume, and mix.

Chromatographic system (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 271-nm detector, a preinjection guard column that contains packing L4, and a 4.6-mm × 25-cm analytical column that contains packing L1 and is maintained at a constant temperature between ambient and 40°, and is programmed to provide variable mixtures of *Organic phase* and *Aqueous phase*. Before each injection, the system is equilibrated with a mobile phase consisting of a mixture of 60% *Organic phase* and 40% *Aqueous phase*. After each injection, this composition of the mobile phase is maintained for 15 minutes, then the proportion of *Organic phase* is increased linearly over the next 20 minutes so that the mobile phase consists of 80% *Organic phase* and 20% *Aqueous phase*. The proportion of *Organic phase* is then decreased to 60% over 1 minute. The flow rate is about 1 mL per minute. Chromatograph the *Diluted test solution*, and record the peak responses as directed for *Procedure*: the resolution, *R*, between the penbutolol peak and any impurity peak is not less than 1.5, and the tailing factor is not more than 2, when calculated by the formula:

$$W_{0.1} / 2f$$

in which *W*_{0.1} is the width of the peak at 10% of peak height.

Procedure—[NOTE—Use peak areas where peak responses are indicated.] Separately inject equal volumes (about 20 μL) of the *Solvent mixture*, the *Test solution*, and the *Diluted test solution* into the chromatograph, and measure the peak responses for all the peaks. Calculate the percentage of each individual impurity in the Penbutolol Sulfate taken by the formula:

$$r_i / r_D$$

in which *r*_i is the peak response for an individual impurity in the chromatogram of the *Test solution*, and *r*_D is the penbutolol peak response obtained from the *Diluted test solution*: not more than 1.2% of any impurity is found.

Assay—

Organic phase—Prepare a mixture of methanol and acetonitrile (610:390). Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Aqueous phase—Dissolve 11 g of sodium 1-heptanesulfonate in 1000 mL of water, add 5.0 mL of triethylamine, adjust with phosphoric acid to a pH of 2.70 ± 0.05, and filter through a filter having a porosity of 0.5 μm or finer. Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Mobile phase—Prepare a mixture of *Organic phase* and *Aqueous phase* (650:350). Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Internal standard solution—Prepare a solution of 3,4-dimethylbenzophenone in *Mobile phase* containing about 0.01 mg per mL.

Standard preparation—Transfer about 24 mg of USP Penbutolol Sulfate RS, accurately weighed, to a 100-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with *Internal standard solution* to volume, and mix.

Assay preparation—Transfer about 24 mg of Penbutolol Sulfate, accurately weighed, to a 100-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with *Internal standard solution* to volume, and mix.

Chromatographic system (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 271-nm detector

ANEXO N° 3. VOUCHER DE LA IDENTIFICACIÓN DE *Citrus aurantium*



MINISTERIO
DE CULTURA

Ingeniero Sergio Armando Maravilla
Jefe Químico y Profesor Universitario III
Presente

Por este medio hago constar que la muestra recolectada en la Finca la Ilusión, Cantón Santa Rita Almendro, Municipio Santiago Nonualco, Departamento La Paz, en fecha 16 de febrero de 2019, por Claudia Grande Coreas y Juana Cecilia Romero Hernández, con características de Árbol de 3mt. Frutos maduros, en la cual se incluye la nota: Injerto de Naranja valencia en naranja agría. Con dicha información y al examinar la muestra se determina que pertenece a la especie *Citrus aurantium* L. de la familia Rutaceae, la cuál será depositada en la colección nacional del herbario MHES del Museo de Historia Natural de El Salvador, bajo el número de Voucher J. Menjívar *et al* 5142.

Para los usos que estime conveniente se extiende la presente constancia de identificación de muestra botánica a los 14 días de octubre del año 2019.

Licda. Jenny Menjívar
Curadora Herbario MHES

Coordinadora Colecciones de Historia Natural MUHNES.



ANEXO N° 4
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Cristalería

- Balón volumétrico de 2000.0 mL y 1000mL
- Balón volumétrico de 500.0, 100.0 y 10.0 mL
- Beakers de 500mL, 1000 mL y 2000 mL
- Agitadores de vidrio

Equipo

pH – metro

-Balanza analítica

-Estufa

-Desecador

-Ultrasonido

Reactivos

-Hidróxido de Sodio

-Fosfato monobásico de potasio

- Fenolftaleína

-Ácido clorhídrico concentrado

-Cloruro de potasio

-Agua desmineralizada y agua libre de CO₂

-Solución Amortiguadora de Ácido Clorhídrico (pH 1.2)

Colocar 250 mL de la solución de cloruro de potasio 0.2M en un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 425mL de la solución de ácido clorhídrico 0.2M, con un pH-metro corroborar que el pH de la solución sea de 1.2 si no lo es agregar gota a gota más solución de ácido clorhídrico 0.2M hasta llegar al pH deseado, luego llevar aforo con agua.

-Cloruro de Potasio, 0,2 M

Disolver 14,91 g de cloruro de potasio (KCl) en agua y diluir con agua hasta 1L.

-Ácido clorhídrico 0.2M

Colocar en un balón de 1000mL aproximadamente 500mL de agua y adicionar ácido clorhídrico concentrado 1.67 mL (realizar cálculo según porcentaje de pureza del ácido), llevar aforo con agua.

-Fenolftaleína SR

Disolver 1 g de fenolftaleína en 100 mL de alcohol.

-Hidróxido de sodio 0.5M

Colocar en un balón volumétrico de 1 L aproximadamente 500mL de agua libre de dióxido de carbono, adicionar a continuación exactamente 20 gramos de hidróxido de sodio en perlas y llevar a volumen con agua libre de dióxido de carbono.

-Hidróxido de sodio 0.2M

Colocar en un balón volumétrico de 1 L aproximadamente 500mL de agua libre de dióxido de carbono, adicionar a continuación exactamente 8 gramos de hidróxido de sodio en perlas y llevar a volumen con agua libre de dióxido de carbono.

- Buffer fosfato pH 7.6 (Fosfato de potasio monobásico)

PM = 136.09 g / mol y fórmula: KH_2PO_4

V = 1 litro

M = 0.2 M

Gramos = 1 Litro X 0.2 M X 136.09 g / mol = 27.22 g

Para obtener 2L de fosfato de potasio monobásico 0.2M: disolver 54.44g de Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en agua y llevar a volumen en un balón volumétrico de 2000.0 mL con el mismo solvente.

La USP establece las cantidades aproximadas de las soluciones que deben colocarse para la elaboración del buffer fosfato de potasio monobásico las cuales son:

Tabla N° 36. Cantidades de NaOH para la elaboración de buffer fosfato de potasio monobásico.

pH	Volumen de KH_2PO_4 0.2 M (mL)	Volumen de NaOH 0.2 M (mL)
6.8	50	23.60
7.0	50	29.54
7.2	50	34.90
7.4	50	39.34
7.6	50	42.74
7.8	50	45.17
8.0	50	46.85

Nota: estas expresiones las establece la USP para obtener soluciones de un volumen de 200mL.

En base a lo anterior se calcula el dato exacto en mL que debe colocarse de Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) e hidróxido de sodio para obtener 6000mL de solución de buffer fosfato para las disoluciones a realizar:

Cálculos respectivos:

Cantidad necesaria de solución de fosfato de potasio 0.2 M:

50.0 ml de s/n de Fosfato de potasio	→	200.0 ml Buffer Fosfato
X	→	6000.0 ml Buffer Fosfato

X= 1500.0 ml de fosfato de potasio monobásico al 0.2M

Cantidad específica de Hidróxido de sodio 0.2 M para obtener pH 7.6:

42.74 mL de NaOH 0.2M	→	200.0 mL Buffer Fosfato
X	→	6000.mL Buffer Fosfato

X=1282.2mL de NaOH 0.2M

Procedimiento de preparación de Buffer fosfato pH 7.6

1. Incorporar 1500.0 mL de fosfato monobásico 0.2M en un recipiente de capacidad de 6000.0mL
2. Medir 1282.2 ml de NaOH 0.2 M
3. Incorporar los 1282.2 mL de NaOH. 0.2 M al recipiente de 6000.0 mL de capacidad que contenga el fosfato y luego agitar.
4. Medir el pH con ayuda de un pH-metro previamente calibrado.
5. Luego ajustar el pH de la solución con NaOH 0.2 M hasta obtener un pH 7.6
6. Llevar aforo la solución con agua destilada.
8. Homogenizar y luego verificar pH.
9. Etiquetar y almacenar.

ANEXO N° 5
MATERIALES Y EQUIPOS

Cristalería

- Balón volumétrico de 500, 2000 y 1000 mL
- Balón volumétrico de 50, 100, 1000 mL
- Pipeta volumétrico 1 y 2 mL
- Probeta de 10, 25, 100 mL
- Papel filtro Whatman # 1
- Beaker de 250 mL
- Beakers de 500 mL
- Beakers de 1000 mL
- Agitadores de vidrio
- Jeringas de 10 mL
- Vidrio reloj.
- Espátula
- Tamiz

Equipo

- pH – metro
- Balanza semi- analítica
- Estufa
- Desecador
- Balanza analítica de 5 dígitos

- Disolutor Erweka DT6

-Espectrofotómetro ThermoFischer Scientific Genesys 10S UV-VIS.

-Baño ultrasonido VWR (Modelo 97043-988)

ANEXO N° 6.



Figura N° 25. Procedimiento general para la extracción de pectina.

ANEXO N° 7.

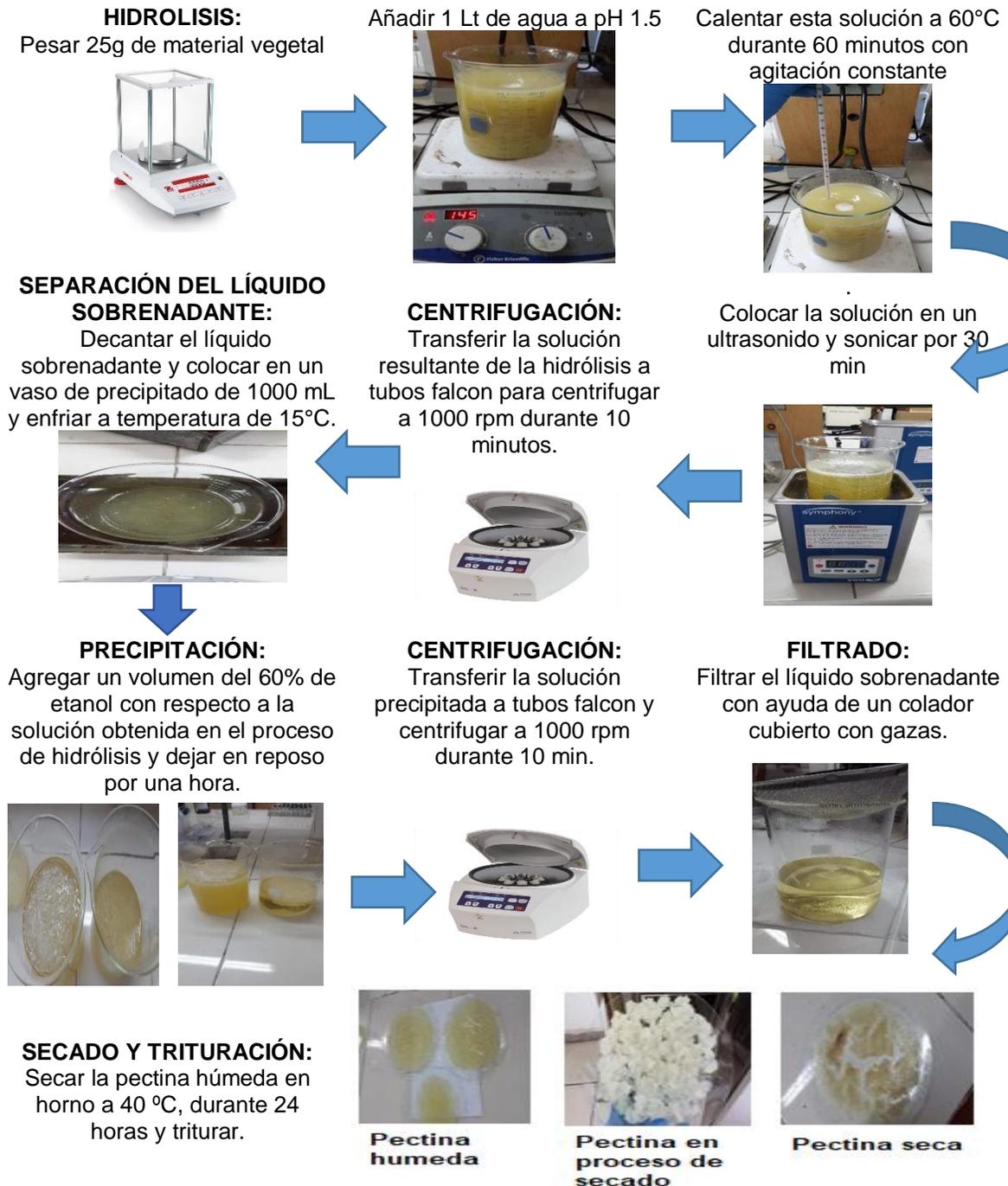


Figura N° 26. Procedimiento para la extracción de pectina (hidrólisis ácida).

ANEXO N° 8.

Calentar 1g de pectina con 9mL de agua.



Adicionar 10mL de etanol



Acidificar con ácido clorhídrico 3N y se mezclar.



A 5 mL de la solución de pectina, se agregó 1 mL de Hidróxido de Sodio 2N



Figura N° 27. Procedimiento para la prueba de identificación de las pectinas.

ANEXO N° 9.

Pesar 5.0g de pectina



Calentar la solución muestra por 10 minutos con ácido clorhídrico y filtrar



Lavar con 6 porciones con la mezcla (HCL y etanol)



Humedecer con 2 mL de alcohol y agregar 100 mL de agua



Pesar 3 muestras de 500mg de pectina



Lavar con 20 mL de alcohol y secar por una hora a 105 °C



5 gotas de fenolftaleína y titular con una solución de NaOH 0.1 N VS



Agregar 20 mL de NaOH 0.5 N. VS, dejar reposar 15 min



Agregar 20 mL de HCL 0.5 N VS



Agregar 3 gotas de fenolftaleína TS y valorar con solución de NaOH 0.1N VS



Figura N° 28. Procedimiento para la prueba de valoración de grupos metoxilo.

ANEXO N° 10.

Tarar las cápsulas de porcelana a 105°C por 30 min.



Dejar enfriar las cápsulas en un desecador por aproximadamente 15 min.



Pesar las cápsulas de porcelana (anotar su peso) y pesar 1 g de muestra



Pesar las cápsulas con la muestra seca y anotar el peso.



Transcurrido el tiempo de secado transferir las cápsulas con la muestra seca a un desecador.



Colocar las cápsulas en la estufa a 105°C por 3 horas.



Figura N° 29. Procedimiento para la realización de la prueba de pérdida por secado.

ANEXO N° 11.

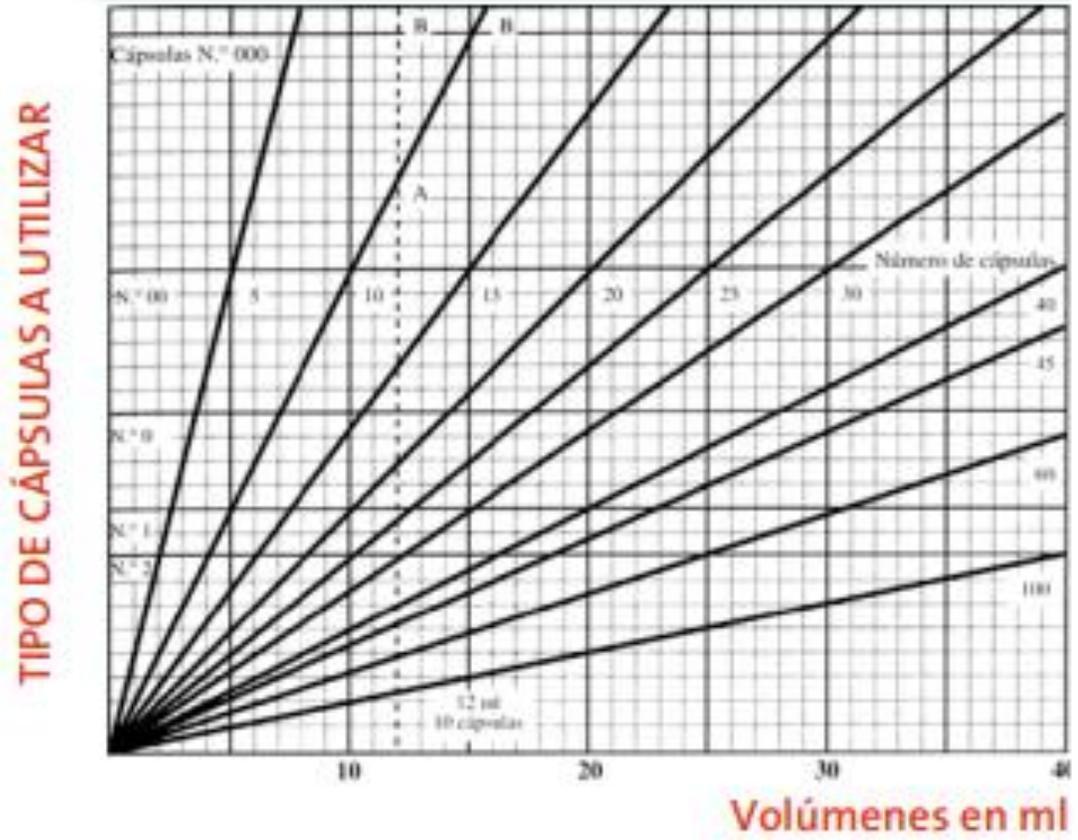


Figura N° 30. Nomograma para determinación del número de cápsula.

ANEXO N° 12.

Tabla N° 37. Determinación del tamaño de cápsulas.

Tamaño de cápsulas	Volumen (mL)	Masa (mg)
00	0.95	570 a 1140
0	0.60	400 a 816
1	0.50	300 a 600
2	0.37	222 a 444
 3	0.30	180 a 360
4	0.21	126 a 252

ANEXO N° 13.

Tabla N° 38. Diseño de viñeta utilizada para la identificación en los ensayos

Desarrollo de matrices	
Nombre del ensayo:	Liberación Retardada
Nombre del producto:	Riboflavina Pectina Starch 1500® PVP
Código de Matriz:	2 A
Ensayo realizado por:	Karla Jordán / Karen Fermán
Responsable del producto:	Ing. Sergio Armando Maravilla
Cantidad a pesar:	-----
Cantidad real pesada:	-----

ANEXO N° 14.

Pesar cada materia prima por separado (Riboflavina, Starch 1500, pvp, pectina extraída, pectina comercial), según la concentración a elaborar



Calentar agua destilada por 10 min hasta temperatura de 60°C, esta sirvió como aglutinante para todas las materias primas que forman la matriz.



Secar en la estufa a temperatura de 50 °C por 12 horas. Se obtiene una película de color naranja mate y consistencia aparentemente dura pero quebradiza al tacto.



Incorporar los componentes de menor a mayor cantidad sobre un vidrio reloj, adicionar el agua gota a gota con ayuda de una jeringa hasta obtener una mezcla color naranja brillante homogénea.



Disminuir el tamaño de partícula quebrando la matriz, triturar con un mortero y pistilo; por último homogenizar el tamaño de partícula haciendo pasar el polvo por un tamiz redondo Mesh # 50



Encapsular en una cápsula #3 el polvo homogéneo procurando que el peso del contenido en cada cápsula sea 250 ± 0.1 mg.



Figura N° 31. Procedimiento general para la elaboración de las matrices.

ANEXO N° 15.

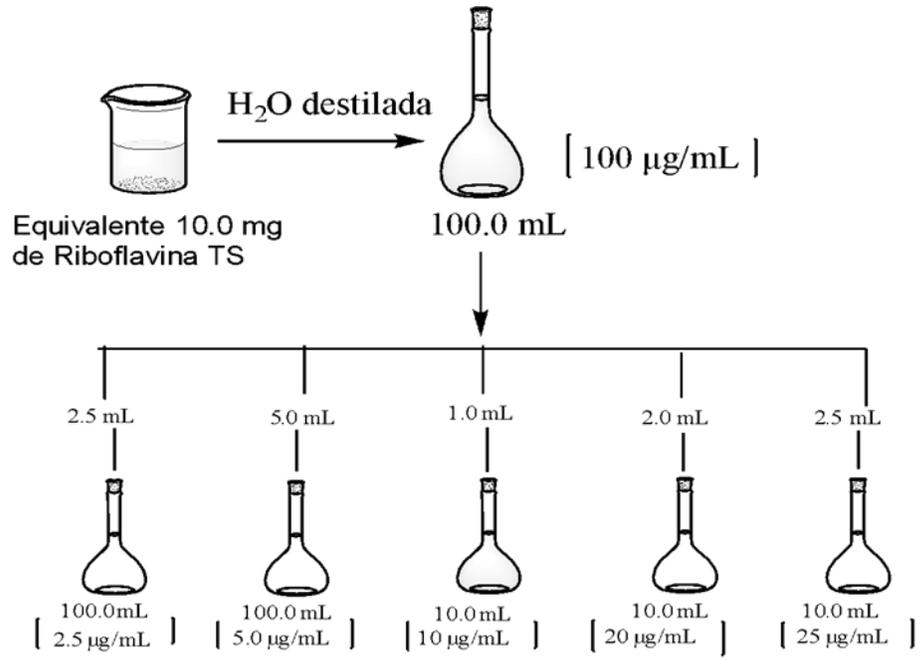


Figura N° 32. Cascada de dilución para la preparación del estándar de referencia.

ANEXO N° 16.



Figura N° 33. Esquema de prueba de disolución para las muestras.

pH of the gastrointestinal tract

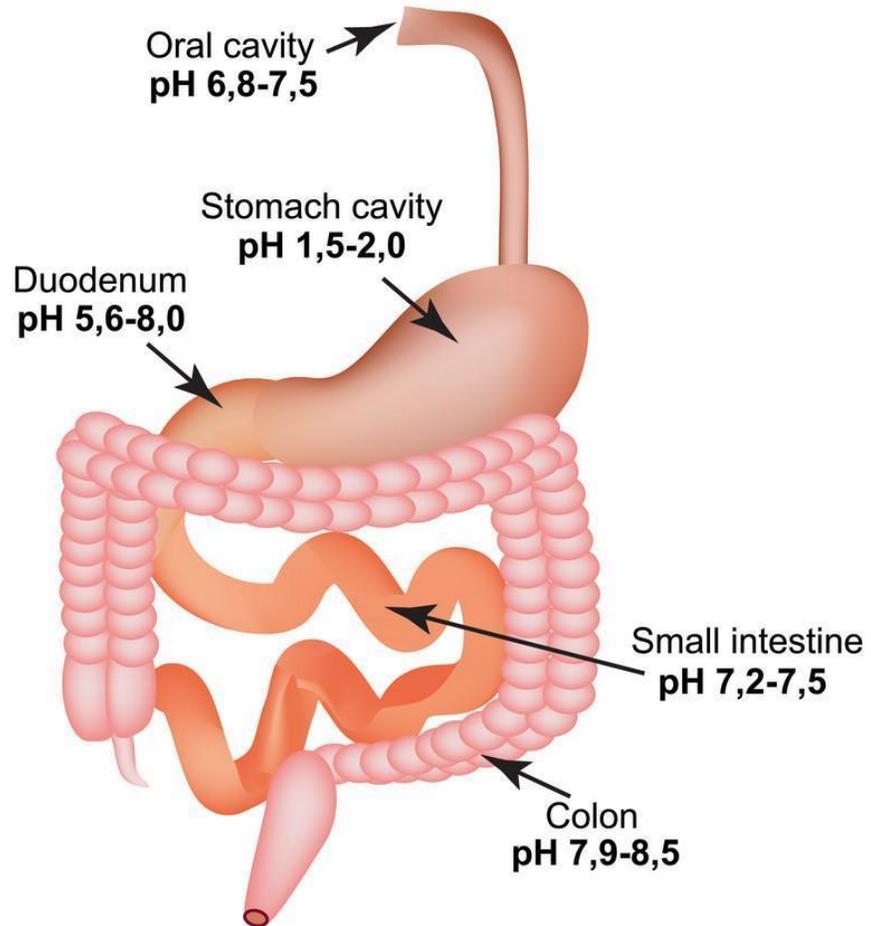


Figura N° 34. Ilustración del pH del tracto gastrointestinal.

ANEXO N° 18.

Tabla N° 39. Hoja de cálculo para la cuantificación de riboflavina.

HOJA DE CALCULO					
RIBOFLAVINA					
MEDIO DE DISOLUCION:	AGUA DESTILADA				
MUESTRAS:	Matriz 1A				
pH:	6.2				
EJEMPLO DE CALCULO:					
PARAMETRO	UNIDADES				
Abs. Mx	0.3980	-----			
Abs. ST	0.4760	-----			
Factor de Dilución	900	-----			
Peso de la muestra	250.0	mg			
Peso del estandar	20.0	mg			
[ST] en mg:	0.020	mg/mL			
Rotula	20	mg			
Dosis	1	Cápsula			
PP3	250.00	mg			
Resultado:	75.25	%			
	15.05	mg/ Cápsula			
PORCENTAJE SOBRE LO ROTULADO					
% S/ROT:		Abs. Mx. X [St] X FD x PP3 x DOSIS x 100%			LIMITES USP/Cáp
		Abs. St x Pmx. x Rot.			%
					mg/capsula
					95
					115
					19
					23
DISOLUCION					
Nº	PESO	Absorbancia	% s/rot	mg de PA	mg liberados:
1	250	0.398	75.25	15.05	20.0mg.....100.0%
2	250	0.397	75.06	15.01	X.....%/s/rot
3	250	0.395	74.68	14.94	
PROMEDIO	250.00	0.397	75.00	15.00	X= mg de Riboflavina liberada
PARAMETROS DE ACEPTACIÓN DEL EQUIPO					
MEDIO	RPM	TIEMPO	LONG. DE OND		
Agua	50	45min	444		

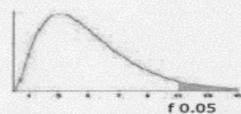
ANEXO N° 19.
VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE F (0.05).

Tabla N° 40. Valores críticos de la distribución de F (0.05)

Cátedra: Probabilidad y Estadística
Facultad Regional Mendoza
UTN

Tabla D.9: VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN F (0,05)

área a la derecha del valor crítico = 0,05



g.d.l

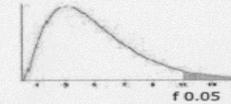
g.d.l	Grados de libertad del Numerador															g.d.l
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0	243,9	244,7	245,4	245,9	1
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396	19,405	19,413	19,419	19,424	19,429	2
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,763	8,745	8,729	8,715	8,703	3
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,936	5,912	5,891	5,873	5,858	4
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,704	4,678	4,655	4,636	4,619	5
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,027	4,000	3,976	3,956	3,938	6
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,603	3,575	3,550	3,529	3,511	7
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,313	3,284	3,259	3,237	3,218	8
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,102	3,073	3,048	3,025	3,006	9
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,943	2,913	2,887	2,865	2,845	10
11	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854	2,818	2,788	2,761	2,739	2,719	11
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,753	2,717	2,687	2,660	2,637	2,617	12
13	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671	2,635	2,604	2,577	2,554	2,533	13
14	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602	2,565	2,534	2,507	2,484	2,463	14
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,507	2,475	2,448	2,424	2,403	15
16	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494	2,456	2,425	2,397	2,373	2,352	16
17	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450	2,413	2,381	2,353	2,329	2,308	17
18	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412	2,374	2,342	2,314	2,290	2,269	18
19	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378	2,340	2,308	2,280	2,256	2,234	19
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,310	2,278	2,250	2,225	2,203	20
21	4,325	3,467	3,072	2,840	2,685	2,573	2,488	2,420	2,366	2,321	2,283	2,250	2,222	2,197	2,176	21
22	4,301	3,443	3,049	2,817	2,661	2,549	2,464	2,397	2,342	2,297	2,259	2,226	2,198	2,173	2,151	22
23	4,279	3,422	3,028	2,796	2,640	2,528	2,442	2,375	2,320	2,275	2,236	2,204	2,175	2,150	2,128	23
24	4,260	3,403	3,009	2,776	2,621	2,508	2,423	2,355	2,300	2,255	2,216	2,183	2,155	2,130	2,108	24
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236	2,198	2,165	2,136	2,111	2,089	25
26	4,225	3,369	2,975	2,743	2,587	2,474	2,388	2,321	2,265	2,220	2,181	2,148	2,119	2,094	2,072	26
27	4,210	3,354	2,960	2,728	2,572	2,459	2,373	2,305	2,250	2,204	2,166	2,132	2,103	2,078	2,056	27
28	4,196	3,340	2,947	2,714	2,558	2,445	2,359	2,291	2,236	2,190	2,151	2,118	2,089	2,064	2,041	28
29	4,183	3,328	2,934	2,701	2,545	2,432	2,346	2,278	2,223	2,177	2,138	2,104	2,075	2,050	2,027	29
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165	2,126	2,092	2,063	2,037	2,015	30
31	4,160	3,305	2,911	2,679	2,523	2,409	2,323	2,255	2,199	2,153	2,114	2,080	2,051	2,026	2,003	31
32	4,149	3,295	2,901	2,668	2,512	2,399	2,313	2,244	2,189	2,142	2,103	2,070	2,040	2,015	1,992	32
33	4,139	3,285	2,892	2,659	2,503	2,389	2,303	2,235	2,179	2,133	2,093	2,060	2,030	2,004	1,982	33
34	4,130	3,276	2,883	2,650	2,494	2,380	2,294	2,225	2,170	2,123	2,084	2,050	2,021	1,995	1,972	34
35	4,121	3,267	2,874	2,641	2,485	2,372	2,285	2,217	2,161	2,114	2,075	2,041	2,012	1,986	1,963	35
40	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077	2,038	2,003	1,974	1,948	1,924	40
60	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993	1,952	1,917	1,887	1,860	1,836	60
80	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951	1,910	1,875	1,845	1,817	1,793	80
90	3,947	3,098	2,706	2,473	2,316	2,201	2,113	2,043	1,986	1,938	1,897	1,861	1,830	1,803	1,779	90
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927	1,886	1,850	1,819	1,792	1,768	100
120	3,920	3,072	2,680	2,447	2,290	2,175	2,087	2,016	1,959	1,910	1,869	1,834	1,803	1,775	1,750	120
inf.	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831	1,789	1,752	1,720	1,692	1,666	inf.

Distribución F (0,05) - Pág. 1

Tabla N° 40. Continuación

Cátedra: Probabilidad y Estadística
Facultad Regional Mendoza
UTN

Tabla D.9: VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN F (0,05)



área a la derecha del valor crítico = 0,05

g.d.l	Grados de libertad del Numerador														g.d.l	
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		30
1	246,5	246,9	247,3	247,7	248,0	248,3	248,6	248,8	249,1	249,3	249,5	249,6	249,8	250,0	250,1	1
2	19,433	19,437	19,440	19,443	19,446	19,448	19,450	19,452	19,454	19,456	19,457	19,459	19,460	19,461	19,462	2
3	8,692	8,683	8,675	8,667	8,660	8,654	8,648	8,643	8,639	8,634	8,630	8,626	8,623	8,620	8,617	3
4	5,844	5,832	5,821	5,811	5,803	5,795	5,787	5,781	5,774	5,769	5,763	5,759	5,754	5,750	5,746	4
5	4,604	4,590	4,579	4,568	4,558	4,549	4,541	4,534	4,527	4,521	4,515	4,510	4,505	4,500	4,496	5
6	3,922	3,908	3,896	3,884	3,874	3,865	3,856	3,849	3,841	3,835	3,829	3,823	3,818	3,813	3,808	6
7	3,494	3,480	3,467	3,455	3,445	3,435	3,426	3,418	3,410	3,404	3,397	3,391	3,386	3,381	3,376	7
8	3,202	3,187	3,173	3,161	3,150	3,140	3,131	3,123	3,115	3,108	3,102	3,095	3,090	3,084	3,079	8
9	2,989	2,974	2,960	2,948	2,936	2,926	2,917	2,908	2,900	2,893	2,886	2,880	2,874	2,869	2,864	9
10	2,828	2,812	2,798	2,785	2,774	2,764	2,754	2,745	2,737	2,730	2,723	2,716	2,710	2,705	2,700	10
11	2,701	2,685	2,671	2,658	2,646	2,636	2,626	2,617	2,609	2,601	2,594	2,588	2,582	2,576	2,570	11
12	2,599	2,583	2,568	2,555	2,544	2,533	2,523	2,514	2,505	2,498	2,491	2,484	2,478	2,472	2,466	12
13	2,515	2,499	2,484	2,471	2,459	2,448	2,438	2,429	2,420	2,412	2,405	2,398	2,392	2,386	2,380	13
14	2,445	2,428	2,413	2,400	2,388	2,377	2,367	2,357	2,349	2,341	2,333	2,326	2,320	2,314	2,308	14
15	2,385	2,368	2,353	2,340	2,328	2,316	2,306	2,297	2,288	2,280	2,272	2,265	2,259	2,253	2,247	15
16	2,333	2,317	2,302	2,288	2,276	2,264	2,254	2,244	2,235	2,227	2,220	2,212	2,206	2,200	2,194	16
17	2,289	2,272	2,257	2,243	2,230	2,219	2,208	2,199	2,190	2,181	2,174	2,167	2,160	2,154	2,148	17
18	2,250	2,233	2,217	2,203	2,191	2,179	2,168	2,159	2,150	2,141	2,134	2,126	2,119	2,113	2,107	18
19	2,215	2,198	2,182	2,168	2,155	2,144	2,133	2,123	2,114	2,106	2,098	2,090	2,084	2,077	2,071	19
20	2,184	2,167	2,151	2,137	2,124	2,112	2,102	2,092	2,082	2,074	2,066	2,059	2,052	2,045	2,039	20
21	2,156	2,139	2,123	2,109	2,096	2,084	2,073	2,063	2,054	2,045	2,037	2,030	2,023	2,016	2,010	21
22	2,131	2,114	2,098	2,084	2,071	2,059	2,048	2,038	2,028	2,020	2,012	2,004	1,997	1,990	1,984	22
23	2,109	2,091	2,075	2,061	2,048	2,036	2,025	2,014	2,005	1,996	1,988	1,981	1,973	1,967	1,961	23
24	2,088	2,070	2,054	2,040	2,027	2,015	2,003	1,993	1,984	1,975	1,967	1,959	1,952	1,945	1,939	24
25	2,069	2,051	2,035	2,021	2,007	1,995	1,984	1,974	1,964	1,955	1,947	1,939	1,932	1,926	1,919	25
26	2,052	2,034	2,018	2,003	1,990	1,978	1,966	1,956	1,946	1,938	1,929	1,921	1,914	1,907	1,901	26
27	2,036	2,018	2,002	1,987	1,974	1,961	1,950	1,940	1,930	1,921	1,913	1,905	1,898	1,891	1,884	27
28	2,021	2,003	1,987	1,972	1,959	1,946	1,935	1,924	1,915	1,906	1,897	1,889	1,882	1,875	1,869	28
29	2,007	1,989	1,973	1,958	1,945	1,932	1,921	1,910	1,901	1,891	1,883	1,875	1,868	1,861	1,854	29
30	1,995	1,976	1,960	1,945	1,932	1,919	1,908	1,897	1,887	1,878	1,870	1,862	1,854	1,847	1,841	30
31	1,983	1,965	1,948	1,933	1,920	1,907	1,896	1,885	1,875	1,866	1,857	1,849	1,842	1,835	1,828	31
32	1,972	1,953	1,937	1,922	1,908	1,896	1,884	1,873	1,864	1,854	1,846	1,838	1,830	1,823	1,817	32
33	1,961	1,943	1,926	1,911	1,898	1,885	1,873	1,863	1,853	1,844	1,835	1,827	1,819	1,812	1,806	33
34	1,952	1,933	1,917	1,902	1,888	1,875	1,863	1,853	1,843	1,833	1,825	1,817	1,809	1,802	1,795	34
35	1,942	1,924	1,907	1,892	1,878	1,866	1,854	1,843	1,833	1,824	1,815	1,807	1,799	1,792	1,786	35
40	1,904	1,885	1,868	1,853	1,839	1,826	1,814	1,803	1,793	1,783	1,775	1,766	1,759	1,751	1,744	40
60	1,815	1,796	1,778	1,763	1,748	1,735	1,722	1,711	1,700	1,690	1,681	1,672	1,664	1,656	1,649	60
80	1,772	1,752	1,734	1,718	1,703	1,689	1,677	1,665	1,654	1,644	1,634	1,626	1,617	1,609	1,602	80
90	1,757	1,737	1,720	1,703	1,688	1,675	1,662	1,650	1,639	1,629	1,619	1,610	1,601	1,593	1,586	90
100	1,746	1,726	1,708	1,691	1,676	1,663	1,650	1,638	1,627	1,616	1,607	1,598	1,589	1,581	1,573	100
120	1,728	1,709	1,690	1,674	1,659	1,645	1,632	1,620	1,608	1,598	1,588	1,579	1,570	1,562	1,554	120
inf.	1,644	1,623	1,604	1,587	1,571	1,556	1,542	1,529	1,517	1,506	1,496	1,486	1,476	1,467	1,459	inf.