

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y
CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS



FORMULACIÓN DE COMPRIMIDOS DE
Opuntia soehrensii

Tesis de postgrado presentada para la obtención del grado Magister Scientiarum en
“Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos”

POR: Lic. LOURDES BLANCA AQUINO TARQUI

LA PAZ - BOLIVIA

Agosto, 2022

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y
CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS



FORMULACIÓN DE COMPRIMIDOS DE
Opuntia soehrensii

Tesis de postgrado presentada para la obtención del grado Magister Scientiarum en
“Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos”

POR: Lic. LOURDES BLANCA AQUINO TARQUI

TUTORES: ALBERTO JOSÉ GIMÉNEZ TURBA Ph.D.

NINOSKA FLORES QUISBERT Ph.D.

LA PAZ - BOLIVIA

Agosto, 2022

A mi familia...

AGRADECIMIENTO

A lo más sagrado de mi vida, al Dios Eterno fortaleza mía... y a mi querida familia: a mi madre Hortencia, fuente inagotable de amor dulce y trabajo incansable, a mi padre Juan de Dios, un ejemplo vivo de fuerza, genialidad y mucho coraje... a mis hermanos forjadores de mundos con sueños auténticos rebosantes de música, riqueza, ingenio, fortaleza, melodías que pintan la vida, nijiko... a mis eternos guardianes Cachuchin y Apio, mi eterna gratitud a todos ellos, son las razones de mi inspiración para edificar este sueño.

A la Dra. María Luisa Daza C., por permitir que se lleven a cabo estos cursos tan apasionantes y a todos mis docentes de la maestría, en especial a la Dra. Elizabeth Mora, quienes han permitido enriquecernos con tanto conocimiento científico de esta fascinante y hermosa carrera.

A mis tutores Dr. Alberto Giménez Turba y Dra. Ninoska Flores, por abrirme las puertas del IIFB, por su infinita paciencia para la ejecución de este trabajo y compartir ciencia de su inmenso universo de conocimientos, muchas gracias por todos los conocimientos brindados y por su apoyo incondicional y desmedido.

A todos mis compañeros del IIFB, los Doctores Boris Espinoza, Iván Limachi, Crispín Paredes, Juan Carlos Ticona, Efraín Salamanca, Cristian Choque y todos los estudiantes con quienes supimos compartir momentos de investigación y trabajo en el laboratorio.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. CAPÍTULO: GENERALIDADES	3
1.1. ANTECEDENTES	3
1.2. JUSTIFICACIÓN	5
1.3. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	7
1.3.1. Planteamiento del problema	7
1.4. OBJETIVOS	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos	8
1.5. HIPÓTESIS	8
1.6. VARIABLES	8
1.6.1. Conceptualización de variables	8
1.6.2. Operacionalización de variables	9
2. CAPÍTULO: MARCO TEÓRICO	10
2.1. ESQUEMA TEÓRICO	10
2.2. FASE DE PREFORMULACIÓN	11
2.2.1. Características de la <i>Opuntia soehrensii</i>	11
2.2.2. Propiedades y usos medicinales de <i>O. soehrensii</i>	12
2.2.3. Generalidades del herpes virus	14
2.2.4. Caracterización fisicoquímica de <i>O. soehrensii</i>	15
2.2.5. Compuestos químicos característicos de <i>O. soehrensii</i>	16
2.2.6. Características generales de betalaínas	17
2.2.6.1. Estructura química	17
2.2.6.2. Análisis espectrofotométrico	19
2.2.6.3. Estabilidad de betalaínas y extracto de <i>O. soehrensii</i>	19
2.2.7. Identificación de compuestos químicos en extracto de <i>O. soehrensii</i>	25
2.2.8. Extracción de fitofármacos (materias primas vegetales)	27
2.2.9. Excipientes	28
2.3. FASE DE FORMULACIÓN	32
2.3.1. Elección del método de fabricación de comprimidos	32
2.3.2. Selección de excipientes mediante diseños estadísticos experimentales	33
2.3.3. Diseños completos: Diseño factorial completo	33
2.3.4. Diseños reducidos: Diseño factorial fraccionados saturados	33
2.3.5. Criterios de evaluación de comprimidos	34
3. CAPÍTULO: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	35
3.1. ESQUEMA METODOLÓGICO	35
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN	36
3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	36
3.4. ÁREA DE ESTUDIO	36
3.5. MÉTODO EXPERIMENTAL	36
3.5.1. Equipos, materiales, reactivos y sustancias de referencia	36
3.5.2. Recolección de semillas	37
3.5.3. Autenticación de la especie botánica en estudio	38
3.5.4. Extracción sólido-líquido a partir de semillas	38
3.5.5. Descripción y características fisicoquímicas del extracto	38
3.5.5.1. Descripción organoléptica del extracto	38
3.5.5.2. Contenido de agua	38

3.5.5.3. Higroscopicidad.....	39
3.5.5.4. Grado de solubilidad	40
3.5.5.5. Cuantificación de betalainas	40
3.5.6. <i>Identificación de compuestos químicos del extracto acuoso</i>	41
3.5.6.1. Análisis del extracto acuoso por HPLC-DAD-ESI/MS	41
3.5.6.2. Fraccionamiento del extracto acuoso	42
3.5.6.3. Identificación de compuestos químicos por HPLC-DAD-ESI/MS	42
3.5.7. <i>Métodos de análisis propuestos para el extracto como materia prima</i>	43
3.5.7.1. Métodos analíticos de identificación	43
3.5.7.2. Métodos analíticos de valoración	43
3.5.8. <i>Estudios de estabilidad de pH del extracto</i>	44
3.5.9. <i>Estudio de la concentración de extracto por unidad de dosificación</i>	45
3.5.9.1. Estandarización de la cantidad de semillas	45
3.5.9.2. Extracción acuosa por infusión	45
3.5.9.3. Cálculo de la cantidad de extracto por unidad de dosificación.....	45
3.5.10. <i>Evaluación citotóxica del extracto acuoso de O. soehrensii</i>	46
3.5.11. <i>Fase de formulación de comprimidos</i>	46
3.5.11.1. Selección de agentes adsorbentes.....	46
3.5.11.2. Selección de excipientes mediante diseños estadísticos experimentales	47
3.5.11.3. Criterios de aceptación	48
3.5.11.4. Métodos analíticos para la evaluación de comprimidos.....	52
4. CAPÍTULO: RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
4.1. <i>EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO A PARTIR DE SEMILLAS</i>	55
4.2. <i>DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL EXTRACTO</i>	56
4.2.1. <i>Descripción organoléptica del extracto</i>	56
4.2.2. <i>Contenido de agua</i>	56
4.2.3. <i>Higroscopicidad</i>	56
4.2.4. <i>Grado de solubilidad</i>	57
4.2.5. <i>Cuantificación de betalainas en el extracto</i>	58
4.2.6. <i>Identificación de compuestos químicos del extracto acuoso</i>	59
4.2.6.1. Análisis del extracto acuoso por HPLC-DAD-ESI/MS	59
4.2.6.2. Fraccionamiento del extracto acuoso	62
4.2.6.3. Identificación de compuestos químicos por HPLC-DAD ESI/MS.....	63
4.2.7. <i>Estructura de compuestos químicos identificados en el extracto</i>	68
4.2.8. <i>Métodos de análisis propuestos para el extracto como materia prima</i>	69
4.2.8.1. Métodos analíticos de identificación	69
4.2.8.2. Métodos analíticos de valoración	73
4.2.9. <i>Estudio de estabilidad de pH del extracto</i>	80
4.2.10. <i>Estudio de la concentración de extracto por unidad de dosificación</i>	85
4.2.11. <i>Evaluación citotóxica del extracto acuoso de O. soehrensii</i>	86
4.2.12. <i>Fase de formulación de comprimido</i>	86
4.2.12.1. Selección de agentes adsorbentes.....	86
4.2.12.2. Selección de excipientes mediante diseños estadísticos experimentales	88
4.2.13. <i>Métodos analíticos para la evaluación de comprimidos</i>	93
4.2.13.1. Valoración e identificación de betanina e isobetanina en comprimidos	93
4.2.13.2. Prueba de disolución de comprimidos de <i>O. soehrensii</i>	96
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	98
BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXOS.....	I
ANEXO A-1: <i>RECOLECCIÓN DE SEMILLAS DE O. SOEHRENSII</i>	I

ANEXO A-2: CERTIFICACIÓN DE AUTENTICACIÓN DE LA ESPECIE BOTÁNICA <i>O. SOEHRENSII</i> POR EL HERBARIO NACIONAL.....	II
ANEXO A-3: EXTRACCIÓN ACUOSA DE SEMILLAS DE <i>O. SOEHRENSII</i>	III
ANEXO A-4: TABLA DE REGISTRO DE GANANCIA DE HUMEDAD EN EL EXTRACTO SECO DE <i>O. SOEHRENSII</i> IV	
ANEXO A-5: PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO DE <i>O. SOEHRENSII</i> POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	V
ANEXO A-6: PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD ESI/MS DE <i>O. SOEHRENSII</i> , <i>O. FICUS INDICA</i> Y <i>B. VULGARIS</i> : A) $\lambda=254\text{nm}$; B) $\lambda=480\text{nm}$ Y C) $\lambda=536\text{nm}$	VI
ANEXO A-7: ESPECTRO DE MASAS DE COMPUESTOS CARACTERÍSTICOS DEL EXTRACTO DE <i>O. SOEHRENSII</i> OBTENIDO POR HPLC-DAD ESI/MS	IX
ANEXO A-8: GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE ESPECTROS UV-VISIBLE DE <i>O. SOEHRENSII</i> CON OTRAS ESPECIES SIMILARES EN CONTENIDO DE BETALAÍNAS	XI
ANEXO A-9: TABLA DE COMPARACIÓN DE ABSORBANCIAS EN TÉRMINOS PORCENTUALES DE LOS PICOS DE MAYOR INTENSIDAD DE LAS ESPECIES <i>O. SOEHRENSII</i> , <i>O. FICUS INDICA</i> Y <i>BETA VULGARIS</i>	XI
ANEXO A-10: GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE ABSORBANCIAS MÁXIMAS PORCENTUALES DE EXTRACTOS DE <i>O. SOEHRENSII</i> , <i>O. FICUS INDICA</i> Y <i>B. VULGARIS</i>	XII
ANEXO A-11: TABLA DE COMPARACIÓN DE LA RELACIÓN PORCENTUAL DE ÁREAS DE BETANINA E ISOBETANINA DE LAS ESPECIES <i>O. SOEHRENSII</i> , <i>O. FICUS INDICA</i> Y <i>B. VULGARIS</i> OBTENIDAS POR HPLC-DAD ESI/MS.....	XII
ANEXO A-12: GRÁFICOS DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE DE EXTRACTO DE <i>O. SOEHRENSII</i> A DIFERENTES PH:	XIII
ANEXO A-13: DIAGRAMA DE PARETO DE LAS SIGNIFICANCIAS MÁS RELEVANTES DE LOS FACTORES EVALUADOS EN FUNCIÓN AL ÁNGULO DE REPOSO (A), FRIABILIDAD (B) Y PRUEBA DE DISOLUCIÓN (C)	XV
ANEXO A-14: TABLA DE RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>O. SOEHRENSII</i> Y SUS FRACCIONES	XVI
ANEXO A-15: TABLA DE EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DE DISOLUCIÓN PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE <i>O. SOEHRENSII</i> EN COMPRIMIDOS.....	XVII
ANEXO A-16: DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO DE REPOSO, FRIABILIDAD Y PORCENTAJE DE DISOLUCIÓN.....	XVIII

Índice de cuadros

Cuadro 1-1	Conceptualización de variables	9
Cuadro 1-2	Operacionalización de variables	9
Cuadro 2-1	Usos medicinales tradicionales de la <i>O. soehrensii</i>	12
Cuadro 2-2	Sub clasificación de los alfa-herpesvirus	14
Cuadro 2-3	Análisis proximal de <i>O. soehrensii</i>	15
Cuadro 2-4	Caracterización fisicoquímica de <i>O. soehrensii</i>	15
Cuadro 2-5	Lignanos de <i>O. soehrensii</i>	27
Cuadro 2-6	Funciones del almidón de maíz.....	28
Cuadro 2-7	Propiedades típicas de excipientes de interés	29
Cuadro 2-8	Incompatibilidades, seguridad, estabilidad y condiciones de almacenamiento de excipientes de interés	30
Cuadro 2-9	Características que confieren los excipientes en la formulación de comprimidos	33
Cuadro 3-1	Equipos, materiales, reactivos y sustancias de referencia	37

Índice de Figuras

Figura 2-1	Esquema teórico	10
Figura 2-2	Estructura básica de betacianinas (izquierda), betaxantinas (derecha) y su bloque de construcción común ácido betalámico (centro).....	16
Figura 2-3	Esquema actual propuesto de biosíntesis de betalaína.....	18
Figura 2-4	Estructuras de la betanidina, ácido betalámico e indicaxantina	18
Figura 2-5	Sistema 1,7-diazaheptametano	19
Figura 2-6	Vías de degradación de la betanina	23
Figura 2-7	Fabricación.....	33
Figura 3-1	Esquema metodológico.....	35

Índice de Tablas

Tabla 4-1	Rendimiento de la extracción acuosa de semillas	55
Tabla 4-2	Contenido de agua del extracto liofilizado de <i>O. soehrensii</i>	56
Tabla 4-3	Grado de solubilidad del extracto de <i>O. soehrensii</i>	57
Tabla 4-4	Contenido de betalaínas de <i>O. soehrensii</i>	58
Tabla 4-5	Compuestos detectados en el espectro de masas del extracto de <i>O. soehrensii</i> obtenido por HPLC-DAD ESI/MS	61
Tabla 4-6	Fraccionamiento por cromatografía en columna (C_{18}) del extracto de <i>O. soehrensii</i>	63
Tabla 4-7	Compuestos detectados en fracciones del extracto de <i>O. soehrensii</i> por HPLC-DAD ESI/MS	68
Tabla 4-8	Compuestos identificados en extracto acuoso de semillas de <i>O. soehrensii</i>	69
Tabla 4-9	Picos y espectros de absorción UV-vis para la identificación del extracto de <i>O. soehrensii</i> por HPLC-DAD	72
Tabla 4-10	Comparación de la relación porcentual de áreas de betanina e isobetanina de la especie <i>O. soehrensii</i> por HPLC-DAD ESI/MS.....	72
Tabla 4-11	Concentraciones y áreas del estándar (St) betanina obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda_{max}=536$ nm	75
Tabla 4-12	Concentraciones y áreas del estándar isobetanina obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda_{max}=536$ nm	76
Tabla 4-13	Concentraciones y áreas de los estándares betanina e isobetanina obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda_{max}=536$ nm.....	77
Tabla 4-14	Absorbancias obtenidas por E. UV-visible ($\lambda_{max}=536$ nm del estándar) a diferentes concentraciones para betanina y extracto de <i>O. soehrensii</i>	79

Tabla 4-15 Degradación porcentual del extracto de <i>O. soehrensii</i> en solución acuosa a diferentes valores de pH	81
Tabla 4-16 Estabilidad de las absorbancias máximas del extracto de <i>O. soehrensii</i> en solución acuosa a diferentes valores de pH en función del tiempo	82
Tabla 4-17 Masa promedio de semillas de <i>O. soehrensii</i> por cuchara	85
Tabla 4-18 Rendimiento porcentual de extracto seco de <i>O. soehrensii</i> obtenido por infusión	85
Tabla 4-19 Cantidad de extracto de <i>O. soehrensii</i> por unidad de dosificación	86
Tabla 4-20 Selección del agente adsorbente	87
Tabla 4-21 Nivel (+) y Nivel (-) de los excipientes propuestos	88
Tabla 4-22 Matriz basada en el diseño de Plackett – Burman	89
Tabla 4-23 Criterios de aceptación	89
Tabla 4-24 Resultados de los parámetros evaluados en la fabricación de comprimidos	90
Tabla 4-25 Resultados de significancia de los factores evaluados en función al ángulo de reposo	90
Tabla 4-26 Resultados de significancia de los factores evaluados en función a la friabilidad	91
Tabla 4-27 Resultados de significancia de los factores evaluados en función al porcentaje de disolución	91
Tabla 4-28 Significancias más relevantes de los factores evaluados en función al ángulo de reposo, friabilidad y porcentaje de disolución	92
Tabla 4-29 Propuestas de formulación para el diseño y elaboración de comprimidos a base de extracto de <i>O. soehrensii</i>	92
Tabla 4-30 Propuesta de formulación cualitativa y cuantitativa de comprimidos a base de extracto de <i>O. soehrensii</i>	93
Tabla 4-31 Resultados de parámetros evaluados en distintas fases de la fabricación de los comprimidos de <i>O. soehrensii</i>	93
Tabla 4-32 Rendimiento porcentual de betanina e isobetanina en comprimidos fabricados en base a extracto de <i>O. soehrensii</i>	94
Tabla 4-33 Resultados prueba de disolución de comprimidos de <i>O. soehrensii</i>	96

Índice de Gráficos

Gráfico 2-1 Perfil LC-ESI-MS y estructuras químicas identificadas en el pigmento <i>Opuntia spp</i>	26
Gráfico 4-1 Perfil de higroscopicidad del extracto seco de <i>O. soehrensii</i>	57
Gráfico 4-2 Perfil de solubilidad del extracto de <i>O. soehrensii</i> determinado por espectrofotometría UV-vis	58
Gráfico 4-3 Perfil cromatográfico del extracto de <i>O. soehrensii</i> obtenido por HPLC-DAD ESI/MS a una $\lambda=254$ nm	61
Gráfico 4-4 Cromatograma en 3 dimensiones del extracto acuoso de <i>O. soehrensii</i> obtenido por HPLC-DAD ESI/MS	62
Gráfico 4-5 Rendimiento porcentual del fraccionamiento de extracto de <i>O. soehrensii</i> obtenido por cromatografía en columna	63
Gráfico 4-6 Cromatograma, espectro de masas y espectro UV-visible de compuestos identificados en el fraccionamiento del extracto de <i>O. soehrensii</i> por HPLC-DAD ESI/MS ($\lambda=536$ nm). A) Betanina: Fracción VI, B) Isobetanina: Fracción VII y C) Filocactina: Fracción X.	65
Gráfico 4-7. Espectro UV-visible del extracto de <i>O. soehrensii</i>	70
Gráfico 4-8 Cromatograma del extracto de <i>O. soehrensii</i> a $\lambda_{max}=536$ nm	73
Gráfico 4-9 Espectro de absorción UV- visible de a) Betanina y b) Isobetanina con $\lambda_{max}=536$ nm en ambos picos	74
Gráfico 4-10 Cromatograma tridimensional del extracto <i>O. soehrensii</i> a $\lambda_{max}=536$ nm (Betanina $t_r=2,21$ min e isobetanina $t_r=3,40$ min)	74
Gráfico 4-11 Curva de calibración del estándar (St) betanina obtenido por HPLC-DAD ($\lambda_{max}=536$ nm)	75

Gráfico 4-12	Curva de calibración del estándar (St) isobetanina obtenido por HPLC-DAD ($\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$).....	76
Gráfico 4-13	Comparación de la proporcionalidad de áreas (%) de los estándares betanina e isobetanina	78
Gráfico 4-14	Curva de calibración obtenido por E. UV-visible a $\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$ para:	79
Gráfico 4-15	Espectro de absorción UV-visible del extracto de <i>O. soehrensii</i> sin modificación de pH almacenado a 20°C a) y a 4°C b).....	83
Gráfico 4-16	Perfil de degradación de betacianinas ($\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$) del extracto <i>O. soehrensii</i> a diferentes valores de pH	84
Gráfico 4-17	Perfil de degradación de compuestos de $\lambda_{max} = 272 \text{ nm}$ del extracto <i>O. soehrensii</i> a diferentes valores de pH	84
Gráfico 4-18	Cromatograma del extracto de <i>O. soehrensii</i> a 0.40mg/mL, obtenido en la valoración de comprimidos por HPLC-DAD	94
Gráfico 4-19	Vista tridimensional del cromatograma y espectro UV-visible de betanina e isobetanina, obtenido en la valoración de comprimidos.....	95
Gráfico 4-20	Espectro UV-visible de isobetanina, obtenido de la valoración de comprimidos por HPLC-DAD.....	95
Gráfico 4-21	Porcentaje de disolución de extracto de <i>O. soehrensii</i> y betanina	97

RESUMEN

En respuesta a la guía de prioridades de investigación en salud en Bolivia contra enfermedades de origen viral, el presente trabajo, hace hincapié en la investigación y el desarrollo en materia de medicina tradicional, orientado a contribuir con soluciones inmediatas, planteándose como objetivos, formular comprimidos de extracto de *O. soehrensii*, a través de una tecnología de fabricación apropiada. El método experimental aplicado, ha seguido los principios básicos de preformulación y formulación para el diseño de formas farmacéuticas.

Los resultados obtenidos, en la identificación del extracto, se concentran en la propuesta de tres métodos analíticos, por HPLC-DAD (λ_{\max} =254nm y 480nm), HPLC-DAD- ESI/MS (λ_{\max} =254nm), y espectrofotometría UV-visible. Respecto a los métodos analíticos de valoración, se han planteado las técnicas por HPLC-DAD y espectrofotometría UV-visible para la cuantificación del marcador fitoquímico betanina e isobetanina a λ_{\max} =536nm. Se ha aplicado el diseño estadístico experimental de Plackett & Burman para la formulación de comprimidos en base a extracto de *O. soehrensii*, para ello se han considerado siete factores y ocho experimentos para la determinación de la composición cuali-cuantitativa de los comprimidos. En estos experimentos fueron evaluados los factores y efectos más importantes en función al ángulo de reposo en el proceso de granulación, la friabilidad y prueba de disolución en el proceso de compresión, bajo los criterios de aceptación de la USP, resultados que permitieron plantear la siguiente composición por comprimido: Extracto de *O. soehrensii* 21,49%, almidón de maíz 67,51% (adsorbente), gelatina 5,00% (aglutinante), almidón de maíz 5,00% (disgregante) y estearato de magnesio 1,00% (agente antifricción). Posibilitando la obtención de comprimidos de ingestión oral con una concentración de extracto de *O. soehrensii* de 203,00mg que cumplen con los criterios de aceptación establecidos en las especificaciones características para esta forma farmacéutica, para cuyo fin se han desarrollado métodos analíticos de identificación, valoración y disolución.

Palabras claves

Opuntia, soehrensii, diseño, formulación, comprimidos

ABSTRACT

In response to the guide of health research priorities in Bolivia against diseases of viral origin, the present work emphasizes research and development in the field of traditional medicine, aimed at contributing with immediate solutions, considering as objectives, formulating tablets of *O. soehrensii* extract, through an appropriate manufacturing technology. The applied experimental method has followed the basic principles of preformulation and formulation for the design of pharmaceutical forms.

The results obtained, in the identification of the extract, focus on the proposal of three analytical methods, by HPLC-DAD ($\lambda_{\text{max}}=254\text{nm}$ and 480nm), HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda_{\text{max}}=254\text{nm}$), and UV-visible spectrophotometry. Regarding the analytical assessment methods, HPLC-DAD and UV-visible spectrophotometry techniques have been proposed for the quantification of the phytochemical marker betanin and isobetanin at $\lambda_{\text{max}}=536\text{nm}$. The experimental statistical design of Plackett & Burman has been applied for the formulation of tablets based on *O. soehrensii* extract, for which seven factors and eight experiments have been considered to determine the qualitative-quantitative composition of the tablets. In these experiments, the most important factors and effects were evaluated based on the angle of repose in the granulation process, friability and dissolution test in the compression process, under the USP acceptance criteria, results that allowed us to propose the following composition per tablet: *O. soehrensii* extract 21,49%, corn starch 67,51% (adsorbent), gelatin 5,00% (binder), corn starch 5,00% (disintegrant) and magnesium stearate 1,00% (anti-friction agent). Making it possible to obtain tablets for oral ingestion with a concentration of *O. soehrensii* extract of 203.00mg that meet the acceptance criteria established in the characteristic specifications for this pharmaceutical form, for which purpose analytical methods of identification, valuation and dissolution have been developed.

Keywords

Opuntia soehrensii, design, formulation, tablets

Introducción

En nuestro país, existen importantes avances en la investigación científica relacionado con el estudio de las propiedades medicinales de diversas especies botánicas procedentes de distintas regiones de nuestro país. Es así que, estudios realizados por la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), revelan que la Evanta (*Galipea longiflora*), cura la enfermedad infecciosa denominada leishmaniasis (Bolivia Sol, 2011; Calla y otros, 2009). Estos estudios constituyen verdaderos soportes científicos que respaldan y confirman las propiedades terapéuticas de estas plantas medicinales, que se las aprovechaba ancestralmente utilizándolas de la forma tradicional.

Otra especie botánica promisorio de nuestro país, es la *O. soehrensii*, que se utiliza de forma tradicional para tratar afecciones tales como varicela, sarampión, aftas bucales, úlceras de estómago, para bajar la fiebre intensa, anemia, blenorragia y otros (Girault, 1987a; Pérez, 1994; PRODECO y CIMES, 2018)

La actividad antiviral de la *O. soehrensii* frente al virus Herpes simplex tipo 2, causante del herpes genital, fue comprobada por estudios científicos *in vitro* realizados por investigadores bolivianos, cuyos resultados revelan que esta planta, no solamente permite tratar la enfermedad sino también la previene (Zambrana, 2007).

Estudios científicos atribuyen a las betalainas, componentes característicos del género *Opuntia spp.*, como los compuestos responsables de la actividad antiviral, anticancerígena, antiparasitaria, contra los desórdenes relacionados con el estrés oxidativo, obesidad, aterosclerosis y otros (Azeredo, 2008; Biswas y otros, 2013; Hilou y otros, 2006; Pavokovic & Krsnik, 2011). Otro estudio realizado en ratas albinas, revela que el extracto hidroalcohólico de semillas de *O.soehrensii* presenta efecto antihipertensivo (Merino & Perez, 2019).

En este sentido, dando continuidad a estas actividades de investigación sustentadas de forma científica y al uso ancestral de esta especie botánica con fines medicinales y como alimento, son bases que podrían permitir la transformación de esta especie en un producto, otorgándole una adecuada forma farmacéutica que facilite su administración.

Por tanto, en el presente proyecto se pretende desarrollar investigaciones orientadas a la formulación de una forma farmacéutica en comprimidos que contenga extracto de semillas de *O. soehrensii*.

La formulación de esta forma farmacéutica que contendrá un componente activo de origen botánico, seguirá los mismos pasos que demanda una forma farmacéutica que contempla en su composición un principio activo de naturaleza sintética. Por lo tanto, en primera instancia se realizan ensayos de investigación para la caracterización del extracto de *O. soehrensii*, haciendo hincapié en los parámetros más importantes que permitirán el diseño de la forma farmacéutica de tipo comprimidos.

En la etapa de preformulación, ya contando con el conocimiento de los parámetros necesarios del extracto de *O. soehrensii*, se hace la selección de los posibles excipientes en función a las características que presenta el extracto. Estos excipientes permitirán plantear las propuestas necesarias como alternativas en cuanto a la composición cualitativa y cuantitativa para la obtención de un comprimido que cumpla con las especificaciones características para esta forma farmacéutica.

En la etapa de formulación se aplican diseños estadísticos experimentales para la evaluación de los excipientes propuestos en la etapa de preformulación, siguiendo un procedimiento adecuado a las características del extracto de *O. soehrensii*. Los criterios de aceptación de los experimentos se rigen de acuerdo a las normativas de la USP. Como resultado de la evaluación de todos los experimentos que plantean estos diseños estadísticos, surge la composición cualitativa y cuantitativa del comprimido en base a extracto de *O. soehrensii*.

1. Capítulo: Generalidades

1.1. Antecedentes

En la revisión de publicaciones similares al presente proyecto de tesis en el estado de arte, no se encontraron hallazgos de semejante índole. Sin embargo, existen publicaciones que hacen referencia a otro tipo de productos como por ejemplo la elaboración de yogurt empleando como colorante al extracto de semillas de *O. soehrensii*, cuyo objeto de estudio fue la evaluación de la estabilidad de dicho colorante (Huayta, 2016). En otro estudio se utiliza quinua y *O. soehrensii* como colorante, con el objetivo de optimizar ciertos parámetros de control para lograr una producción máxima de bacterias lácticas en un producto de yogurt; de manera semejante, un estudio realiza la fabricación de yogurt con los mismos componentes, en el que se evalúa la cantidad óptima de pasta de quinua para un litro de producto (Pareda y otros, 2014; Andia y otros, 2017).

Una publicación que se suma a las anteriores referencias, evalúa la estabilidad de los pigmentos de tipo betacianinas y antioxidantes del extracto de semillas de *O. soehrensii* como colorante natural de yogurt, demostrando que tanto sus betacianinas como compuestos fenólicos contribuyen a la capacidad antioxidante con un gran potencial como colorante natural para alimentos funcionales (Caldas y otros, 2015).

Otro estudio publicado trata de la elaboración de harina de yuca enriquecida con el colorante natural de *O. soehrensii*. (Carpio & Portugal, 2014).

También se halló una publicación que evalúa el efecto antibacteriano y antifúngico de los extractos del *Zea Mays L.* (maíz morado), *Rubus glaucus* (mora andina) y *O. soehrensii*, formulados en un gel de limpieza cutánea, obteniéndose los mejores resultados para la *O. soehrensii* (Soto, 2014). Un estudio similar, también revela que el extracto acuoso y etanólico de *O. soehrensii*, al igual que un gel para limpieza de manos elaborado a base de dichos extractos como principal componente, generó resultados que evidencian la capacidad antibacteriana de esta especie botánica frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Nattes & Quispe, 2018).

Otra publicación evalúa el contenido de polifenoles totales y betalaínas en una bebida elaborada a partir de Sancayo (*Corryocactus brevistylus*) y Ayrampo (*O. soehrensii*)

realizando dichas cuantificaciones en sus materias primas como en sus diferentes propuestas de producto (Falcón & Juárez, 2016).

Por otro lado, se encontraron algunas publicaciones referentes a la elaboración de comprimidos a base de productos naturales como extractos de manzanilla, ajo y jengibre y otra formulación de comprimido en base a ajeno, romero y manzanilla; ninguna de ellas aplicó diseños estadísticos experimentales para la determinación de sus componentes para la formulación final de su producto (Falconi, 2011; Montesdeoca, 2010; Amaguayo, 2013).

Respecto a la aplicación de diseños estadísticos experimentales relacionados a la formulación de formas farmacéuticas, se han encontrado algunos trabajos que aplican dichos conocimientos, pero en formulaciones con principios activos sintéticos, tal es el caso de la elaboración de una formulación farmacéutica a través de un diseño experimental de mezclas (Pinillos & Lopera, 2009).

En la farmacopea de los Estados Unidos 37/NF-32 no se encuentra registrada la especie *O. soehrensii* como materia prima ni como producto, por lo que no se dispone de información respecto a su monografía analítica tanto para la identificación, valoración de sus componentes principales u otros ensayos característicos de una forma farmacéutica.

Se encontraron escasas publicaciones de reportes científicos de metodologías analíticas específicas para betalaínas provenientes de la *O. soehrensii*, sin embargo, se hallaron técnicas analíticas aplicadas a otras especies botánicas, que servirán de base en el presente estudio. Se hallaron publicaciones que afirman la existencia de dos tipos de betalaínas, las betacianinas y las betaxantinas; aseverando que estas últimas emiten autofluorescencia verde, que no se ve con las betacianinas, característica que se aprovecha para su cuantificación, previa separación a través de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), evaluando 14 diferentes betaxantinas presentes en *Carpobrotus acinaciformis* (Harris y otros, 2012; Gandia y otros, 2005).

Otro caso muestra que los análisis cualitativos y cuantitativos de pigmentos de betalaínas de varias especies de *Opuntia spp.* provenientes de México, se llevaron a cabo con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa con detección matriz diodo

(HPLC-DAD) acoplada con espectrometría de masas por electro spray (ESI -MS), donde tanto betacianinas y betaxantinas fueron identificadas por comparación con características de espectrometría UV-visible y masas, así como los tiempos de retención, con betaxantinas semisintéticas de referencia (Castellanos & Yahia, 2008).

1.2. Justificación

En el año 2009, el Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia ha publicado la “Guía de Prioridades de Investigación en Salud”, en la cual se han priorizado 10 tópicos para Bolivia. Posteriormente, tanto autoridades de Salud e investigadores, han priorizado 5 tópicos para estar acorde a las políticas de la Organización Panamericana de la Salud, donde la Organización Mundial de la Salud (OMS) como parte de la estrategia mundial sobre salud pública hace hincapié en la investigación y el desarrollo en materia de medicina tradicional (Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, 2009; OMS, 2008).

La presente propuesta se centra en abordar tópicos relacionados a enfermedades infecciosas y la innovación de plantas medicinales. En respuesta a dichas prioridades, concentramos nuestros esfuerzos en atender enfermedades infecciosas como el herpes genital causada por el virus Herpes simplex tipo 2 (VHS-2), que a nivel mundial, se estimaba en 491 millones el número total de personas entre 15 y 49 años afectadas por esta infección en el año 2020, representando un 13% de la población en todo el mundo que padece de esta enfermedad que dura toda la vida y no tiene cura (OMS, 2020).

Se ha observado que los medicamentos antivirales convencionales más difundidos para el tratamiento del VHS-2 y además propuesto por la OMS, tales como aciclovir, valaciclovir y famciclovir, que si bien pueden prevenir o acortar la duración de los brotes herpéticos, no los cura definitivamente ó simplemente no responden en algunos casos a este tratamiento, denotando un desarrollo de resistencia del VHS-2 a dichos medicamentos (Bermejo & Leiro, 2008; POZ, 2019; CDC, 2014; OMS, 2020).

La infección por VHS-2 multiplica aproximadamente por tres el riesgo de infección por VIH, que a finales del año 2016, a nivel mundial se alcanzó un registro de alrededor de 36,7 millones de personas infectadas por el VIH y se estima que, a finales de 2019, había 38 millones de personas con el VIH; por consiguiente, el tratamiento oportuno de la

infección causada por VHS-2 puede permitir la reducción del riesgo de infección por el VIH (OMS, 2020).

En Bolivia, se registra un crecimiento de las cifras de contagios por VIH a igual que a nivel mundial. De acuerdo a los datos de ONUSIDA a nivel Bolivia, la tasa de prevalencia del VIH ha incrementado de 0.1% en edades entre 15 - 49 años durante la década de los 90's; a 0.2 % a principios de los 2000 y a 0.3% para el primer trimestre de 2019. A nivel mundial se registra una tasa de prevalencia del 0.8 % para la gestión 2017. Con aproximadamente 10 mil nuevos casos detectados entre 2014 y 2017, se dice que ya no es un riesgo insignificante (Andersen & Gonzales, 2019).

Por otro lado, ante la emergencia de salud pública de preocupación internacional declarado por la OMS, debido a la actual pandemia que se vive a nivel mundial debido a la COVID-19 ocasionada por el virus SARS-CoV-2, el presente trabajo también pretende contribuir con sus investigaciones como una alternativa para tratar dicha enfermedad aunando todos nuestros esfuerzos para combatirla, que a la fecha se tienen registrados un número de 180 817 269 casos confirmados de los que 3 923 238 casos fallecieron (WHO, 2021).

Por este motivo, se ha indagado sobre investigaciones científicas publicadas con *O. soehrensii* relacionadas con enfermedades pulmonares provocadas por causas de origen viral o bacterianos, de las que una publicación científica muy interesante evalúa la actividad antiviral *in vitro* del extracto de *O. soehrensii* frente al Virus Respiratorio Sincitial Humano, que es considerado como la principal causa de infecciones virales del tracto respiratorio en todo el mundo. Los resultados obtenidos por este estudio demuestran que el extracto de *O. soehrensii* posee potente actividad antiviral cuando es adicionada en cultivos de células a ser infectadas como a células ya infectadas (Guarachi, 2005). Los resultados encontrados por este estudio, nos da esperanzas respecto a la posibilidad de la capacidad antiviral que el extracto *O. soehrensii* pueda presentar frente al virus SARS cov-2.

Preocupados por esta situación y en respuesta a la demanda de innovación de plantas medicinales, se abordará el desarrollo de la investigación de la especie botánica *Opuntia*

soehrensii y su transformación en la forma farmacéutica comprimidos, como una alternativa medicamentosa.

La importancia de otorgarle una forma farmacéutica a esta especie botánica, responde a que las plantas medicinales suelen cambiar la concentración de sus componentes activos dependiendo de factores como la región donde se cultiva, la época del año y otros que podrían reflejarse en la eficacia de los resultados de un tratamiento, por lo cual es importante realizar una producción estandarizada de comprimidos para garantizar que cada unidad de dosificación, contenga una dosis conocida de extracto de *O. soehrensii*, permitiendo que este producto sea seguro y eficaz (Sharapin, 2000).

La transformación del extracto de *O. soehrensii* en la forma farmacéutica comprimidos en una dosis determinada, responde a su alta estabilidad frente a otras formas farmacéuticas (Vila, 2001). Con esta propuesta contribuimos con la validación de los usos tradicionales de plantas medicinales para el desarrollo de tratamientos alternativos.

Este accionar fortalecerá la atención primaria de salud, que, de acuerdo a datos de la OMS, hasta un 80% de la población de los países en desarrollo, se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones y en países ricos, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que “natural” es sinónimo de inocuo (Sharapin, 2000; OMS, 2004).

1.3. Identificación del problema

1.3.1. Planteamiento del problema

El empleo de la *Opuntia soehrensii* para el tratamiento de infecciones virales en nuestro medio, se realiza de forma tradicional, la que en general consiste en preparar una infusión de las semillas desecadas de esta especie medicinal para su consumo por vía oral.

Entonces al no existir una forma de dosificación adecuada para la administración del extracto de semillas de *O. soehrensii*, que contenga además una dosis establecida, estamos ante una situación en la que el paciente no tiene la facilidad en la toma de sus dosis respectivas para seguir un tratamiento apropiado y efectivo.

Por tanto, el problema en cuestión consiste en si ¿es posible diseñar una formulación adecuada en comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii*, que cumpla con las especificaciones características para esta forma farmacéutica?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Formular comprimidos de extracto de *Opuntia soehrensii*, a través de una tecnología de fabricación apropiada.

1.4.2. Objetivos específicos

- Proponer una metodología analítica adecuada para la identificación y valoración de betalaínas del extracto de *O. soehrensii*.
- Aplicar diseños estadísticos experimentales para determinar la composición cualitativa y cuantitativa de excipientes por comprimido.
- Evaluar las distintas opciones de formulación de comprimidos de *O. soehrensii* mediante el cumplimiento a especificaciones características para esta forma farmacéutica, tal que nos permitan seleccionar la mejor formulación.

1.5. Hipótesis

Ha: La formulación de comprimidos de *Opuntia soehrensii* es adecuada porque cumple con las especificaciones características para esta forma farmacéutica.

H0: La formulación de comprimidos de *Opuntia soehrensii* **no** es adecuada porque no cumple con las especificaciones características para esta forma farmacéutica.

1.6. Variables

1.6.1. Conceptualización de variables

A continuación, se realiza la presentación de la conceptualización de las variables de esta investigación.

Cuadro 1-1 Conceptualización de variables

Tipo de variable	Conceptualización
Vx: Formulación de comprimidos de <i>Opuntia soehrensii</i>	Formulación: Consiste en la selección de la composición de la forma farmacéutica que, según algunos ensayos realizados garantiza el cumplimiento de cada una de las especificaciones establecidas ^a .
Vy: Especificaciones para comprimidos.	Especificaciones: Son límites de tolerancia, condiciones que deben reunir el producto o materiales usados u obtenidos durante la fabricación, las que deberán ser comprobadas y que van a constituirse como base para la evaluación de la calidad ^b .

Fuente: ^a Mora (2012, pág. 1), ^b WHO (2002, pág. 32)

1.6.2. Operacionalización de variables

En el siguiente cuadro se realiza la operacionalización de variables.

Cuadro 1-2 Operacionalización de variables

Variable	Dimensión	Técnicas de investigación	Instrumentación	Escalas de investigación	Medios de investigación	Obs.
Vx. Formulación de comprimidos de <i>Opuntia soehrensii</i>	Diseño de formas farmacéuticas	Diseños estadísticos experimentales	Materiales de laboratorio apropiados para la fabricación de comprimidos.	Comparativa de diferentes autores.	Excel	Utilizar equipos calibrados .
Vy ₁ . Identificación y valoración de principios activos	Control de Calidad físico-químico de medicamentos	Espectrofotometría UV-visible, HPLC-DAD-MS	Material de laboratorio pertinente para realizar el ensayo.	Absorbancia, tiempos de retención, masa	Espectrofotom. UV-visible, Equipo HPLC-DAD-MS.	Utilizar equipos calibrados
Vy ₂ . Pruebas de liberación de principio activo.	Control de Calidad físico-químico de medicamentos	Pruebas de desempeño: desintegración y disolución.	Material de laboratorio pertinente para realizar el ensayo.	Porcentaje de principio activo liberado por el fármaco (Q)	Equipo de Disolución.	Utilizar equipos calibrados

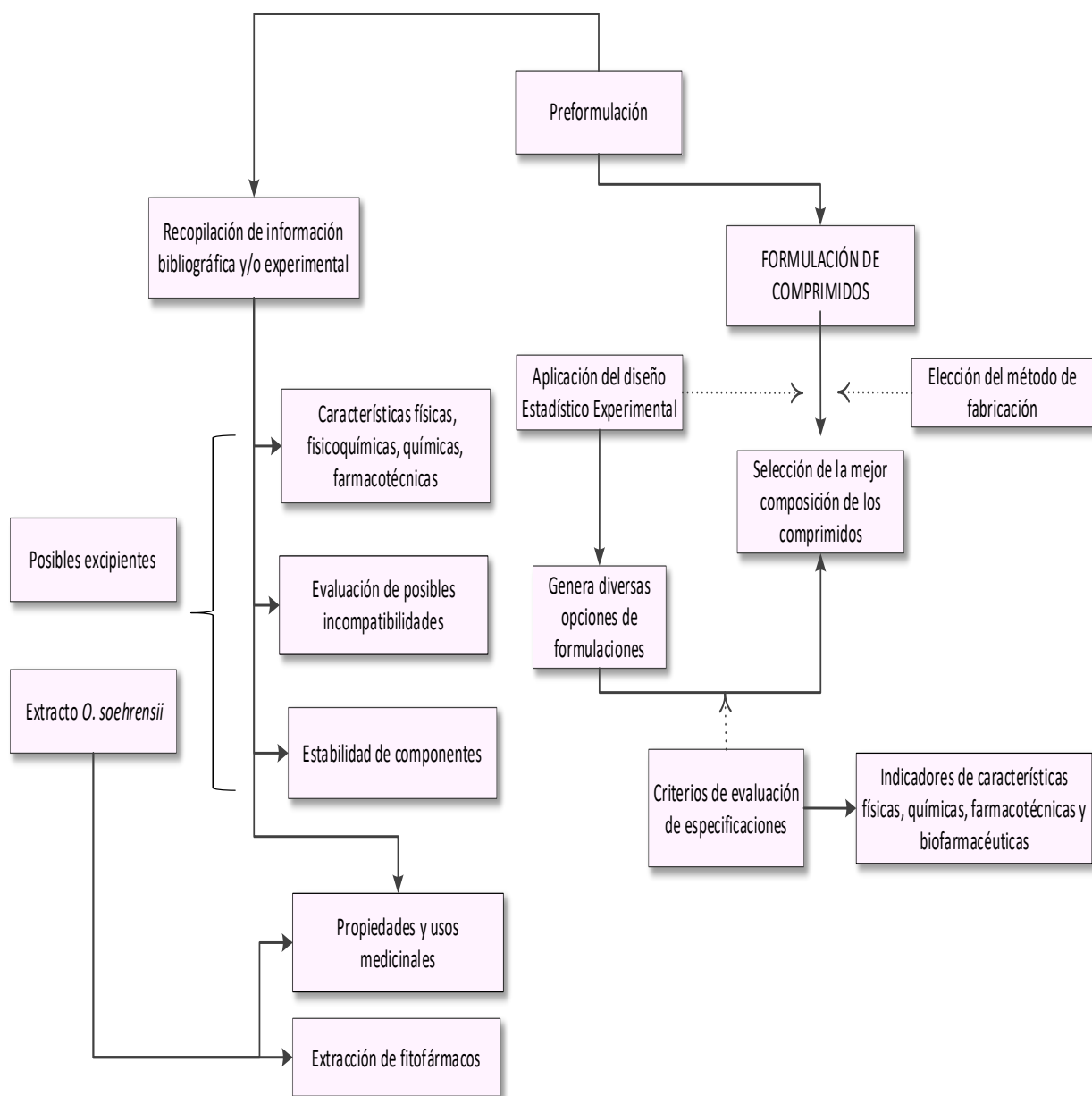
Fuente: Elaboración propia.

2. Capítulo: Marco teórico

2.1. Esquema teórico

El esquema teórico se representa en la siguiente figura.

Figura 2-1 Esquema teórico



Fuente: Elaboración propia.

2.2. Fase de preformulación

Según Vila (2001) la preformulación es el trabajo que abarca el conocimiento de las características básicas tanto biofarmacéuticas como fisicoquímicas que van a influir en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento.

La fase de preformulación abarca la recopilación de información bibliográfica existente referidas a las características físicas y fisicoquímicas del principio activo en cuestión, con esta información se planteará las pruebas a realizar, es decir los ensayos de caracterización y con los resultados de caracterización se buscan excipientes apropiados al principio activo. El siguiente paso es comprobar la estabilidad del principio activo frente a los principales agentes causantes de degradación y la evaluación de posibles incompatibilidades entre materiales (Mora, 2012)

2.2.1. Características de la *Opuntia soehrensii*

La descripción de esta especie botánica concuerda con la información de varias fuentes bibliográficas (Tropicos, 2020; Karim, 2011; PRODECO y CIMES, 2018; Girault, 1987a; Navarro, 2012).

❖ Descripción General

- **Nombre común:** Airampu, airampo, Tunilla *soehrensii*
- **Nombre científico:** *Opuntia soehrensii* B&R
- **Clase:** *Equisetopsida* C. Agardh
- **Subclase:** *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- **Superorden:** *Caryophyllanae* Takht.
- **Orden:** *Caryophyllales* Juss. ex Bercht. Y J. Presl
- **Familia:** *Cactaceae*.
- **Género:** *Opuntia*.
- **Especie:** *Opuntia soehrensii*

❖ Descripción botánica

Cactus con matas densas, de 30 cm de alto. De tallo cilíndrico ovalado a redondo, aplanado, provisto de muchas espinas sedosas y aciculares. Flores rojas y/o amarillas. El fruto es una baya polisperma, pulposa y jugosa de color rojo, que contiene numerosas semillas globulosas rojas y cubiertas de un empaste semi – feculento rojo.

❖ Distribución

Cactus, crece en laderas y zonas pedregosas; desde 3600 – 4000 m de altitud. Siendo endémica en Bolivia, Perú, Argentina y Chile.

Según el International Plant Names Index (IPNI, 2020), es sinónimo de *Tunilla soehrensii* (Britton & Rose) D.R. Hunt & Iliff, la que a su vez tiene como 30 sinónimos.

2.2.2. Propiedades y usos medicinales de *O. soehrensii*

❖ Usos tradicionales

La *O. soehrensii* se encuentra dentro de la categoría de plantas medicinales con mayor potencialidad en Bolivia, resaltando su uso como inmunomodulador y antiviral (Terceros y otros, 2007). La siguiente tabla recopila información referente a los usos medicinales tradicionales de la *O. soehrensii* (Navarro, 2012; PRODECO y CIMES, 2018; Girault, 1987a; Pardo, 2002; S/A, 2002):

Cuadro 2-1 Usos medicinales tradicionales de la *O. soehrensii*

Usos	Modo de uso	Parte usada	Dosis	Preparación
Fiebre	Infusión	Semillas	3 veces / día	1 cuchara/Litro de agua 1 onza/ Litro de agua
Sarampión y escarlatina	Infusión y baño	Semillas	2 veces / día	----
Varicela	Infusión	----	----	----
Conjuntivitis	----	Semillas	----	1 cuchara/Litro de agua
Aftas en la boca	Infusión	Semillas	3 veces / día	----
	Aplicación con algodón	Semillas	----	1 cucharilla / 2 cucharas de agua hirviendo
Hipotensor	Masticación directa ó molida.	Semillas	----	----
	Infusión	Semillas	1 vez / día	1 onza / 2 litros de agua
Antidiabético	Infusión	Semillas	1 vez / día	----

Fuente: Navarro (2012), PRODECO y CIMES (2018), Girault (1987a), Pardo (2002) y S/A (2002)

Las semillas de *O. soehrensii* también se emplean con otros fines medicinales en otros países como Argentina y Perú, además de algunas propiedades ya expuestas, se usan como tónico, vermífugo, antiespasmódico, estomáquico, antidisentérico, hepático, hemostático, cordial, resfriados, antianémico, antiinflamatorio, analgésico, antiséptico, antidepresivo, para curar enfermedades oculares como la conjuntivitis, enfermedades de los riñones, para combatir la acidez, el herpes y para curar el susto (Puentes & Hurrell, 2015; Zdzislaw , 2008; Echeverría y otros, 2020).

Entre otros usos se encuentra: Tintóreo de lana de un color violeta, alimenticio, bebida refrescante, colorante de alimentos como chicha, mazamorra, etc. (Vidaurre y otros, 2006; Beck y otros, 2010).

❖ Usos medicinales probados científicamente

Un estudio emplea extracto acuoso de *O. soehrensii*, para caracterizar su actividad biológica anti-virus Herpes simplex tipo 2 in vitro, de forma previa y durante el proceso de infección viral activa en células huésped. Los resultados de este estudio durante el proceso infeccioso, demuestra que el extracto inhibe la penetración viral en un 80% a 21mg/mL también demuestra que ejerce un efecto inhibitorio de los procesos de replicación viral en células infectadas a CE_{50} de 6.7 +/-0.56 mg/mL (medido por Reducción de la Infectividad viral), 3.8 +/- 0.07 mg/mL (medido por Reducción del Efecto Citopático) y 12 +/-0.80 mg/mL (Medido por Reducción de Placas de Lisis). Este estudio también demuestra que dicho extracto presenta actividad preventiva de la infección por VHS-2 a una CE_{50} de 0.012+/-0.02 mg/mL (medido por Reducción de la infectividad Viral), 0.029+/- 0.71 mg/mL (medido por Reducción del Efecto Citopático) y el valor de 0.95 +/-0.11 mg/mL (medido por Reducción de placas de lisis) no observándose efectos tóxicos a las concentraciones evaluadas (Zambrana, 2007).

❖ Evaluación del efecto antiviral frente al Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRS)

Esta publicación utiliza extracto acuoso de semillas de *O. soehrensii* para evaluar su actividad antiviral en el que determinan la Concentración Efectiva Media (CE_{50}) in vitro frente al VRS. Sus resultados demuestran que el extracto de esta especie botánica, posee potente actividad antiviral cuando es adicionada en cultivos de células a ser infectadas como a células ya infectadas. Alcanzando la CE_{50} a concentraciones de 21; 2,1 y 0,21mg/mL (Guarachi, 2005).

❖ Evaluación del efecto antihipertensivo

Este estudio evalúa el extracto hidroalcohólico de las semillas de *O. soehrensii* (*Tunilla soehrensii* Britton & Rose) en ratas, evidenciando una reducción de la presión sistólica y

diastólica a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg. Los resultados de este estudio también ponen en evidencia que la dosis más alta es la que mejor performance presentó respecto al medicamento control. Demostrando de esta manera que el extracto hidroalcohólico de las semillas de *O. soehrensii* presenta efecto antihipertensivo (Merino & Perez, 2019).

❖ Evaluación de otros efectos

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron la actividad antioxidante del extracto de la especie *O. soehrensii* sobre tumores de ovario, cervicales y vejiga en ratones con cáncer de ovario, considerando a las betalainas como los principios activos más importantes que contribuyen con estos efectos (Godenzi, 2013).

2.2.3. Generalidades del herpes virus

Los herpes virus se clasifican en alfa-herpesvirus, beta-herpesvirus y gama-herpesvirus. Los alfa-herpesvirus se sub-clasifican en el siguiente cuadro:

Cuadro 2-2 Sub clasificación de los alfa-herpesvirus

Familia / Subfamilia	Integrantes	Nombre Oficial	Nombre Común
Herpesviridae /	Herpes Simple Tipo 1	VHS-1	Herpes Labial
Alfaherpesvirinae	Herpes Simple Tipo 2	VHS-2	Herpes Genital
	Varicela	HVH-3	Varicela-Zoster

Fuente: Ramírez, y otros (2007)

El herpes genital es considerado como una enfermedad de transmisión sexual causada por los virus del Herpes simplex tipo 2 y el tipo 1 (Litter, 1988; CDC, 2014).

❖ Transmisión y sintomatología del herpes virus

El VHS-2 se transmite por vía sexual o a través de la infección genital materna al recién nacido, quedando asociado principalmente a lesiones genitales, lo que la convierte en una importante vía de entrada para el VIH y, por otro lado, la mayoría de las personas infectadas son asintomáticas o son tan leves que no los notan, por lo que la mayoría de personas infectadas no saben que tienen la infección (Ramírez y otros, 2007).

❖ Tratamiento para el herpes genital

Al no existir cura para el herpes, los medicamentos antivirales pueden prevenir o acortar la duración de los brotes durante el tiempo que la persona tome los medicamentos

(CDC, 2014). Los medicamentos antivirales convencionales más difundidos para el tratamiento del VHS-2, son aciclovir, valaciclovir y famciclovir, donde en algunos casos este tratamiento no responde, denotando un desarrollo de resistencia del VHS-2 a dichos medicamentos (Bermejo & Leiro, 2008; POZ, 2019; CDC, 2014).

2.2.4. Caracterización fisicoquímica de *O. soehrensii*

❖ Análisis proximal (parte comestible)

De acuerdo a diferentes autores, el análisis proximal de *O. soehrensii* se presenta a continuación en un cuadro de comparación:

Cuadro 2-3 Análisis proximal de *O. soehrensii*

Determinación	Unid.	Cantidad por 100 g de semilla fresca			Cantidad por 100 g de Semillas secas		
		Según (MSP, 2009)	Según (Jimenez, 2014)	Según (Apaza, 2017)	Según (Carpio & Portugal, 2014, pág. 59)	Según (Godenzi, 2013)	
Energía	kcal	49	-	-	379,26	-	-
Humedad (agua)	g	85.9	82.7	70.5	4,20	7.21	21.2
Proteínas	g	1.8	1.05	8.9	5,65	2.2	6.8
Grasa total	g	0.5	0.3	1.2	1.5	6.63	1,7
Carbohidratos totales	g	11.2	12.54	5.6	85,79	26.24	6,7
Fibra cruda	g	-	2.46	12	-	51.8	6,1
Cenizas	g	0.6	0.95	1.5	2,86	1.92	10,2
Calcio	mg	85	-	-	-	-	-
Fósforo	mg	0	-	-	-	-	-
Tiamina (vitamina B1)	mg	0.01	-	0.1	-	-	-
Riboflavina (vitamina B2)	mg	0.02	-	0.32	-	-	-
Niacina (Vitamina B3)	mg	24	-	-	-	-	-
Vitamina C	mg	-	-	10.3	-	-	-
				4			

Fuente: MSP (2009), Jiménez (2014), Apaza (2017), Carpio & Portugal (2014) y Godenzi (2013)

❖ Análisis proximal complementario

En el siguiente cuadro se describe la caracterización fisicoquímica de *O. soehrensii*.

Cuadro 2-4 Caracterización fisicoquímica de *O. soehrensii*

Parámetros	Resultados
pH	3,98 ± 0,02
Índice de madurez	157,14 ± 11,21
Acidez (% Ac. Cítrico)	0,07 ± 0,05
Sólidos solubles (°Brix)	11,0 ± 1,01
Densidad (g/cm ³)	1,027 ± 0,003

Fuente: Jiménez (2014)

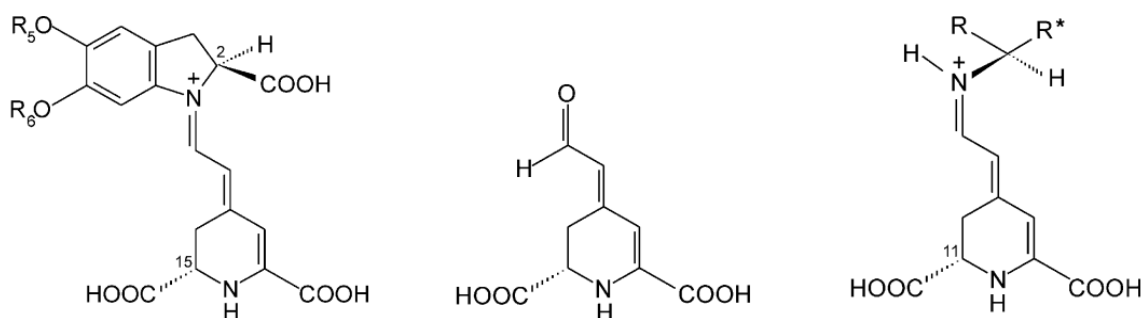
2.2.5. Compuestos químicos característicos de *O. soehrensii*

❖ Betaláinas

Según Kobayashi (2002), son pigmentos característicos solubles en agua que contienen nitrógeno que se acumulan en flores, frutos y ocasionalmente en el tejido vegetativo de la mayoría de las familias del orden vegetal Caryophyllales con la excepción de Caryophyllaceae y Molluginaceae. Las betaláinas están constituidas por dos grupos de estructuras, las betacianinas y las betaxantinas; se conocen alrededor de 50 betacianinas y 25 betaxantinas (Tipe & Lock, 1990).

Las betacianinas son de color rojo, resultan de la condensación del ácido betalámico y ciclo-Dopa [ciclo-3- (3,4-dihidroxiifenilalanina)], su fuerte cambio batocrómico de 50 a 70 nm en comparación con las betaxantinas se atribuye a la estructura aromática de la ciclo-Dopa por glicosilación con uno o dos monosacáridos (la unidad de azúcar más común la glucosa y menos frecuente la soforosa y la ramnosa), así como por acilación de los 5-O- o 6-O-glucósidos resultantes, es posible una gran variedad de estructuras de betacianina siendo la de mayor ocurrencia natural la betanina (véase FIGURA 2-2). Las betaxantinas son de color amarillo, son productos de condensación de ácido betalámico y aminoácidos o aminas. Dependiendo de la estructura particular del compuesto amino, la absorción máxima de betaxantinas varía entre 460 y 480 nm (Herbach y otros, 2006; Stintzing & Carle, 2004).

Figura 2-2 Estructura básica de betacianinas (izquierda), betaxantinas (derecha) y su bloque de construcción común ácido betalámico (centro)



Fuente: Stintzing & Carle (2004)

❖ Fuentes vegetales de betalaínas

La distribución de betalaínas en el reino vegetal está limitada a 10 familias del orden Caryophyllales o Centrosperma: Aizoaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didieraceae, Holophytaceae, Nyctaginaceae, Phytolacaceae y Portulacaceae. Importante considerar que cuando existen betalaínas no están presentes las antocianinas, significa que hay una exclusión mutua de betalaínas y antocianinas en el reino vegetal, sin embargo, pueden coexistir con otras clases de pigmentos de tipo flavonoides (Lock , 1997; Kobayashi, 2002; Azeredo, 2008).

❖ **Betacianinas:** Algunas de las betacianinas encontradas frecuentemente son betanina, gomphrenina I, amarantina, bougainvilleina, filocactina.

❖ **Betaxantinas:** Entre las betaxantinas más frecuentemente encontradas están la indicaxantina, portulaxantina I, vulgaxantina I, vulgaxantina II, miraxantina I, miraxantina II, miraxantina III, miraxantina V, musca-aurina I, dopaxantina.

❖ Ruta biosintética de betalaínas

Según Kobayashi (2002), un esquema actual de la ruta biosintética de betalaínas, que incluye tres enzimas, una tirosinasa, una dopa 4,5-dioxigenasa y una betanidina glucosiltransferasa. La tirosinasa bifuncional cataliza la formación de dopa y dopaquinona, la dioxigenasa la formación de 4,5-seco-dopa (véase FIGURA 2-3). Las ciclizaciones posteriores producen *ciclo*-dopa y ácido betalámico y las condensaciones de ácido betalámico con *ciclo*-dopa y aminoácidos o aminas conducen a betacianinas y betaxantinas.

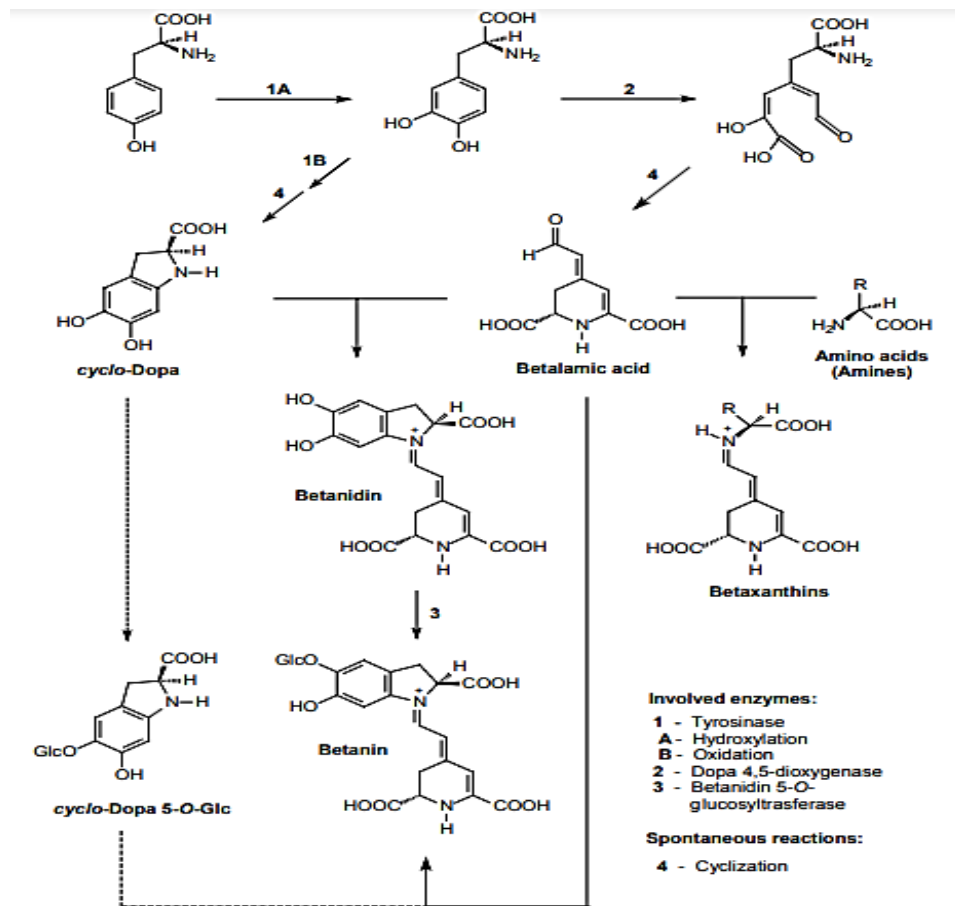
2.2.6. Características generales de betalaínas

2.2.6.1. Estructura química

Se dice que la estructura básica de las betalaínas se dilucidó en la década de 1960 por medios químicos (Kobayashi, 2002; Lock , 1997). Fueron Wyler & Dreiding (1957) quienes lograron aislar e identificar a la betanidina (cristales rojo violeta) de la raíz de *Beta vulgaris* y Piattelli & Minale (1964) identificaron la indicaxantina de los frutos de

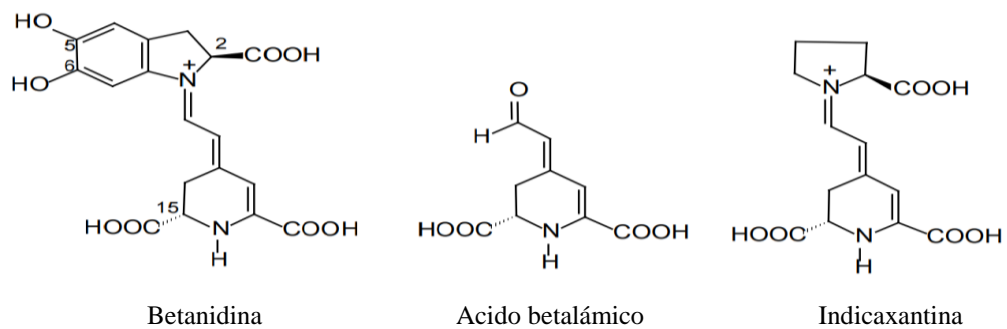
Opuntia ficus-indica (cristales amarillos) como derivados de imonio de ácido betalámico con *ciclo*-Dopa (betacianina) y prolina (betaxantina), respectivamente (véase FIGURA 2-4).

Figura 2-3 Esquema actual propuesto de biosíntesis de betalaína



Fuente: Kobayashi (2002)

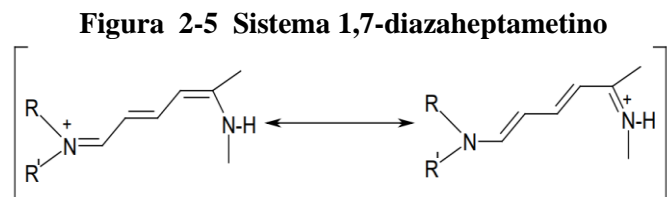
Figura 2-4 Estructuras de la betanidina, ácido betalámico e indicaxantina



Fuente: Kobayashi (2002)

2.2.6.2. Análisis espectrofotométrico

Es el sistema 1,7-diazaheptametino la estructura básica del cromóforo en una betalaína (véase FIGURA 2-5). Las betalaínas en general absorben la radiación visible en el rango de 476 a 600 nm con un máximo a 537 nm a pH 5,0. El termino betalaína describe a dos grupos de pigmentos, muy solubles en agua, relacionados química y biogénicamente, estos son, las betacianinas de color rojo violeta ($\lambda_{\text{max}} \approx 540$ nm) y las betaxantinas de color amarillo ($\lambda_{\text{max}} \approx 480$ nm). Las betacianinas muestran dos máximos de absorción, uno en el rango UV de 270–280 nm, debido a la *cyclo*-Dopa y una segunda en el rango visible de 535–540 nm, dependiendo del solvente (Azeredo, 2008).



Diversos estudios indican que los principales pigmentos de *Beta vulgaris* son betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina, de coloración rojo-violeta; la vulgaxantina I y vulgaxantina II de coloración amarilla (Azeredo, 2008).

2.2.6.3. Estabilidad de betalaínas y extracto de *O. soehrensii*

Investigaciones concernientes a los aspectos estructurales, aseveran que las betacianinas son más estables que las betaxantinas, a temperatura ambiente y altas temperaturas. Las estructuras glicosiladas de las betacianinas son más estables que sus agliconas, probablemente debido al mayor potencial de oxidación-reducción del primero, sin embargo, la estabilidad no parece mejorar con glicosilación adicional. La transformación de los glucósidos de betanina en sus respectivas agliconas produce un cambio batocrómico de 4 a 6 nm, estas agliconas son más lábiles y propensas a una mayor oxidación, que resulta en pérdidas de color rojo y posterior oscurecimiento (Azeredo, 2008; Stintzing & Carle, 2004).

❖ Efecto del pH

Aunque las betalaínas exhiben una amplia estabilidad de pH que varía de 3 a 7, las condiciones de pH más allá de este rango inducen fácilmente la degradación de la betalaína. Por debajo de pH 3,5 el máximo de absorción cambia hacia longitudes de onda más bajas, por encima de pH 7 el cambio es hacia longitudes de onda superiores, fuera del rango de pH (3,5–7,0) la intensidad de los espectros visibles disminuye (Herbach y otros, 2006; Wiley & Lee, 1978).

El pH óptimo para la estabilidad de la betanina oscila entre 4 y 6, sin embargo, las betaxantinas exhiben estabilidad a valores de pH ligeramente aumentados que oscilan entre 4 a 7, siendo la mayor estabilidad de la betaxantina a pH 5,5 que corresponde al pH óptimo de las betacianinas. Medios alcalinos provocan hidrólisis del enlace aldimina, mientras que la acidificación induce la recondensación de ácido betalámico y el compuesto amino (betaxantinas) o ciclo-Dopa 5-O- β -glucósido (betacianinas). A valores de pH bajos, se induce la isomerización del C15 de betanina y betanidina en isobetanina e isobetanidina, respectivamente, además de una deshidrogenación. También se afirmó que las soluciones de betanina son menos estables a pH 2 en comparación con pH 3 (Herbach y otros, 2006; Piattelli & Minale, 1964; Huang & von Elbe, 1987).

El tono de coloración de la betanina no es afectado en el rango de pH de 3.0 a 7.0, sin embargo, fuera de este rango de pH los cambios de color son asociados al cambio de pH. El pH óptimo para la degradación enzimática de betacianinas y betaxantinas está alrededor de 3,4. Se registra un cambio en el máximo de absorbancia de betanina a valores de pH por debajo de 3,0 y el ligero aumento de la absorbancia a 570-640 nm. Otro factor que afecta la estabilidad de la betalaína sobre el pH, son las altas temperaturas que desplazan el pH óptimo de la betacianina hacia 6, las condiciones anaeróbicas favorecen la estabilidad de la betanina a un pH más bajo (4.0–5.0) (Azeredo, 2008; Herbach y otros, 2006; Havlíková y otros, 1983). Además, en presencia de oxígeno, la betanina es más estable entre pH 5,5 y 5,8, mientras que en condiciones anaeróbicas los valores de pH más bajos de pH 4,0 a 5,0 son favorables (Huang & von Elbe, 1987). Además, el tratamiento

con álcali de indicaxantina genera ácido protocatecuico, haciendo imposible la regeneración de betaxantina (Piattelli & Minale, 1964).

En condiciones alcalinas y después del tratamiento con ácido, se observa la descomposición de la betanidina en ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico y ácido metilpiridina-2,6-dicarboxílico (Wyler & Dreiding, 1962). Sin embargo, los mecanismos de degradación de la betalaína en medios ácidos están lejos de ser claros.

Además, se informó que el tratamiento con ácido puede causar la formación de la 14,15-deshidrobetanina amarilla (neobetanina). De hecho, el ligero desplazamiento hipsocrómico e hipocrómico de absorbancia máxima de betanina en valores de pH debajo de 3,0, acompañado de un ligero aumento en la absorbancia a 640- 570nm, puede no ser explicado por ninguno de los mecanismos de degradación aclarados hasta ahora (Azeredo, 2008; Jackman & Smith, 1996).

Soluciones de extracto de *O. soehrensii* de pH de 3 y 8, luego de 7 días, sufren ligeros desplazamientos de sus longitudes de onda máxima de 536 nm a 535 nm y 537 nm respectivamente. Respecto a su intensidad de absorción luego de este tiempo, en general todos los pH ensayados sufren una disminución gradual, siendo mucho menor a pH 4 y 5. Por tanto los pH óptimos vendrían a ser a pH 4 y 5, debido a que soluciones que contenían extracto acuoso de *O. soehrensii* a pH 4 y 5 almacenadas durante 7 días a 4°C, mantuvieron su longitud de onda de máxima absorción de 536 nm respecto a las soluciones de pH 3, 6, 7 y 8, la de pH 8 mostró mayor degradación (Tipe & Lock, 1990).

Otro estudio de estabilidad del extracto de *O. soehrensii*, reporta a la solución de pH 5 como la más estable luego de almacenarla por el periodo de 4 semanas, permitiendo una disminución hasta el 79 % para betacianinas y hasta el 63 % para betaxantinas respecto al contenido inicial (Jimenez, 2014).

❖ Efecto de la actividad de agua (aw)

Tomando en cuenta a las reacciones hidrolíticas dependientes del agua, se considera a la actividad del agua como un factor crucial para la susceptibilidad de la betanina hacia la escisión del enlace aldimina (Herbach y otros, 2006).

❖ Efecto de la temperatura

Estudios reportaron tasas crecientes de degradación de betalaína resultante del aumento de las temperaturas. Se observó degradación térmica de betanina en solución de jugos de remolacha roja y pitaya morada, siguiendo una cinética de reacción de primer orden. Durante el procesamiento térmico, la betanina puede ser degradada por isomerización, descarboxilación o escisión (por calor o ácidos), lo que resulta en una reducción del color rojo y, finalmente, la aparición de un color marrón claro. La deshidrogenación de betanina conduce a la formación de neobetanina, provocando un cambio a amarillo (véase FIGURA 2-6) (Schwartz & von Elve, 1983; Azeredo, 2008; Huang & von Elbe, 1985).

Si bien el color de la betanina se mantiene tras la isomerización C15-O, la descarboxilación en C17 provoca un cambio hipsocrómico del pico de absorción de 538 a 505 nm, lo que da como resultado un color rojo anaranjado (Azeredo, 2008).

Un estudio de la degradación térmica de la betanina en tres sistemas (agua/glicerol, agua/etilenglicol y agua/etanol) a temperaturas entre 60 °C y 86 °C, demostraron que la estabilidad más baja de la betanina estaba en el sistema agua/etanol, apoyando la hipótesis de que el primer paso de la degradación térmica de la betanina es el ataque nucleofílico en el enlace aldimina, ya que el etanol tiene una alta densidad de electrones en el átomo de oxígeno. Otros estudios informaron de una rápida degradación de betacianinas en soluciones etanólicas, lo que conduce a una descarboxilación simple y doble. Además, la identificación de diferentes productos de monodecarboxilación en soluciones de betacianina etanólica y acuosa sugiere diferentes mecanismos de descarboxilación dependiendo del solvente (Altamirano y otros, 1993; Wybraniec, 2005; Wybraniec & Mizrahi, 2005; Azeredo, 2008).

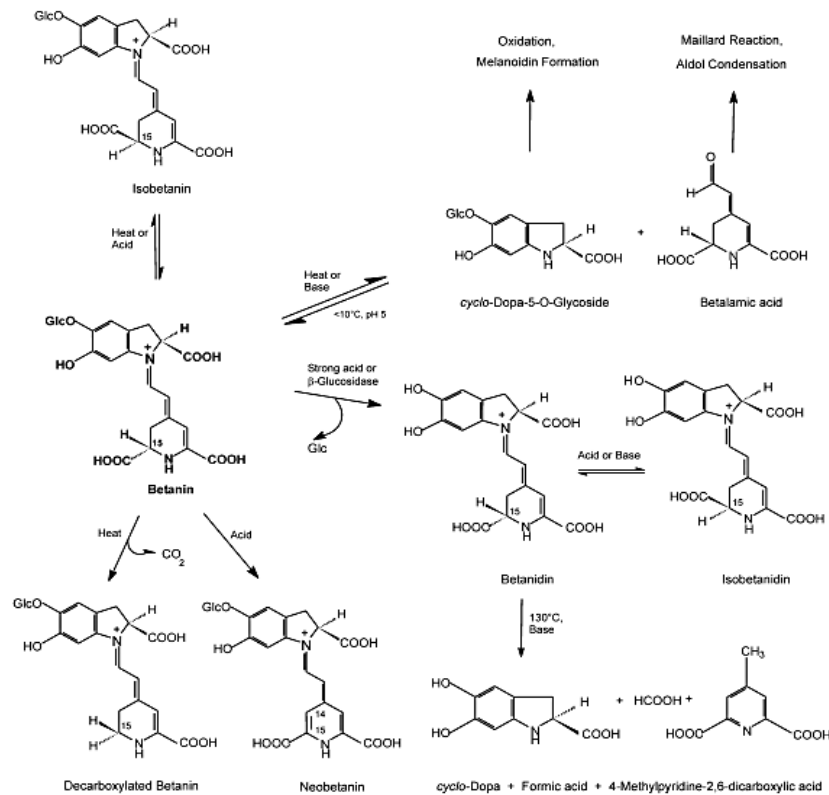
Se identificaron betacianinas con diferentes grados de descarboxilación al igual que sus correspondientes neoderivados como productos de degradación por calentamiento de las betacianinas del jugo de remolacha roja y extracto de pitaya púrpura (Wybraniec & Mizrahi, 2005; Wybraniec, 2005).

Un estudio indica que la betanina puede regenerarse a partir de sus productos de hidrólisis de degradación primarios, esto implica una resíntesis parcial de la condensación

del grupo amina del *ciclo-Dopa-5-O* glicósido con el grupo aldehído del ácido betalámico cuando los extractos se mantienen durante algún tiempo a una temperatura por debajo de 10 °C y un pH de alrededor de 5,0. Dándose el mayor porcentaje de regeneración a pH 6 (Huang & von Elbe, 1985; Azeredo, 2006; Huang & von Elbe, 1987).

La siguiente figura es una propuesta de degradación térmica de la betanina (Herbach y otros, 2004):

Figura 2-6 Vías de degradación de la betanina



Fuente: Herbach, Stintzing, & Carle (2004)

Un estudio demuestra que, a 25 °C de temperatura, la velocidad de degradación de la solución de extracto de *O. soehrensii* a pH de 4 y 5 es menor, respecto a otras soluciones de diferente pH, aunque es mínima en general para todas las soluciones a pH 3, 4, 5, 6, 7 y 8 hasta los 30 minutos transcurridos. A 50 °C de temperatura, las soluciones de extracto de *O. soehrensii* a pH 4 y 5 presentan menor degradación respecto a las soluciones de pH diferente, siendo las de pH 3 y 8 los que sufren una mayor degradación. A 75 °C y 100 °C

de temperatura, la velocidad de degradación del extracto de *O. soehrensii* es muchísimo mayor en general a mucho menos del 50 % de la intensidad inicial (Tipe & Lock, 1990). Otro estudio de estabilidad del extracto de *O. soehrensii*, muestra resultados luego de almacenar soluciones de dicho extracto a temperatura de 4°C y pH 5 durante 4 semanas, al cabo del cual, observa que a dichas condiciones se retiene más pigmento respecto a otras soluciones almacenadas a temperaturas de 19°C y 63°C (Jimenez, 2014).

❖ Efecto de la presencia y ausencia de oxígeno

Las betalaínas reaccionan con el oxígeno molecular, es así que una publicación reporta como resultado una disminución de la degradación de betanina luego del almacenamiento de soluciones de dicho pigmento a bajos niveles de oxígeno, estos niveles favorecen que el pigmento se recupere parcialmente después de degradados (von Elbe y otros, 1974; Azeredo, 2008; Attoe & von Elve, 1985).

Otro estudio revela que el extracto de *O. soehrensii* en solución a pH 4 y 5, presenta un decrecimiento de sus absorbancias en proporciones reducidas después de 1 y 7 semanas de almacenamiento a 4°C en oscuridad, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, siendo las soluciones de pH 3, 6, 7 y 8 las que mostraron mayor degradación (Tipe & Lock, 1990).

❖ Efecto de aditivos antioxidantes

La estabilidad de las betalaínas mejora con la adición de antioxidantes, es así que en un estudio se indica que los ácidos ascórbico, isoascórbico, metafosfórico y glucónico, mejoraron la regeneración de los pigmentos del jugo de remolacha roja tras ser sometidos a un proceso de calentamiento, su efecto ha variado dependiendo del pH de las soluciones (Han y otros, 1998).

Algunos antioxidantes alimentarios, como los ácidos ascórbico e isoascórbico, mejoran la estabilidad de betalaínas, siendo más efectivo el ácido ascórbico con una mayor retención de pigmento que con ácido isoascórbico, pero se observa un efecto prooxidante del ácido ascórbico a una concentración de 1000 mg/kg, De manera contradictoria algunos estudios informaron que el ácido isoascórbico tuvo un mejor efecto sobre la estabilidad de la betanina que el ácido ascórbico (Skopińska y otros, 2015; Herbach y otros, 2006;

García Barrera y otros, 1998; Attoe & von Elbe, 1982; Pasch & von Elbe, 1979; Bilyk & Howard, 1982).

Ya de manera particular en la solución de extracto de *O. soehrensii*, los antioxidantes que surten buen efecto son el ácido tartárico, benzoato de sodio, ácido cítrico y galato de propilo, siendo más efectivos en las soluciones de pH 4 y 5 (Tipe & Lock, 1990).

❖ Efecto de la luz

La estabilidad de la betalaína se ve afectada por la exposición a la luz, mostrando una relación inversa entre la estabilidad de la betalaína y la intensidad de luz (en el rango 2200–4400 lux). La degradación de las betalaínas inducida por la luz depende del oxígeno, porque los efectos de la exposición a la luz son insignificantes en condiciones anaeróbicas (Azeredo, 2008).

❖ Efecto de los metales

Algunos cationes metálicos como hierro, cobre, estaño y aluminio, aceleran la degradación de la betanina. Puede producirse una complejación metal-pigmento, seguido de cambios batocromáticos e hipocromicos. Se encontró que el jugo de remolacha es menos susceptible al impacto negativo de iones metálicos en comparación con soluciones de betanina pura, probablemente debido a la presencia de agentes complejantes de metales en el jugo. Agentes quelantes como el ácido cítrico y el EDTA estabilizan la betanina contra la degradación catalizada por metales (Pasch & von Elbe, 1979; Azeredo, 2008).

2.2.7. Identificación de compuestos químicos en extracto de *O. soehrensii*

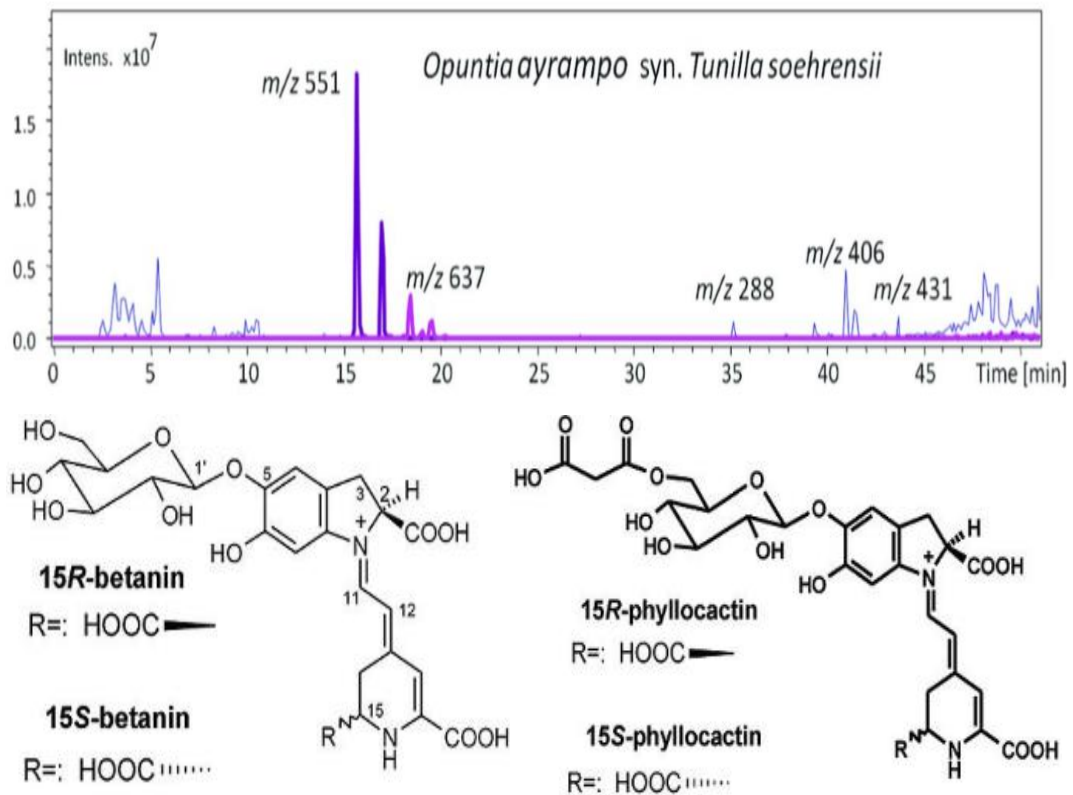
En el presente capítulo se describe la identificación de compuestos en extracto de *O. soehrensii*.

❖ Betalaínas y otros compuestos

Las betalaínas identificadas en el extracto crudo del fruto de *O. soehrensii* mediante la técnica cromatográfica preparativa en contracorriente de alta velocidad de pares de iones (IP-HSCCC) y LC-ESI-MS/MS, son la 15S/15R-betanina ($[M+H]^+$ m/z 551) y 15S/15R-filolactina ($[M+H]^+$ m/z 637); además se han identificado compuestos lipofílicos de masa $[M+H]^+$: m/z 431, m/z 406 y m/z 288 (véase GRÁFICO 2-1). De manera similar, en

Opuntia ficus (purpura) se han identificado 15S/15R-betanina ($[M+H]^+$ de m/z 551), indicaxantina ($[M+H]^+$: m/z 309), compuestos lipofílicos de masa molecular ($[M+H]^+$: m/z 379, m/z 513, m/z 431) y compuestos con masa molecular de $[M+H]^+$: m/z 484, m/z 498, m/z 406 y m/z 288 (Jerz y otros, 2013).

Gráfico 2-1 Perfil LC-ESI-MS y estructuras químicas identificadas en el pigmento *Opuntia spp*

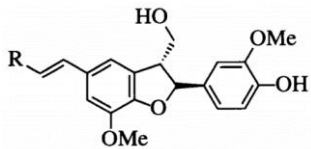
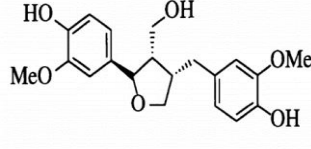
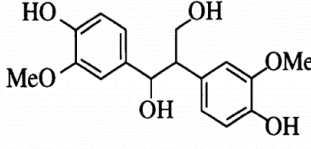


Fuente: Perfil LC-ESI-MS de pigmento *Opuntia spp.* extractos medidos en modo de ionización positiva (m/z 50-2200). (Jerz y otros, 2013)

❖ Lignanos

Se han identificado cuatro compuestos de tipo lignanos en el fruto de *O. soehrensii* a través de sucesivas extracciones con solventes n-hexano y metanol, los que luego de ser purificados, fueron analizados mediante ODS MPLC con MeOH-H₂O (4:5), logrando identificar los compuestos citados en el cuadro 2-5 (Shirota y otros, 1997).

Cuadro 2-5 Lignanos de *O. soehrensii*

Estructura química	 <p>1 : R = CHO 2 : R = CH₂OH</p>	 <p>3</p>	 <p>4</p>
Denominación	<p>1: [-]-dehydrodiconiferyl alcohol C₂₀H₂₂O₆ PM: 358.39 g/mol</p> <p>2: [-]-balanophonin C₂₀H₂₀O₆ PM: 356.4 g/mol^a</p>	<p>3: [+] -lariciresinol C₂₀H₂₄O₆ PM: 360.4 g/mol^a</p>	<p>4: 1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,3-diol C₁₇H₂₀O₆ PM: 320.3 g/mol^a</p>

Fuente: Shirota y otros (1997), ^aCNIB (2020)

2.2.8. Extracción de fitofármacos (materias primas vegetales)

La elección del solvente a ser usado en el proceso de extracción, dependerá de si se quiere obtener un extracto que tenga la mayor parte de constituyentes químicos de la planta o que contenga solamente constituyentes químicos con una determinada característica. El aspecto más importante a considerar es su grado de toxicidad por lo cual será de uso común las mezclas hidro-alcohólicas (Valverde, 2000).

Según datos de investigación, el agua extrae niveles más altos de pigmentos de frutos de *Opuntia*, que el etanol: agua. Otros estudios indican una mayor extracción de betalaína con etanol-HCl (relación v/v, 99: 1) que con agua. Sin embargo, la extracción acuosa promueve una mejor estabilidad de los pigmentos. Considerando que una ligera acidificación del medio de extracción mejora la estabilidad de la betacianina y evita oxidación por polifenoxidasas. A escala de laboratorio, las betalaínas pueden extraerse mediante varios métodos, como difusión-extracción, extracción sólido-líquido, ósmosis inversa y ultrafiltración (Azeredo, 2008).

Existen estudios de extracción de betalaínas de *O. soehrensii*, que determinaron las mejores condiciones para lograr un mayor rendimiento de estos compuestos (246,9 mg de betalaínas/100 g de muestra) a una temperatura de 20 °C, están relacionadas con el tiempo y la velocidad de agitación (Justo, 2018).

Otro estudio afirma que existe influencia significativa de la temperatura, porcentaje de solvente, pH y tiempo en la extracción de pigmentos de *O. soehrensii* (fenoles totales,

betacianinas totales), sus resultados indican que las betacianinas son más solubles en agua a concentraciones no mayores al 30% de etanol (96°), valores de pH debajo de 4.5 y temperaturas inferiores a 50 °C favorecen una buena extracción (Apaza, 2017).

En términos comerciales, el rojo remolacha de la raíz de *B. vulgaris*, es el más explotado en cuanto a su alto contenido de betalaínas, cuyo rendimiento en términos de betanina está entre el 0,4 a 1,0 %. Por otro lado, se han identificado betalaínas en las semillas del fruto de la *O. soehrensii*, considerándose como una fuente potencial que contienen alrededor del 1,0% de betanina (Lock , 1997; Cabello & Lock, 2003)

2.2.9. Excipientes

Los excipientes citados a continuación describen las características propias para el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas de aplicación oral (Rowe y otros, 2009)

❖ Almidón de maíz:

Se presenta como un polvo fino, blanco o blanquecino, inodoro, insípido e impalpable. Está conformado por amilosa que es un polímero lineal y amilopectina que es un polímero ramificado, dos polisacáridos basados en α - (D) -glucosa. Es un excipiente con función múltiple que se citan a continuación:

Cuadro 2-6 Funciones del almidón de maíz

Función	Aplicación
Diluyente	Se utiliza para la preparación de triturados estandarizados de colorantes, fármacos potentes y extractos de hierbas.
Aglutinante	Como pasta de almidón recién preparada se usa en una concentración de 3 a 20% p/p (generalmente 5 a 10%), para la granulación húmeda.
Antiadherente y lubricante	Del 3 a 10% p/p en la formación de tabletas.
Desintegrantes	En concentraciones de 3 a 25% p/p; una concentración típica es de 15%.

Fuente: Según Rowe y otros (2009)

Las propiedades típicas del almidón de maíz, se hallan descritas en los cuadros 2-7 y 2-8, sumando a estas su viscosidad en dispersiones acuosas que muestran una reopexia

significativa a concentraciones mayores al 40% p/p. La temperatura de hinchamiento y gelatinización es de 64 °C; 71 °C (al 20% p/p en agua).

Cuadro 2-7 Propiedades típicas de excipientes de interés

Excipiente	Densidad (aparente, apisonada, verdadera)	Fluidez	Higroscopicidad	Solubilidad	Acidez/Alcalinidad
Almidón	0.51 g/cm ³ ; 0,73 g/cm ³ ; 1,478 g/cm ³	Cohesivo y tiene flujo deficiente.	Higroscópico al 50% de HR	Insoluble en etanol frío (96%) y en agua fría.	pH de 4.0 a 8.0 (dispersiones acuosas)
Lactosa	0.71 g/cm ³ ; 0.88 g/cm ³ ; 1.589 g/cm ³ (S.Tab 21AN)	-----	Débilmente higroscópico ^a	Soluble en agua; escasamente soluble en etanol (95%) y éter; 40 g/100 mL a 25 °C.	-----
Celulosa microcristalina	0,32 g/cm ³ ; 0,45 g/cm ³ ; 1.59 g/cm ³ (A. PH-101)	1.41 g/s (Emcocel 90M). 49° de ángulo de reposo para Ceolus KG	Variable de acuerdo al grado, entre débilmente higroscópica ^a a higroscópica	Insoluble en agua, ácidos diluidos y disolventes orgánicos; ligeramente soluble en hidróxido de sodio al 5% p/v.	-----
Gelatina	1,32 g/cm ³ (tipo A); 1,28 g/cm ³ (tipo B)	-----	No higroscópico ^a	Soluble en agua >40 ° C, gelifica al enfriarse a 35-40 °C. Soluble en glicerina, ácidos y álcalis. Ácidos o álcalis fuertes provocan precipitación. Insoluble en etanol (95%), metanol.	Solución acuosa al 1% p/v a 25 °C: pH = 3.8-5.5 (tipo A); pH=5,0-7,5 (tipo B).
Povidona	0,34 g/cm ³ ; 0,46 g/cm ³ ; 1.180 g / cm ³ (Plasdone)	20 g/s para povidona K-15; 16 g/s (povidona K-29/32)	Es muy higroscópica, incluso a HR bajas.	Fácilmente soluble en agua, ácidos, etanol (95%), metanol y; insoluble en éter, hidrocarburos y aceite mineral.	pH = 3,0-7,0 (solución acuosa al 5% p/v)
Estearato de magnesio	0.159 g/cm ³ ; 0.286 g/cm ³ ;1.092 g/cm ³	Polvo cohesivo que fluye deficientemente.	No higroscópico ^a	Insoluble en etanol (95%), éter y agua; ligeramente soluble en benceno caliente y etanol caliente (95%).	-----
Croscarmelosa sódica	0.529 g/cm ³ ; 0.819 g/cm ³ ; 1.543 g/cm ³	-----	Higroscópico	Insoluble en agua. Se hincha rápidamente a 4-8 veces su volumen original en agua. Insoluble en etanol	pH = 5,0-7,0 en dispersiones acuosas

Fuente: ^a Cameli Pons & Cameli Aguilar (2001), Rowe y otros (2009)

❖ Lactosa

La lactosa anhidra se presenta en forma de polvo o partículas cristalinas de color blanco a blanquecino. Se encuentran disponibles comercialmente varias marcas diferentes de

lactosa anhidra que contienen β -lactosa anhidra y α -lactosa anhidra. La lactosa anhidra normalmente contiene 70-80% de β -lactosa anhidra y 20-30% de α -lactosa anhidra. Es un excipiente para comprimidos directamente comprimibles, diluyente y aglutinante de tabletas. Sus propiedades típicas se detallan en los cuadros 2-7 y 2-8.

Cuadro 2-8 Incompatibilidades, seguridad, estabilidad y condiciones de almacenamiento de excipientes de interés

Excipiente	Incompatibilidades	Seguridad	Estabilidad y condiciones de almacenamiento
Almidón	Incompatible con sustancias fuertemente oxidantes.	Considerada un ingrediente alimentario, un material esencialmente no tóxico y no irritante.	El almidón seco es estable si se protege de la alta humedad. Es química y microbiológicamente inerte en condiciones normales de almacenamiento.
Lactosa	Incompatible con oxidantes fuertes. Interactúa con las aminas primarias y secundarias (reacción de Maillard) almacenado a alta humedad durante períodos prolongados.	Las reacciones adversas se deben a la intolerancia a la lactosa en individuos con deficiencia de la enzima intestinal lactasa; se asocia a la ingestión oral de cantidades superiores a las que se encuentran en formas farmacéuticas sólidas.	El crecimiento de moho puede ocurrir en condiciones de humedad (>80% HR). Puede desarrollar una coloración marrón durante el almacenamiento, acelerando la reacción en condiciones cálidas y húmedas a 80 °C y 80% de HR, se ha demostrado que las tabletas que contienen lactosa anhidra se expanden 1.2 veces después de un día.
Celulosa microcristalina	Incompatible con agentes oxidantes fuertes.	Material relativamente no tóxico y no irritante. No se absorbe sistémicamente después de la administración oral.	Es un material estable, aunque higroscópico. El material a granel debe almacenarse en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco.
Gelatina	Es un material anfótero y reaccionará con ácidos y bases botánicos; con aldehídos y azúcares aldehídicos, polímeros aniónicos y catiónicos, electrolitos, iones metálicos, plastificantes, conservantes, oxidantes fuertes y tensioactivos.	Cuando se utiliza en formulaciones orales, puede considerarse un material no tóxico y no irritante.	Seca es estable en el aire. A temperaturas >50 °C, las soluciones acuosas pueden sufrir despolimerización lenta y puede producirse reducción en la resistencia del gel al reajustarse. La despolimerización se vuelve más rápida a temperaturas superiores a 65 °C.
Povidona	La eficacia de algunos conservantes, p. ej. timerosal, puede verse adversamente afectado por la formación de complejos con povidona. Puede contener peróxidos como contaminantes traza.	Consumida por vía oral, puede considerarse no tóxica, ya que no se absorbe en el tracto gastrointestinal. No tiene ningún efecto irritante en la piel y no causa sensibilización.	La povidona se oscurece hasta cierto punto al calentarla a 150 °C, con una reducción de la solubilidad acuosa. Es estable a un ciclo corto de exposición al calor de 110-130 °C.
Estearato de magnesio	Incompatible con ácidos, álcalis y sales de hierro. Evite mezclar con materiales oxidantes fuertes. No se puede utilizar en productos que contengan aspirina, algunas vitaminas y la mayoría de las sales alcaloides.	Se considera no tóxico después de la administración oral. El consumo oral de grandes cantidades puede producir un efecto laxante o irritación de las mucosas.	Es estable y debe almacenarse en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco.
Croscarmelosa sódica	Incompatible con ácidos fuertes o con sales solubles de hierro y otros metales como aluminio, mercurio y zinc.	Se considera no tóxica y no irritante. puede tener un efecto laxante, aunque con las cantidades utilizadas es improbable.	Es un material estable, aunque higroscópico. La croscarmelosa sódica debe almacenarse en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco.

Fuente: Rowe y otros (2009e)

❖ **Croscarmelosa sódica**

Se presenta como un polvo inodoro, blanco o blanco grisáceo. Se utiliza en formulaciones farmacéuticas orales como desintegrante de tabletas y cápsulas. En las formulaciones de comprimidos, se puede utilizar en procesos de compresión directa y granulación húmeda. Se pueden usar concentraciones de hasta 5% p/p como desintegrante de tabletas. Sus propiedades típicas se detallan en los cuadros 2-7 y 2-8.

❖ **Estearato de magnesio**

Es un polvo impalpable, muy fino, de color blanco claro, precipitado o molido, de baja densidad aparente, que tiene un ligero olor a ácido esteárico y un sabor característico. El polvo es graso al tacto y se adhiere fácilmente a la piel. Se utiliza principalmente como lubricante en la fabricación de cápsulas y comprimidos en concentraciones entre 0,25% y 5,0% p/p.

La velocidad de disolución del comprimido y la resistencia al aplastamiento disminuye a medida que aumenta el tiempo de mezcla y también puede aumentar la friabilidad de la tableta. La reducción de la disolución causada por los efectos del estearato de magnesio en algunos casos puede superarse al incluir un desintegrante altamente hinchante en la formulación. Las propiedades típicas de este excipiente se detallan en los cuadros 2-7 y 2-8.

❖ **Celulosa microcristalina**

Es una celulosa purificada parcialmente despolimerizada que se presenta como un polvo cristalino blanco, inodoro e insípido compuesto de partículas porosas. Está disponible comercialmente en diferentes tamaños de partículas y grados de humedad que tienen diferentes propiedades y aplicaciones. Se usa principalmente en formulaciones aglutinantes/diluyentes de tabletas y cápsulas, donde se usa tanto en granulación húmeda como en procesos directos. También presenta algunas propiedades adsorbentes, lubricante y desintegrantes que la hacen útil para formar tabletas. Más de sus propiedades típicas se detallan en los cuadros 2-7 y 2-8.

❖ **Gelatina**

La gelatina se presenta como un sólido quebradizo, vítreo, de color ámbar claro a ligeramente amarillento. Es prácticamente inodoro e insípido, está disponible como láminas, escamas y gránulos translúcidos, o como polvo grueso. Entre otras aplicaciones que tiene, también se utiliza como aglutinante de tabletas, agente de recubrimiento y como agente de aumento de la viscosidad para soluciones y semisólidos. Más de las propiedades típicas de este excipiente se detallan en los cuadros 2-7 y 2-8.

❖ **Povidona**

Se presenta como un polvo higroscópico fino, de color blanco a blanco cremoso, inodoro o casi inodoro. Se usa como aglutinante, desintegrante y diluyente de tabletas; también como agente de suspensión. La viscosidad (dinámica) depende tanto de la concentración como del peso molecular del polímero empleado, otras propiedades típicas complementarias se detallan en los cuadros 2-7 y 2-8.

2.3. Fase de formulación

Esta fase comprende lo siguiente:

- ❖ Análisis de los factores que inciden en las características biofarmacéuticas.
- ❖ Elección del método de fabricación.
- ❖ Selección de los excipientes (Mora, 2012)

2.3.1. Elección del método de fabricación de comprimidos

De acuerdo a Vila (2001), los comprimidos son formas farmacéuticas sólidas de dosificación unitaria obtenidas por compresión mecánica de granulados o mezclas pulverulentas de uno o varios principios activos con adición, en la mayoría de las ocasiones, de diversos excipientes.

La obtención de comprimidos, requiere que el material que se va a comprimir posea ciertas características físicas y mecánicas: capacidad de fluir libremente, cohesividad y lubricación. Como la mayoría de los principios activos no poseen dichas características, por si mismos, es necesaria la adición de una serie de excipientes que nos permitirán la obtención de comprimidos por diferentes métodos (véase CUADRO 2-9 y FIGURA 2-7).

Cuadro 2-9 Características que confieren los excipientes en la formulación de comprimidos

Función de los excipientes	Ejemplos
Facilitan su manipulación y compresión satisfactorias (flujo y cohesividad).	Diluyentes, aglutinantes, adsorbentes, deslizantes y lubricantes
Físicas y biofarmacéuticas deseables al comprimido.	Disgregantes, humectantes, estabilizantes, aromatizantes, colorantes, agentes edulcorantes, saborizantes,

Fuente: Vila (2001)

Figura 2-7 Fabricación



Fuente: Vila (2001)

2.3.2. Selección de excipientes mediante diseños estadísticos experimentales

Tal como señala Quispe (2009) en investigaciones industriales, normalmente, el resultado depende de varios factores interrelacionados. La aplicación de métodos estadísticos y diseños experimentales es más efectiva y eficiente que las formas tradicionales que se usan en la industria.

2.3.3. Diseños completos: Diseño factorial completo

Se dice que un experimento factorial permite investigar todas las combinaciones posibles de los niveles de dos o más factores o condiciones en cada prueba completa. Donde el objetivo es investigar los resultados experimentales en casos en los que interesa estudiar el efecto de diversas condiciones de experimentación y sus interacciones. Su desventaja es el elevado volumen de muestras que se deben manejar (Quispe, 2009; Ponce D`León, 2013).

2.3.4. Diseños reducidos: Diseño factorial fraccionados saturados

Fueron desarrollados por R.L. Plackett y J.P. Burman, se consideran como diseños de diagnóstico que se deben usar para determinar cuáles son los factores relevantes, de esta

manera estudiar los efectos de las interacciones entre ellas, se implementan experimentos factoriales de seguimiento. Este diseño ofrece un método muy conveniente para el tamizaje de un gran número de variables, desarrollando un mínimo de experimentos. Ej. para 7 factores un diseño factorial completo necesita $2^7 = 128$ experimentos, con estos diseños solo se requieren 8 experimentos (Ponce D`León, 2013; Quispe, 2009).

2.3.5. Criterios de evaluación de comprimidos

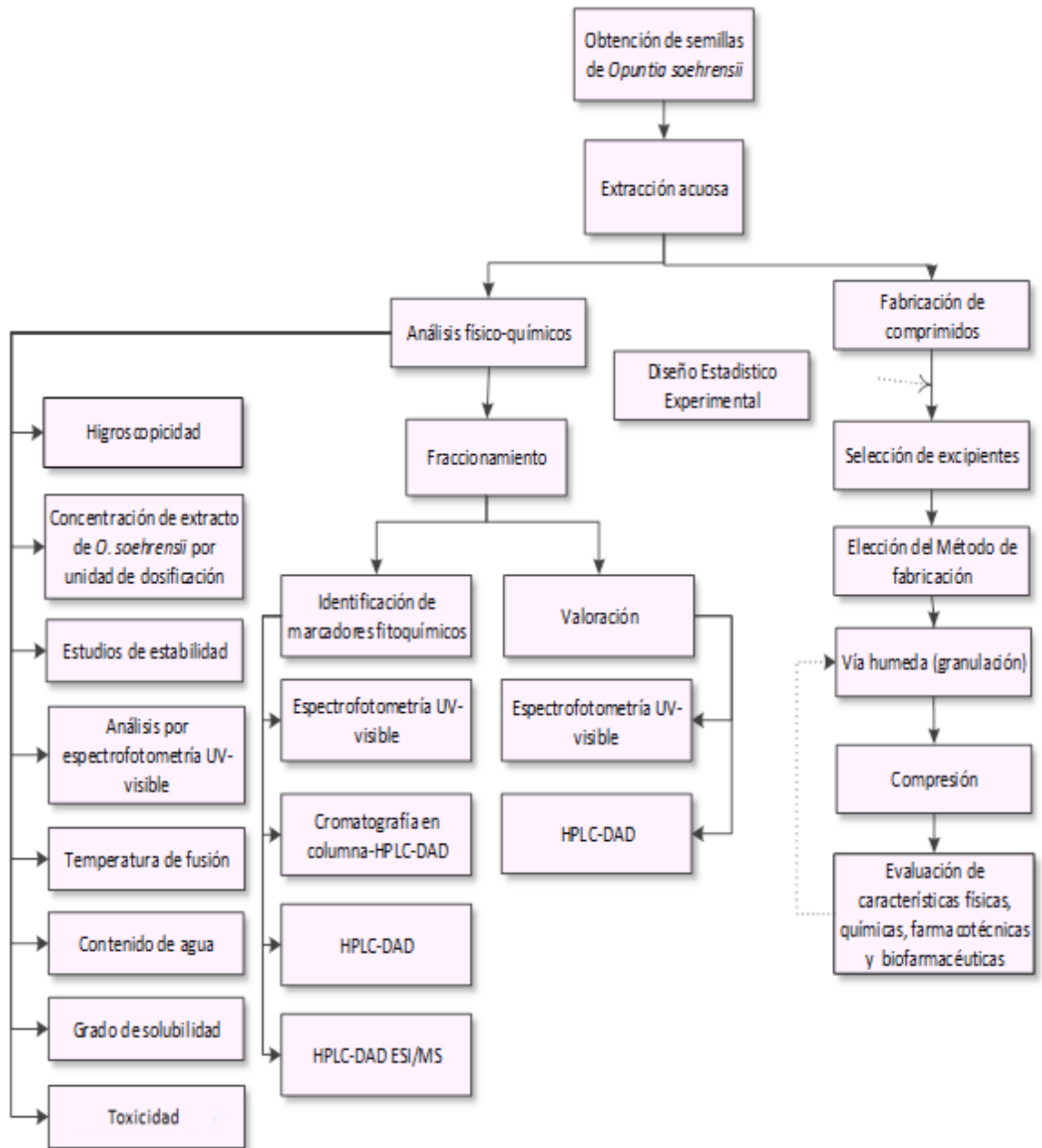
Los controles que habitualmente se realizan sobre muestras tomadas al azar de lotes terminados son múltiples y de diferente naturaleza, incluyendo características físicas, químicas e indicadores de las propiedades biofarmacéuticas (Olivero, 1982; Vila, 2001).

3. Capítulo: Metodología de la investigación

3.1. Esquema metodológico

El esquema metodológico que se sigue en la presente investigación es la siguiente:

Figura 3-1 Esquema metodológico



Fuente: elaboración propia.

3.2. Tipo de investigación

El presente estudio de investigación, corresponde a un corte de tipo longitudinal, porque se efectuará en diferentes etapas de tiempo continuo y prospectivo. Por la profundidad de la investigación es un estudio de tipo correlativo y de tipo experimental.

3.3. Diseño de investigación

El diseño del presente estudio de investigación es de tipo cuantitativo, porque a través de la aplicación de un diseño estadístico experimental se determinará la mejor composición cuantitativa y cualitativa de excipientes que permitirán la obtención de comprimidos cuyas características físicas, químicas y biofarmacéuticas sean las más apropiadas.

3.4. Área de estudio

El desarrollo de este estudio de investigación se llevó a cabo en el Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas, Laboratorio de Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés, ubicado en la Av. Saavedra 2224, Zona Miraflores de la ciudad de La Paz – Bolivia.

3.5. Método experimental

El método experimental de este trabajo de investigación se presenta en los siguientes capítulos.

3.5.1. Equipos, materiales, reactivos y sustancias de referencia

Cuadro 3-1 Equipos, materiales, reactivos y sustancias de referencia

Equipos	Materiales	Reactivos	Sustancias de Referencia
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Balanza analítica AND ❖ Shaker innova®44 ❖ Liofilizador FINNi-AQUA LYOVAC GT 2. ❖ Congelador ❖ Espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630 ❖ Estufa de secado FAETA ❖ Termohigrómetro digital TG002 ❖ Vernier ❖ Centrifugadora S/M ❖ Agitador magnético IKAMAG RCT ❖ Cromatógrafo líquido de alta resolución DAD Knauer ❖ Equipo HPLC-DAD-ESI/MS Knauer-Advion MS ❖ Máquina de comprimir ❖ Friabilómetro de marca Erweca ❖ Equipo de disolución Pharma Test PT-DT7 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Papel Whatman 1 (11 µm) ❖ Matraz Erlenmeyer ❖ Vaso de precipitado ❖ Varilla de vidrio ❖ Frascos de vidrio ❖ Matraz aforado ❖ Pipeta aforada ❖ Pipeta graduada ❖ Propipeta ❖ Membrana Millipore 0.22 µm ❖ Cristalizador ❖ Desecador de vidrio ❖ Cámara de higroscopicidad ❖ Tubos Falcon ❖ Pipetas Pasteur ❖ Espátulas de acero ❖ Embudo y soporte universal ❖ Filtros de jeringa Phenex RC de 0.45µm y 0.22 µm ❖ Columna de vidrio para cromatografía con frita ❖ Cartuchos Sep-Pak C₁₈ 1 cc Vac ❖ Matraz aforado ❖ Columna C₁₈ (100 x 3 mm, tamaño de partícula 3 µm, Knauer, Germany) ❖ Cucharas ❖ Papel Wathman 1 ❖ Mortero y pilón ❖ Recipiente de acero inoxidable ❖ Tamiz de luz 1mm 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Agua destilada ❖ Agua HPLC ❖ Metanol p.a. ❖ Metanol HPLC ❖ KH₂PO₄ ❖ Ácido fosfórico ❖ Ácido fórmico ❖ C18 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Betanina ❖ Isobetanina

Fuente: Elaboración propia.

3.5.2. Recolección de semillas

Las semillas de *O. soehrensii* fueron recolectadas de la provincia Pacajes, de los lugares de acopio de frutos de esta especie.

Se recolectó una cantidad suficiente de estas semillas secas, en bolsas de polietileno previamente sanitizadas, identificadas y transportadas al laboratorio en conservadoras (véase ANEXO A-1).

Una vez en el laboratorio, se sanitizaron externamente las bolsas que contienen las semillas y fueron introducidas en otras bolsas para luego conservarlas en un congelador.

3.5.3. Autenticación de la especie botánica en estudio

Una vez recolectado un ejemplar de la planta completa con su fruto, la autenticación de la especie botánica *O. soehrensii* ha sido realizada en el Herbario Nacional de Bolivia (LPB), tal como lo evidencia su certificación (véase ANEXO A-2).

3.5.4. Extracción sólido-líquido a partir de semillas

Para realizar el proceso de extracción del extracto acuoso de *O. soehrensii*, se siguió el método propuesto por Zambrana (2007) con algunas modificaciones. Para este efecto, se pesaron por triplicado 40.00 g de semillas desecadas libre de partículas extrañas y fueron llevadas a un matraz Erlenmeyer para su adición de 1000 mL de agua destilada previamente calentada a 50°C. Esta mezcla fue agitada por 2 horas en un shaker a 35 °C y 120 rpm; luego fue llevada a macerar por 48 horas a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Pasado este tiempo, se procedió a filtrar el líquido de extracción con papel filtro Whatman 1 (11 µm), el filtrado fue distribuido en frascos de vidrio para su posterior congelación y secado en un liofilizador, luego se registraron los pesos del extracto seco de cada frasco para la determinación de su rendimiento. A continuación, los frascos fueron llevados a conservar en un congelador a -20 °C hasta su posterior uso (ver ANEXO A-3).

3.5.5. Descripción y características fisicoquímicas del extracto

3.5.5.1. Descripción organoléptica del extracto

La descripción organoléptica se realizó mediante un análisis sensorial del extracto obtenido.

3.5.5.2. Contenido de agua

La determinación del contenido de agua del extracto seco de *O. soehrensii*, se realizó de acuerdo a la USP 37/NF 32 (2014), en su capítulo determinación de agua en artículos de origen botánico, con algunas variantes. Para tal efecto, se dispuso de un cristizador previamente secado y tarado, en el que se han pesado 5.00 g de extracto seco dispersados de forma homogénea por triplicado y se los llevó a secar de inmediato en una estufa, a 55°C durante 5 horas. Al cabo de este tiempo, se llevaron los cristizadores a un

dsecador de vidrio al vacío, hasta que enfríen y luego se registraron sus pesos. Los cristalizadores se devolvieron a la estufa para continuar con el secado y su posterior registro de pérdida de peso cada hora; y fue a las ocho horas que se alcanzó la pesada constante en las tres muestras.

3.5.5.3. Higroscopicidad

Para la determinación del grado de higroscopicidad del extracto seco de *O. soehrensii*, se siguió el método de análisis gravimétrico de sorción, con algunas variantes (Ravikiran y otros, 2016; Amela & Valero, 2001; Cai & Corke, 2000).

De inicio se preparó una cámara hermética de higroscopicidad (25x25x10cm) con solución saturada de Na₂SO₄ y se dejó estabilizar por 3 horas con un termohigrómetro en el interior de la misma. Por otro lado, se han pesado 500.00 mg aproximadamente de extracto seco de *O. soehrensii* en frascos de vidrio previamente tarados y se han llevado al interior de la cámara hermética de higroscopicidad. A diferentes intervalos de tiempo, tal como se indica en el ANEXO A-4, se registró la ganancia de peso por el extracto, llevando a pesar los frascos con el extracto en una balanza analítica. Este ensayo se ha realizado por duplicado. Los resultados se han expresado como gramos de humedad por 100 g de sólido seco (g/100 g) según la siguiente expresión propuesta por la farmacopea europea:

$$W_{Ph.Eur.} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

Donde:

$W_{Ph. Eur.}$ = *Peso total ganado con el método Ph. Eur.*

W_1 = *Peso inicial del muestra, antes de introducirlo en la camara de higroscopicidad (80 % RH , 25 °C)*

W_2 = *Peso de la muestra despues de la exposición a 25 °C y 80 % RH en la camara de higroscopicidad.*

3.5.5.4. Grado de solubilidad

La determinación del grado de solubilidad del extracto seco de *O. soehrensii*, ha sido llevada a cabo según el método cuantitativo propuesto por Amela & Valero (2001). Para este propósito se preparó una suspensión con 7.60 g de extracto y 20 mL de agua destilada a 20°C de temperatura en un frasco de vidrio con tapa, que fue mezclado bajo agitación constante en un agitador magnético a 50 rpm y 20°C de temperatura durante 24 horas. A diferentes intervalos de tiempo, se han tomado alícuotas de 2 mL de la mezcla en agitación y fueron transferidos en tubos Falcon para llevarlas a centrifugar por el lapso de 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante de las alícuotas centrifugadas se filtraron mediante filtros de jeringa de porosidad 0.45µm para su lectura en un espectrofotómetro UV-vis a una λ_{\max} de 536 nm, previa dilución.

3.5.5.5. Cuantificación de betalaínas

La cuantificación de betalaínas se realizó en términos de semilla seca y de extracto seco de *O. soehrensii*. Para esta determinación, se pesó aproximadamente 20,01 g de semillas secas a las que se adicionaron 500 mL de agua destilada, tal como se ha descrito en el capítulo Extracción sólido-líquido a partir de semillas. Con el extracto líquido obtenido, se ha realizado una dilución que fue filtrada mediante una membrana de 0.45 µm de porosidad, para su lectura en un espectrofotómetro UV-vis a λ_{\max} de 536nm, 480 nm y 430nm para betacianinas, betaxantinas y ácido betalámico respectivamente (Biswas y otros, 2013; Cai y otros, 1998). Para los cálculos en términos del extracto seco, se ha considerado el peso correspondiente al rendimiento de este experimento, los que fueron 3.17 g.

La cantidad de betalaínas fue calculada mediante la siguiente formula:

$$BC_s = \frac{A \times PM \times V_s \times FD \times 10^2}{\epsilon \times L \times P_s}$$

Donde:

BC_s = Contenido de pigmento de semilla o extracto seco (mg/100g de semilla o extracto)
 A = Absorbancia (a λ = 536 nm betanina, 480 nm betaxantinas y 430 para ácido betalámico)
 PM = Peso molecular (g/mol) 550 (betanina), 308 (indicaxantina) y 212 (ácido betalámico)
 V_s = Volumen total del extracto (mL)
 FD = Factor de dilución
 ε = Coeficiente de extinción molar (betanina: 60 000 L/ mol. cm, indicaxantina: 48 000 L/mol. cm y ácido betalámico: 24 000 L/ mol. cm)
 L = Longitud de la celda (cm)
 P_s = Masa del material seco a extraer(g)

3.5.6. Identificación de compuestos químicos del extracto acuoso

3.5.6.1. Análisis del extracto acuoso por HPLC-DAD-ESI/MS

Se preparó una solución acuosa con el extracto seco liofilizado de *O. soehrensii*, el que fue purificado por un cartucho C₁₈, con una mezcla de metanol: agua y posterior filtración con membranas de 0.45 μ m de porosidad.

El análisis del extracto fue realizado por HPLC-DAD-ESI/MS, para ello se ha utilizado una columna de fase reversa (C₁₈ 100 x 3 mm, tamaño de partícula 3 μ m, Knauer, Germany) y se ha utilizado una fase móvil constituida por el siguiente sistema de solventes: solución A: solución acuosa de ácido fórmico al 0.02% y solvente B: Metanol 0.02%, basados en estudios de extracción de pigmentos similares (Sánchez, 2006). Se ha seguido una elución en gradiente con el siguiente perfil: 0-3 min, 100% de A; 4-9 min, 80% de A; 10-15 min, 80% de A; 16-18 min, 50% de A; 19-23 min, 100% de B; 24-27min, 40% de B; y 28-30 min, 100% de A, a un flujo de 0.4 mL/min y 25°C de temperatura. El análisis espectral de masas, se realizó por un detector cuadrupolo único unido a una fuente de ionización de tipo electrospray (ESI) en modo de operación ion positivo y negativo, empleando como gas portador N₂ a 8 L/min, y 325°C en el nebulizador. La fragmentación molecular se realizó a 100, 175 y 250V (García y otros, 2018).

Como fuente base de comparación, también se analizaron los extractos sin fraccionar de *Opuntia ficus indica* y *Beta vulgaris* siguiendo el mismo procedimiento aplicado en el análisis del extracto de *O. soehrensii*.

Los volúmenes de inyección fueron de 20 μ L y la detección de picos se realizó a λ =536nm, 480 nm y 254 nm.

3.5.6.2. Fraccionamiento del extracto acuoso

Para aislar e identificar los compuestos característicos del extracto *O. soehrensii*, de forma previa se realizó un fraccionamiento en columna utilizando como fase estacionaria C₁₈ (volumen 177 mL) y como fase móvil, una solución acuosa de ácido fórmico al 0.3% (solución A) y metanol (MeOH) con elución en gradiente. Sobre la fase estacionaria, se ha sembrado una cantidad de 2.10 g de extracto seco de *O. soehrensii* previamente disueltos en agua y se eluyeron en gradiente de acuerdo al sistema: solución A: MeOH, en proporciones de (100:0), (80:20), (70:30), (50:50), (30:70), (20:80) y (0:100) en ese orden, utilizando un volumen de 250 mL por cada mezcla (Sánchez, 2006).

Las fracciones eluidas fueron recolectadas por separado en función a las franjas coloreadas que se han formado en el trayecto de la columna durante la elución.

Estas fracciones fueron codificadas con números romanos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII y XIV) de acuerdo al orden de elución y se llevaron a secar en un liofilizador. Luego se determinaron los pesos de cada fracción y se calcularon los rendimientos correspondientes.

De forma previa al secado, se ha tomado una alícuota de cada fracción y fueron llevadas a analizar en un equipo de HPLC-DAD-ESI/MS, previa filtración por membranas de jeringa de 0.45 μ m de porosidad.

3.5.6.3. Identificación de compuestos químicos por HPLC-DAD-ESI/MS

Las fracciones eluidas fueron analizadas por HPLC-DAD-ESI/MS, para ello se ha seguido el mismo procedimiento y condiciones descritas para el análisis del extracto sin fraccionar en el capítulo 3.5.6.1.

Los volúmenes de inyección de las fracciones fueron de 20 μ L y la detección de picos se realizó a λ =536 nm, 480 nm y 254 nm.

3.5.7. Métodos de análisis propuestos para el extracto como materia prima

Los métodos de análisis se describen a continuación:

3.5.7.1. Métodos analíticos de identificación

a) Identificación por espectrofotometría UV – visible

Para la identificación del extracto de *O. soehrensii* por este método, se preparó una solución de concentración 0.70 mg/mL de extracto, que fue filtrada por una membrana de 0.45 µm de porosidad y analizada en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda comprendida entre 200 a 800 nm (Cai y otros, 1998; Tipe & Lock, 1990).

Con la finalidad de caracterizar al extracto de *O. soehrensii*, se procedió de la misma manera con los extractos secos de las especies *O. ficus indica* magenta y *B. vulgaris*, debido a que, según bibliografía estas especies presentan compuestos similares en su composición a los que contiene el extracto de *O. soehrensii*.

La especie *O. ficus indica* de color magenta para llevar a cabo este análisis, es procedente de Luribay - La Paz y la *B. vulgaris* procedente de Achocalla- La Paz.

b) Identificación por HPLC-DAD y HPLC-DAD ESI/MS

Para la identificación del extracto de *O. soehrensii* por estos métodos, se ha propuesto llevar a cabo tal como se describe en el capítulo 3.5.6.3 (Identificación de compuestos por HPLC-DAD-ESI/MS) y el concerniente únicamente a las condiciones del análisis por HPLC-DAD sin acoplar el procedimiento de la parte analítica de masas.

3.5.7.2. Métodos analíticos de valoración

a) Valoración por HPLC-DAD

Para la valoración del extracto de *O. soehrensii* por este método, se preparó una solución de concentración 2.0 mg/mL con dicho extracto, luego se ha purificado mediante un cartucho Sep-Pack C₁₈ 1 cc Vac y filtrado por una membrana de jeringa de 0.45 µm de porosidad.

El análisis fue llevado a cabo en un equipo de HPLC-DAD, utilizando una columna de fase reversa (C₁₈ 100 x 3 mm, tamaño de partícula 3 µm, Knauer, Germany), la fase móvil

utilizada fue: solvente A: Metanol/KH₂PO₄ 0.05M (18:82) ajustado a pH 2.75 con ácido fosfórico, y solvente B: Metanol, se ha seguido una elución en gradiente con el siguiente perfil: 0-5 min, 100% de A; 5-30 min, 80% de A; 30-35 min, 100% de A, a un flujo de 0.75 mL/min; el volumen de inyección fue de 20 µL y la detección de picos se ha realizado a λ_{\max} =536 nm (Schwartz & von Elbe, 1980; Soriano y otros, 2007; Fernández y otros, 2010).

La confección de una curva de calibración fue realizada a diferentes concentraciones con los estándares de betanina e isobetanina, siguiendo el mismo método para la cuantificación de betanina e isobetanina.

b) Valoración por espectrofotometría UV-visible

Para realizar el análisis de valoración del extracto de *O. soehrensii*, por este método, se confeccionó una curva de calibración en base a la sustancia estándar betanina y extracto de *O. soehrensii*. Para este fin, se preparó una solución madre con cada una de ellas, a partir de estas soluciones se realizaron diluciones por triplicado y fueron filtradas por una membrana de 0.45µm de porosidad para llevarlas a leer en un espectrofotómetro UV-visible a λ_{\max} = 536 nm (Tipe & Lock, 1990; Cai y otros, 1998).

3.5.8. Estudios de estabilidad de pH del extracto

Para llevar a cabo este estudio, se procedió tal como se indica en el capítulo 3.5.4 (Extracción sólido líquido a partir de semillas) partiendo con la extracción acuosa de semillas de *O. soehrensii* (4%). A este extracto acuoso se ha medido el pH y luego se ha distribuido en 11 matraces, de los cuales 9 han sido ajustados con soluciones de NaOH y/o HCl a los siguientes valores de pH: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y dos matraces no fueron ajustados, uno de ellos se almacenó en las mismas condiciones junto con el resto de los experimentos y el otro a 4°C (controles). A continuación, en un espectrofotómetro UV-visible se procedió a realizar un barrido espectral en el rango 200-800 nm, de cada uno de los experimentos, previa filtración mediante una membrana de 0.45 µm. Luego estos matraces fueron almacenados protegidos de la luz a temperatura (20°C +/-2°C). Las

siguientes lecturas, se realizaron cada día por una semana, otro a los 21 días y uno adicional a los 47 días (Tipe & Lock, 1990).

3.5.9. Estudio de la concentración de extracto por unidad de dosificación

3.5.9.1. Estandarización de la cantidad de semillas

Para esta determinación, se ha considerado el uso tradicional de las semillas de *O. soehrensii* para tratar diversas afecciones, que recomiendan como medida a la cuchara. Por tanto, se ensayaron tres tipos de cucharas de acuerdo a lo observado con más frecuencia en el comercio de estos artículos. Con cada modelo de cuchara, se ha realizado 10 pesadas sucesivas de semillas de *O. soehrensii* libre de materias extrañas en una balanza analítica, luego se ha calculado el promedio y desviación estándar de las masas por cada modelo de cuchara y finalmente fue calculado el promedio de todos los modelos de cucharas (Navarro, 2012; PRODECO y CIMES, 2018; Girault, 1987a; Pardo, 2002; S/A, 2002).

3.5.9.2. Extracción acuosa por infusión

Para la determinación de la cantidad de extracto correspondiente a una cuchara de semillas de *O. soehrensii*, se llevó a cabo la extracción acuosa por infusión en consideración al uso tradicional.

La preparación por infusión fue preparada por triplicado, llevando una cantidad de 7.42g equivalente a una cuchara promedio de semillas de *O. soehrensii* en un litro de agua destilada recientemente hervida (86°C) dejándola en reposo por 30 minutos. Al cabo de este tiempo se procedió a filtrar la solución con papel Wathman 1. Posteriormente se dejó enfriar para luego llevarla a congelar y secarla en un liofilizador.

3.5.9.3. Cálculo de la cantidad de extracto por unidad de dosificación

Considerando el uso tradicional que indica el consumo de un litro de infusión de *O. soehrensii* a lo largo de un día y estudios de biodisponibilidad reportado de betanina, se ha fraccionado en tres partes la cantidad de extracto seco que se obtuvo por infusión en el anterior capítulo (Tesoriere y otros, 2004).

3.5.10. Evaluación citotóxica del extracto acuoso de *O. soehrensii*

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Evaluaciones Biológicas del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.), en donde se realizó la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos acuosos de *O. soehrensii* y sus fracciones obtenidas por cromatografía en columna, sobre macrófagos murinos RAW 264.7.

3.5.11. Fase de formulación de comprimidos

Esta fase comprende el análisis de los factores que inciden en las características biofarmacéuticas y farmacotécnicas de la forma farmacéutica que se pretende diseñar. Tomando como base los datos fisicoquímicos recopilados bibliográficamente o por experimentación, se evaluaron dichos parámetros en función a los posibles métodos para la fabricación de comprimidos en base al extracto de *O. soehrensii* (Mora, 2012).

De esta manera, la elección del método de fabricación se realizó en función a las características físicas y mecánicas del material a comprimir, priorizando las características fisicoquímicas del principio activo al que se pretende dar la forma farmacéutica de comprimidos (Vila, 2001).

El extracto liofilizado de *O. soehrensii* es un sólido muy higroscópico, característica que dificulta su incorporación directa a la matriz de excipientes en forma de un sólido, por lo que se precisó encontrar un agente adsorbente adecuado para poder incorporar en éste el extracto de *O. soehrensii* en solución acuosa.

3.5.11.1. Selección de agentes adsorbentes

Para llevar a cabo la selección del agente adsorbente adecuado, se preparó una solución acuosa de concentración 0.58 g/mL con el extracto seco de *O. soehrensii* y se ha llevado a un mortero. Sobre esta solución se fue adicionando de forma gradual, una cantidad suficiente de agente adsorbente, logrando obtener una mezcla homogénea de consistencia adecuada que posteriormente fue llevada a granular, secar a temperatura ambiente y tamizar. Para determinar el grado de fluidez del polvo adsorbido, se ha medido el ángulo de reposo de este material resultante de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo 3.5.11.3. Criterios de aceptación (USP 37/ NF 32, 2014).

Los agentes adsorbentes ensayados fueron almidón de maíz, celulosa microcristalina y lactosa.

❖ **Criterio de elección del agente adsorbente**

El adsorbente apropiado será aquel que tenga mayor capacidad de adsorber el volumen de extracto en solución utilizado en el ensayo.

Los polvos adsorbidos se llevaron a comprimir para observar si el extracto presenta capacidad aglutinante para formar un compacto resistente.

3.5.11.2. Selección de excipientes mediante diseños estadísticos experimentales

La selección de excipientes fue realizada mediante el diseño reducido de tipo factorial fraccionado saturado de R.L. Plackett y J.P. Burman, para determinar los factores relevantes (excipientes) y las interacciones entre ellos. Para este fin, los excipientes que se han propuesto fueron considerados en función a la necesidad que demanda la obtención de la forma farmacéutica en comprimidos, en conformidad a las características del polvo adsorbido con el extracto de *O. soehrensii*. Dichos excipientes fueron ensayados en los niveles tanto positivo como negativo en la formulación (Ponce D`León, 2013; Quispe, 2009). Estos excipientes constituyen nuestros factores o variables de ensayo.

De acuerdo a la matriz resultante de R.L. Plackett y J.P. Burman, se llevaron a cabo 8 experimentos para 7 factores planteados, donde cada experimento fue ejecutado de acuerdo al procedimiento de fabricación de comprimidos que se describe a continuación.

❖ **Procedimiento de fabricación de comprimidos de *O. soehrensii***

Se tamizaron y mezclaron todos los polvos secos en una bolsa plástica, con excepción del agente antifricción y disgregante extragranular. La mezcla fue llevada a un recipiente de acero inoxidable para adicionar sobre ésta de a poco el líquido aglutinante previamente preparado (en solución o dispersión del agente aglutinante en agua) hasta lograr una mezcla homogénea con la ayuda de una espátula. A continuación, se procedió a granular la mezcla anterior y los gránulos formados fueron llevados a secar a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se procedió con el tamizado de los gránulos secos mediante un tamiz de 1 mm de luz y fueron llevados a ser mezclados con el agente antifricción y el

disgregante extragranular en una bolsa plástica. Finalmente, dicha mezcla fue llevada a comprimir.

❖ Evaluación de resultados

Para la evaluación de los resultados de ángulo de reposo, friabilidad y prueba de disolución, se calculó la significancia (t_i) en función a los resultados de dichos ensayos, mediante la siguiente ecuación:

$$t_i = \frac{E_i(n_v - 1)^{1/2}}{s}$$

Donde:

t_i = Significancia (valor de t experimental)

E_i = Efecto medio

n_v = Número de variables

s = Desviación estándar

La t_{tablas} o valor crítico ($t_{crítico}$) fue calculado considerando un nivel de significancia del 0.1 ($\alpha/2=0.05$) y los grados de libertad con la ecuación:

$$gl = n_v - 1$$

Donde:

gl = Grados de libertad

n_v = Número de variables

Considerando que el $n_v = 7$, por el número de factores evaluados, los grados de libertad se determinaron de la siguiente manera:

$$gl = n_v - 1$$

$$gl = 7 - 1$$

$$gl = 6$$

Por tanto, de acuerdo a tablas, el valor crítico para $t_{\alpha/2;gl}$, nos da el siguiente valor:
 $t_{0,05;6} = 1,94$ (Alvarez & Huayta, 2000).

3.5.11.3. Criterios de aceptación

A continuación, se describen los criterios de aceptación que han permitido discriminar los experimentos aceptables de los no aceptables, estos evalúan las características físicas,

químicas y biofarmacéuticas más relevantes para la obtención de la forma farmacéutica en comprimidos en sus distintas fases de fabricación (Olivero, 1982; Vila, 2001).

❖ Fase de granulación

En esta fase, el parámetro de evaluación considerado fue el ángulo de reposo como una medida para investigar la capacidad de flujo del granulado, para cuya determinación se ha seguido el procedimiento y los criterios de aceptación recomendado por la USP 37/NF 32 como se describe a continuación (USP 37/ NF 32, 2014).

Ángulo de reposo

Para la determinación del ángulo de reposo, se utilizó un embudo que fué fijado en un soporte universal a una distancia de 10 cm respecto a la base. Luego se dejó caer una cantidad de granulado a través de un tamiz, logrando la formación de un cono sobre una superficie cubierta por papel milimetrado en la base del soporte. Los cálculos del ángulo de reposo fueron realizados mediante la fórmula que se muestra a continuación:

$$\alpha = \tan^{-1}\left(\frac{a}{b}\right)$$

Donde:

α = *Ángulo de reposo*

a = *Altura del cono*

b = *Base del cono/2*

❖ Fase de compresión

Los parámetros de evaluación en esta fase fueron la friabilidad y el porcentaje de disolución (Q). La friabilidad como medida de la resistencia del comprimido a la abrasión, el porcentaje de disolución como medida biofarmacéutica, donde ambos ensayos se llevaron a cabo bajo los procedimientos y criterios de aceptación que indica los lineamientos de la USP 37/NF 32 (USP 37/ NF 32, 2014; Vila, 2001).

Prueba de friabilidad

Para llevar a cabo el ensayo de friabilidad, se pesaron 10 comprimidos libre de polvo en una balanza analítica y luego fueron llevados a un friabilómetro a una velocidad de 25rpm por el lapso de 4 minutos. Al cabo de este tiempo, los comprimidos fueron extraídos del friabilómetro y se eliminaron los restos de polvo generado por el experimento. Se ha

observado si estos presentaban o no fracturas o desgaste para poderlos llevar a pesar en una balanza analítica. Los cálculos del porcentaje de friabilidad se realizaron mediante la fórmula que se presenta a continuación:

$$\% \text{ de Friabilidad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde:

P_i = Peso inicial

P_f = Peso final

El criterio de aceptación de resultados de esta prueba fue: % de Friabilidad \leq 1%.

Prueba de disolución

Para realizar la prueba de disolución de comprimidos de *O. soehrensii*, fue desarrollado un método analítico cuyas condiciones y especificaciones fijadas, se han basado y alineado en las directrices recomendadas por la USP 37/NF 32, en su capítulo desarrollo de pruebas de disolución, debido a que en las farmacopeas de mayor consulta no existen monografías para la evaluación de esta especie botánica en ninguna forma farmacéutica (USP 37/ NF 32, 2014).

Para llevar a cabo la prueba de disolución, se realizaron pruebas preliminares que han permitido establecer los parámetros para realizar este ensayo. Para efectuar este ensayo, se ha filtrado agua destilada mediante una membrana de 0.45 μm de porosidad y luego fue llevado a desgasificar. A continuación, se han llevado 500 mL de esta agua desgasificada a cada uno de los 6 vasos del equipo de disolución y se aguardó a que cada uno de ellos alcancen una temperatura de 37°C. Se ha llevado un comprimido por cada vaso e iniciado de inmediato el proceso de agitación mediante el aparato N° 2 a una velocidad de 50 rpm por un tiempo de 30 minutos. Al cabo del cual, de forma inmediata, se ha tomado un volumen de 10 mL de cada vaso mediante una sonda de muestreo acoplado a un filtro. Las muestras fueron filtradas mediante una membrana de jeringa de 0.45 μm y se realizaron las diluciones necesarias para llevarlas a cuantificar en un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 536 nm. Para los cálculos del porcentaje de disolución (*Q*) de extracto y de betanina, se ha utilizado la curva de

calibración confeccionada en el capítulo Valoración por espectrofotometría UV-visible. El criterio de aceptación de resultados bajo el cual fueron evaluados cada uno de los experimentos corresponde a: Q debe ser no menor de 80%.

A continuación, se describen los fundamentos por los cuales se han fijado las condiciones bajo las que se han llevado a cabo el procedimiento del ensayo de disolución descrito anteriormente:

- Medio de disolución: El medio de disolución utilizado fue agua destilada filtrada y desgasificada. La elección de este solvente responde al grado de solubilidad y estabilidad del extracto de *O. soehrensii* en este medio.
- Volumen del medio de disolución: El volumen del medio de disolución utilizado por unidad de dosificación fue de 500mL, volumen que fue calculado tomando en cuenta el grado de solubilidad del extracto acuoso de *O. soehrensii* (82,38 mg/mL) más las condiciones de exceso de medio (sink conditions) requerido para esta prueba (véase ANEXO A-15).
- Aparato/agitación: El aparato seleccionado es el Aparato 2 (Paletas), evitando de esta manera la posibilidad de que el comprimido pueda pegarse y obstruir las mallas del canastillo en caso de que fuera el Aparato 1.
- Agitación: La velocidad de agitación establecida fue de 50 rpm, tomando en cuenta el aparato de agitación 2 que se ha seleccionado anteriormente.
- Tiempo: La duración de la prueba de disolución fue establecida en 30 minutos, conforme a los datos obtenidos de forma experimental y considerando que se trata de un comprimido de liberación inmediata. De inicio se ha ensayado el punto infinito para corroborar y establecer el tiempo necesario para lograr el 100% de disolución.
- Observaciones: De todas las posibles observaciones citadas en la USP-37/NF 32, durante la experimentación, se ha registrado la formación de un montículo en el centro del vaso de disolución, problema que fue subsanado incrementando la velocidad de agitación de 30 rpm inicial a 50 rpm.
- Muestreo: El muestreo fue de tipo manual.

- Filtro: Se ha considerado el uso de un filtro de profundidad de tamaño de poro 0.45µm ubicado en el extremo de la sonda de muestreo que está en contacto con el medio de disolución cuando se realice el ensayo de disolución. También se consideró eliminar el primer volumen de filtración para luego hacer la toma de la muestra como tal.
- Estándar: Su preparación se realizó agitando a través de un agitador magnético durante 1 hora. En este caso como estándar se utilizó betanina y extracto de *O. soehrensii* utilizado en la fabricación de los comprimidos.
- Valoración: Se llevó a cabo por el método de espectrofotometría UV-visible a una $\lambda_{\max}=536$ nm.
- Número de comprimidos ensayados: Fueron 6 los comprimidos ensayados por cada experimento.
- Criterios de aceptación: $Q \geq 80\%$.

3.5.11.4. Métodos analíticos para la evaluación de comprimidos

❖ Valoración e identificación de betanina e isobetanina en comprimidos

El método de valoración propuesto para la valoración de betanina e isobetanina en comprimidos, está basado en el método de valoración por HPLC-DAD propuesto para el extracto de *O. soehrensii*, con las adaptaciones necesarias para la forma farmacéutica en comprimidos.

Para la valoración de betanina en comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii*, se pesaron de forma individual diez comprimidos (FD 203 mg), luego fueron pulverizados en un mortero, de este polvo se pesó una cantidad equivalente a 250mg de extracto y fueron llevados a un matraz Erlenmeyer para su agitación con 50 mL de agua destilada en un agitador magnético por 15 minutos. Esta mezcla fue transferida a un matraz aforado de 100 mL, se completó con agua destilada hasta su aforo correspondiente y se agitó hasta lograr una mezcla homogénea. La mezcla se dejó decantar durante 5 minutos, al cabo del cual se ha tomado alícuotas del sobrenadante para realizar las diluciones necesarias para alcanzar una concentración final de 0.8 mg/mL. Las mezclas finales fueron filtradas con una membrana de jeringa de 0.45 µm de porosidad y llevadas a analizar a un equipo de HPLC-DAD, utilizando una columna de fase reversa (C₁₈ 100 x 3 mm, con un tamaño de

partícula 3 μm), la fase móvil utilizada fue: solución A: Metanol/ KH_2PO_4 0.05M (18:82) ajustado a pH 2.75 con ácido fosfórico, y como B: Metanol, se ha seguido una elución en gradiente con el siguiente perfil: 0-5 min, 100% de A; 5-10 min, 80% de A; 10-20 min, 80% de A; 20-25 min, 100% de A y 25-30 min, 100% A, a un flujo de 0.75mL/min. El volumen de inyección fue de 20 μL y la detección de picos fue realizada a λ_{max} de 536 nm (Schwartz & von Elbe, 1980; Soriano y otros, 2007; Fernández y otros, 2010).

Los cálculos del porcentaje de rendimiento fueron realizados en función a la curva de calibración elaborada en base a betanina e isobetanina del extracto de *O. soehrensii*, descrito en el capítulo de valoración del extracto de esta misma especie.

La identificación de los marcadores fitoquímicos betanina e isobetanina en comprimidos de *O. soehrensii*, se realizó mediante una comparación entre el patrón del perfil cromatográfico obtenido en la valoración de comprimidos, con el patrón del cromatograma obtenido con el extracto de *O. soehrensii*. En el análisis de los cromatogramas se ha considerado evidenciar la elución de los picos de betanina e isobetanina basado en sus absorbancias máximas ($\lambda_{\text{max}}=536$ nm en ambos casos), sus tiempos de retención ($t_r=2.21$ min para betanina y $t_r=3.40$ min para isobetanina) y verificando además la proporcionalidad de la correlación de áreas, siendo la especificación esperada entre betanina: isobetanina de 55.07%:44.93%.

La otra posibilidad para la identificación de los componentes del extracto de *O. soehrensii* en comprimidos, es el procedimiento que se ha seguido para la identificación de dicho extracto por HPLC-DAD en el capítulo Identificación de compuestos por HPLC-DAD-ESI/MS sin ejecutar la lectura de las masas, que, si bien sería lo indicado porque nos permitiría un análisis exquisito de compuestos propios del extracto, resulta muy costoso como un método analítico de rutina.

❖ Prueba de disolución de comprimidos de *O. soehrensii*

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento y las condiciones descritas en el capítulo Criterios de aceptación: Prueba de disolución. Para ello fueron ensayados un número de 6 comprimidos en un equipo de disolución, cuyos resultados de porcentaje de disolución fueron calculados mediante la curva de calibración en base a betanina y

extracto de *O. soehrensii* por el método de espectrofotometría UV-visible a una $\lambda_{\text{max}}=536\text{nm}$, tal como se describe en el capítulo Métodos analíticos de valoración: Valoración por espectrofotometría UV-visible. Los resultados fueron evaluados de acuerdo al cumplimiento con la especificación: $Q \geq 80\%$.

4. Capítulo: Resultados y discusiones

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos y las discusiones correspondientes.

4.1. Extracción sólido-líquido a partir de semillas

El rendimiento en términos porcentuales de extracto seco, que este proceso de extracción ha generado, es del $18.00 \pm 0,11\%$ (véase TABLA 4-1).

Tabla 4-1 Rendimiento de la extracción acuosa de semillas

Ensayo	Peso semilla (g)	Peso extracto liofilizado (g)	Rendimiento (%)
1	40,0056	6,1997	15,50
2	40,0154	7,8097	19,52
3	40,0082	7,5972	18,99
		Promedio	$18,00 \pm 0,11$

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de un estudio similar con la misma especie botánica, logra un rendimiento del 23,60%, utilizando el método de secado por atomización del extracto acuoso (Tipe & Lock, 1990). Este método a diferencia del empleado en el presente estudio, utiliza las semillas pulverizadas, aspecto que puede influir en un aumento de la superficie específica de sus partículas pulverizadas en contacto con el líquido de extracción, y por tanto lograr un mayor rendimiento en comparación a utilizar las semillas sin pulverizar. Es muy probable que este método de secado pueda generar alteraciones de sus componentes debido a la acción del calor empleado en dicho procedimiento.

Sin embargo, considerando la calidad del extracto seco, el proceso de secado por liofilización que aplica el presente estudio, requiere temperaturas de congelación para la eliminación posterior del agua por sublimación, sin llegar a afectar la estabilidad de los componentes del extracto por efecto de las temperaturas bajas que este proceso emplea.

4.2. Descripción y características fisicoquímicas del extracto

4.2.1. Descripción organoléptica del extracto

Sólido de aspecto esponjoso de coloración magenta oscuro, muy higroscópico, de sabor dulzaino característico.

El extracto proviene de semillas que responden a la siguiente descripción organoléptica: Semillas secas, de forma arriñonada, de color magenta oscuro y sabor dulzaino agradable, libre de partículas extrañas.

4.2.2. Contenido de agua

El contenido de agua promedio del extracto seco de *O. soehrensii* expresado en términos porcentuales fue de $24,62 \pm 0,81\%$, tal como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 4-2 Contenido de agua del extracto liofilizado de *O. soehrensii*

Extracto seco	Contenido de Agua (%)
Muestra 1	24,64
Muestra 2	24,94
Muestra 3	24,29
Promedio	$24,62 \pm 0,81$

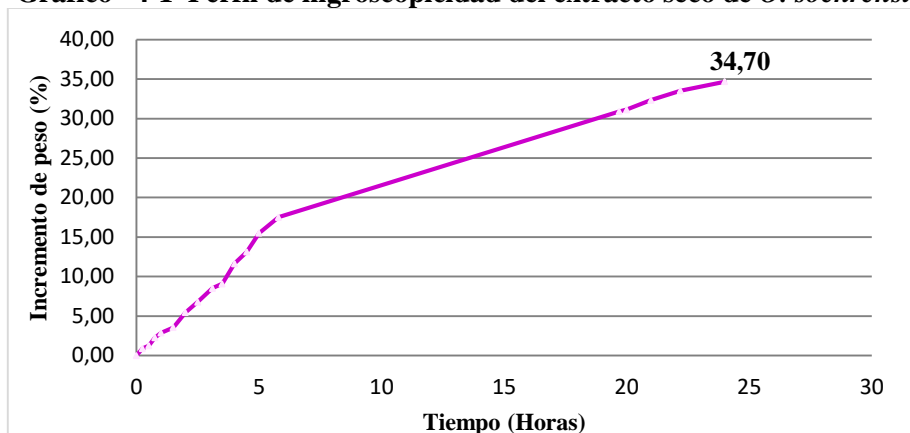
Fuente: Elaboración propia.

4.2.3. Higroscopicidad

El incremento promedio de peso que ha presentado el extracto seco de *O. soehrensii*, registrado a las 24 horas, es del 34,70 % de acuerdo a su perfil de higroscopicidad (véase GRÁFICO 4-1), catalogado como muy higroscópico, debido a que supera el valor de referencia del 15% de la categorización de higroscopicidad de sólidos farmacéuticos, establecida por la Farmacopea Europea (Ravikiran y otros, 2016).

El grado de higroscopicidad del extracto seco de *O. soehrensii*, nos permite entender que se trata de un material que no se lo puede manejar al estado de un sólido puro, necesita ser adsorbido en otro sólido, para permitir que este sea manejable y facilitar su incorporación en procesos de fabricación de sólidos farmacéuticos.

Gráfico 4-1 Perfil de higroscopicidad del extracto seco de *O. soehrensii*



Fuente: Elaboración propia.

4.2.4. Grado de solubilidad

Las lecturas de absorbancias y cálculos de las concentraciones correspondientes se han registrado en la tabla 4-3.

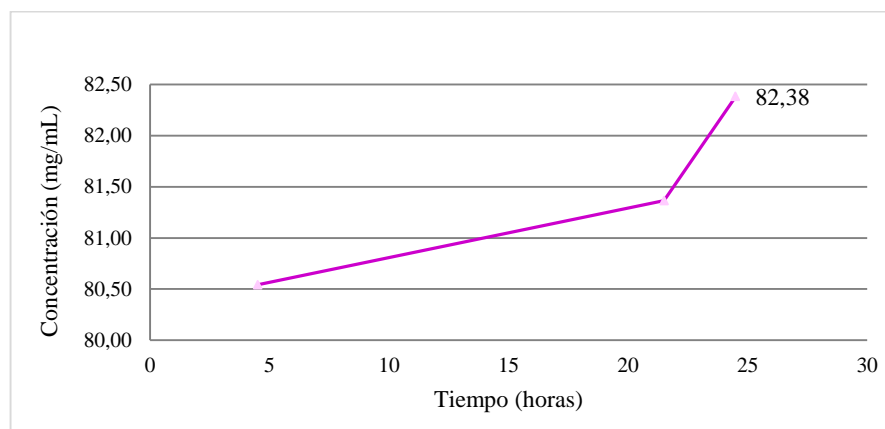
El cálculo del grado de solubilidad se ha realizado mediante la curva de calibración del extracto de *O. soehrensii* (véase GRÁFICO 4-14 Curva de calibración de extracto de *O. soehrensii* por espectrofotometría UV-visible a $\lambda_{\text{max}} = 536 \text{ nm}$). Dichas concentraciones fueron corregidas por su factor de dilución, dándonos un resultado de solubilidad del extracto en agua de 82,38mg/mL, cuyo perfil de solubilidad se puede observar en el gráfico 4-2. El resultado de solubilidad obtenido con este experimento, corresponde a la clasificación fácilmente soluble (USP 37/ NF 32, 2014).

Tabla 4-3 Grado de solubilidad del extracto de *O. soehrensii*

Tiempo de muestreo (Hrs)	Concentración (mg/mL)	Concentración (% p/v)
4,50	80,54	8,05
21,50	81,36	8,14
24,50	82,38	8,24
Solubilidad	82,38	8,24

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-2 Perfil de solubilidad del extracto de *O. soehrensii* determinado por espectrofotometría UV-vis



Fuente: Elaboración propia.

4.2.5. Cuantificación de betalainas en el extracto

La cantidad de betalainas totales en términos de betanina, indicaxantina y ácido betalámico, tanto de semillas como del extracto seco de *O. soehrensii* se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 4-4 Contenido de betalainas de *O. soehrensii*

Material	N° exp.	Contenido individual de betalainas (mg/100 g)			Contenido total de betalainas (mg/100 g)
		Betanina	Betaxantina	Ac. betalámico	
Semillas secas	1	234,619	57,286	34,456	326,361
	2	234,621	57,290	34,464	326,374
	3	234,678	57,286	34,455	326,418
	Promedio	234,639 ± 0,08	57,287 ± 0,01	34,458 ± 0,01	326,384 ± 0,07
Extracto seco	1	1480,667	289,222	217,453	1987,342
	2	1480,659	289,238	217,495	1987,393
	3	1481,494	289,310	217,510	1988,314
	Promedio	1480,94 ± 1,19	289,257 ± 0,12	217,486 ± 0,07	1987,683 ± 1,36

Fuente: Elaboración propia

El contenido de betanina obtenido por nuestro estudio fue de 234,639 mg/100g de semillas secas, valor ligeramente superior en comparación a un estudio realizado con la misma especie (*O. soehrensii*) logrando un contenido de betanina de 230 mg/100g de semillas secas, haciendo uso de agua a pH 4,5 y con 24 horas de maceración (Caldas y otros, 2015). Otro estudio para esta misma especie, ha reportado resultados de

177,927mg/100g, 69,073mg/100g y 246,9mg/100g para betaninas, indicaxantinas y betalaínas totales respectivamente, a partir de semillas que fueron desecadas en estufa a 45°C, bajo las condiciones de tiempo de agitación de 38,35 minutos y velocidad de 198,82rpm, posiblemente estos resultados son inferiores respecto a los hallados por nuestro estudio, debido a la aplicación de un método de desecación de semillas distinto (Justo, 2018).

4.2.6. Identificación de compuestos químicos del extracto acuoso

4.2.6.1. Análisis del extracto acuoso por HPLC-DAD-ESI/MS

El cromatograma obtenido a $\lambda=536$ nm para el extracto de *O. soehrensii*, nos permite evidenciar la presencia de dos picos mayoritarios con buena resolución correspondientes a los compuestos con un $t_r=13,58$ min (betanina $[M+H]^+$ $m/z=551$; $\lambda_{max}=536$ nm) y $t_r=15,32$ min (isobetanina $[M+H]^+$ $m/z=551$; $\lambda_{max}=536$ nm), confirmando la presencia de betalaínas de tipo betacianinas en esta especie botánica (ver ANEXO A-6) (Jerz y otros, 2013).

El perfil del cromatograma obtenido a $\lambda=480$ nm, presenta bastante similitud al obtenido a $\lambda=536$ nm. Sin embargo, el cromatograma obtenido a $\lambda=254$ nm revela la presencia de otros picos adicionales a los hallados a $\lambda=536$ nm, donde los mayoritarios corresponden a los de $t_r=1,58$ min ($[M+H]^+$ $m/z=381$; $\lambda_{max}=227, 195$ nm), $t_r=6,90$ min ($[M+H]^+$ $m/z=370$; $\lambda_{max}=267, 220, 192$ nm) y $t_r=20,54$ min ($[M+H]^+$ $m/z=765$; $\lambda_{max}=277, 233$ nm) este último pico no presenta buena resolución. (véase TABLA 4-5, GRÁFICO 4-3 y GRÁFICO 4-4) (Jerz & cols, 2013; Schwartz & von Elbe, 1980; Garcia & cols, 2018).

También se observan picos minoritarios con $t_r=3,70$ min, que aparentemente se podría tratar de miraxantina V por su masa molecular ($[M+H]^+$ $m/z=347$), sin embargo, a juzgar su absorbancia máxima ($\lambda_{max}= 258, 220, 195$ nm) no coincide con el de las betaxantinas (460-480 nm), pero si con el rango de longitudes de onda de máxima absorción de lignanos; de la misma manera ocurre con los compuestos de $t_r=9,54$ min ($[M+H]^+$

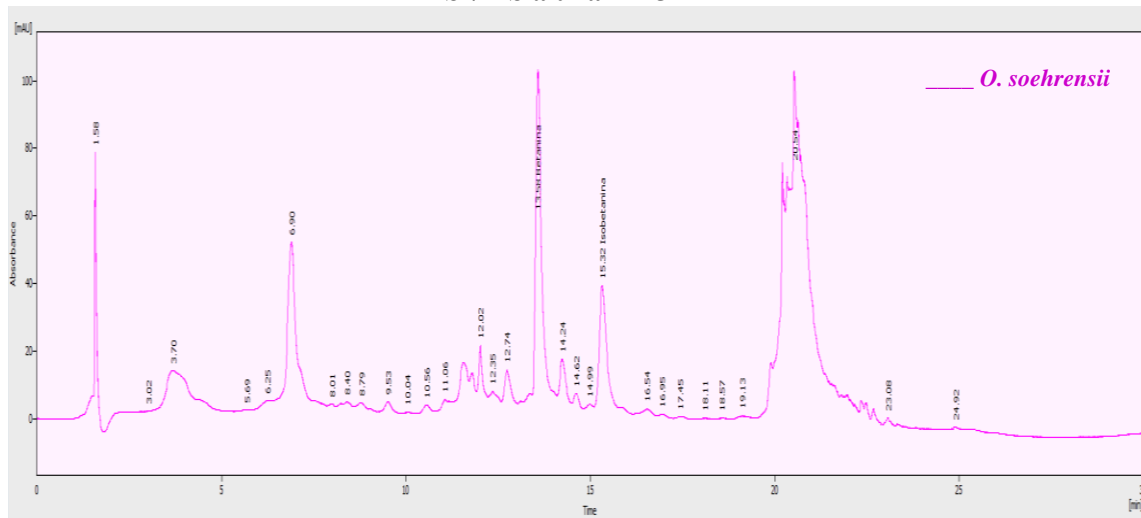
$m/z=386$; $\lambda_{\max}=279$ nm), $t_r=12,76$ min ($[M+H]^+$ $m/z=369$; $\lambda_{\max}=253$ nm) y $t_r=14,24$ min ($[M+H]^+$ $m/z=299$; $\lambda_{\max}=276$ nm); este último, conforme a su masa molecular es probable que se trate del lignano enterolactona, pero también existe la posibilidad de que se trate de un dímero de un compuesto similar a 5,6-dihydroxi indol, asimismo existe la posibilidad de que se trate de la aglicona bidescarboxilada de la betanina debido a que sus fragmentos son muy similares (Palma y otros, 2020; Schwertner & Stankus, 2015; Kugler y otros, 2007; Du y otros, 2017). Otro pico minoritario hallado es el de $t_r=12,02$ min ($[M+H]^+$ $m/z=408$; $\lambda_{\max}=308, 253$ nm) y, aunque en este cromatograma no se observa un pico resuelto para el compuesto filocactina, mediante su espectro de masas y absorción máxima UV-visible se la pudo hallar a un $t_r=19,15$ min ($[M+H]^+$ $m/z=638$; $\lambda_{\max}=536$ nm), esto posiblemente se deba a su presencia en muy bajas proporciones en la muestra del extracto analizado (Jerz y otros, 2013).

El análisis de este cromatograma, permite establecer como compuestos característicos a los compuestos no identificados de $t_r=6,90$ min ($[M+H]^+$ $m/z=370$; $\lambda_{\max}=267, 220, 192$ nm), $t_r=9,54$ min ($[M+H]^+$ $m/z=386$; $\lambda_{\max}=279$ nm), $t_r=12,02$ min ($[M+H]^+$ $m/z=408$; $\lambda_{\max}=308, 253$ nm) y $t_r=12,74$ min ($[M+H]^+$ $m/z=369$; $\lambda_{\max}=253$ nm); de esta manera estos compuestos podrían constituirse como marcadores fitoquímicos para la identificación del extracto de la especie *O. soehrensii* frente a otras especies que pueden contener compuestos similares, tal como lo reporta la bibliografía y los datos obtenidos para *O. ficus indica* y *B. vulgaris* (véase ANEXO A-6 y A-7). Tomando en cuenta la proporción de los picos mayoritarios, el compuesto de $t_r=6,90$ min ($[M+H]^+$ $m/z=370$; $\lambda_{\max}=267, 220, 192$ nm) por su presencia muy bien diferenciada, es un candidato muy importante a considerarse como marcador fitoquímico en los análisis de identificación tanto en el extracto de *O. soehrensii* como materia prima y en las posibles formas farmacéuticas fabricadas a partir de éste extracto.

De los cromatogramas obtenidos a $\lambda=254$ nm, $\lambda=480$ nm y $\lambda=536$ nm para los extractos de *O. soehrensii*, *O. ficus indica* y *B. vulgaris*, los obtenidos a $\lambda=480$ nm, son cromatogramas que nos permiten evidenciar una diferenciación marcada entre éstas especies, constituyéndose así en un aspecto que contribuye a establecer y desarrollar

técnicas analíticas de identificación para la especie *O. soehrensii* frente a las otras citadas que de acuerdo a bibliografía presentan ciertos compuestos en común (véase ANEXO A-6).

Gráfico 4-3 Perfil cromatográfico del extracto de *O. soehrensii* obtenido por HPLC-DAD ESI/MS a una $\lambda=254$ nm



Fuente: elaboración propia.

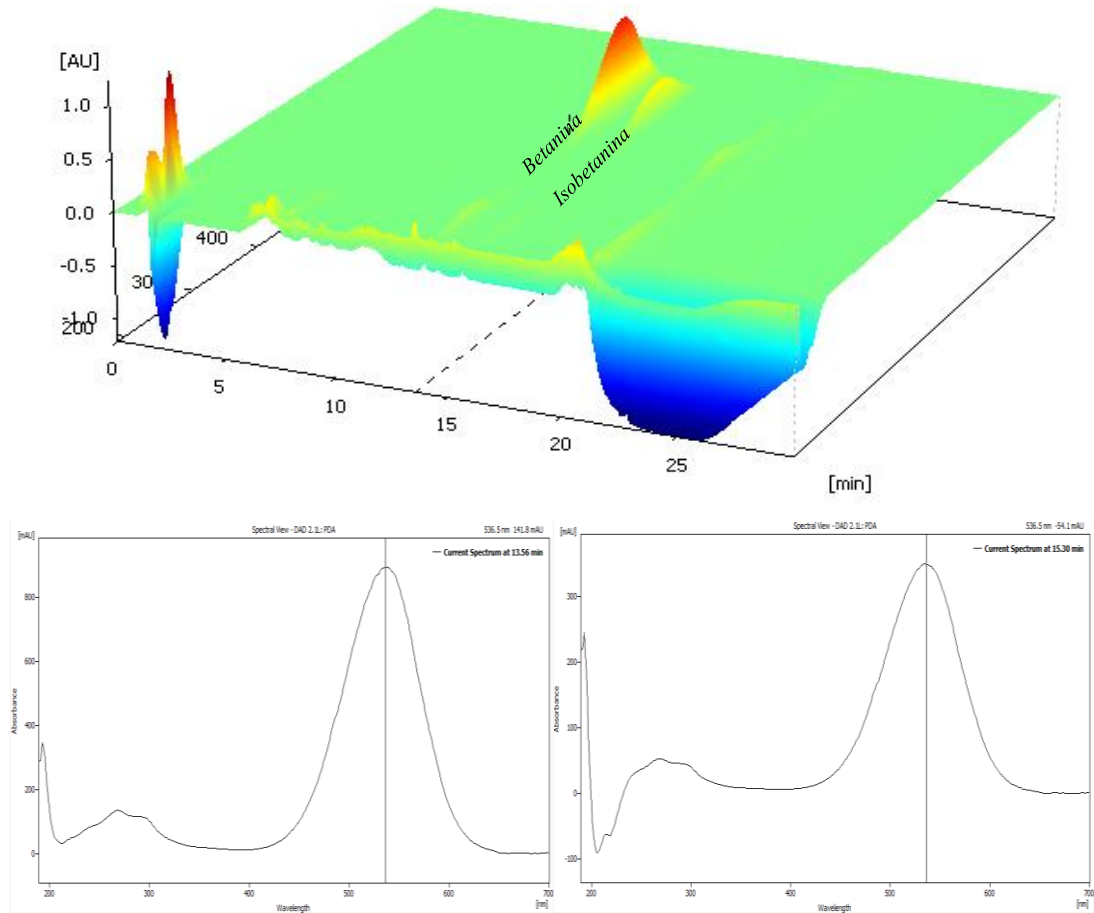
Tabla 4-5 Compuestos detectados en el espectro de masas del extracto de *O. soehrensii* obtenido por HPLC-DAD ESI/MS

	Compuesto	t_r [min]	UV-vis λ_{max} [nm]	$[M+H]^+$ m/z	HPLC-ESI [+] Ión fragmentos m/z
1	Ni*	1.58	227, 195	381	337, 264, 246, 234, 216, 149
2	Ni*	3.70	258, 220, 195	347	329, 325, 262, 157, 152, 136
3	Ni*	6.90	267, 220, 192	370	325, 299, 276, 258, 189, 180, 157, 143
4	Ni*	9.54	279	386	299, 189, 166, 157, 141, 132, 120
5	Ni*	12.02	308, 253	408	355, 309, 299, 224, 189, 171, 157
6	Ni*	12.76	253	369	325, 299, 203, 189, 171, 167, 157
7	Betanina	13.58	536	551	389, 299, 203, 189, 157
8	Ni*	14.24	276	299	205, 188, 159, 146, 132
9	Isobetanina	15.32	536	551	389, 299, 203, 189, 157
10	Filocactina	19.15	536	638	551, 325, 299, 213, 203, 199, 189, 157
11	Ni*	20.54	277, 233	765	562, 299, 213, 189

*Ni = No identificado

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-4 Cromatograma en 3 dimensiones del extracto acuoso de *O. soehrensii* obtenido por HPLC-DAD ESI/MS



Fuente: Elaboración propia.

4.2.6.2. Fraccionamiento del extracto acuoso

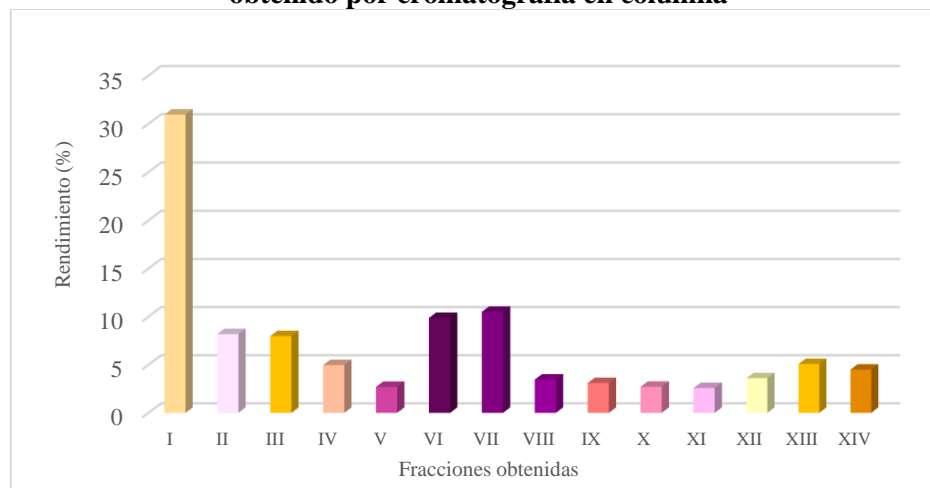
Los rendimientos calculados para las fracciones aisladas de acuerdo a su coloración, se observan en la TABLA 4-6 y ANEXO A-5. En donde la fracción I es la mayoritaria con el 30,90%, seguidas de las fracciones VII con el 10,49% y VI con el 9,85% respecto a la masa total de las fracciones (véase GRAFICO 4-5). Respecto a la masa total de extracto sembrado, se ha recuperado un 88,01% con todas las fracciones eluidas.

Tabla 4-6 Fraccionamiento por cromatografía en columna (C₁₈) del extracto de *O. soehrensii*

Fracción eluida	Coloración de las fracciones separadas	Fracción (g)	Fracción (%) (en base al total de fracciones)	Fracción (%) (en base al exto. sembrado)
I		0,57	30,90	27,20
II		0,15	8,18	7,20
III		0,15	7,96	7,01
IV		0,09	4,95	4,36
V		0,05	2,69	2,37
VI		0,18	9,85	8,67
VII		0,19	10,49	9,23
VIII		0,06	3,46	3,04
IX		0,06	3,09	2,72
X		0,05	2,71	2,38
XI		0,05	2,57	2,26
XII		0,07	3,60	3,17
XIII		0,09	5,07	4,46
XIV		0,08	4,49	3,95
Total		1,85	100,00	88,01

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 4-5 Rendimiento porcentual del fraccionamiento de extracto de *O. soehrensii* obtenido por cromatografía en columna



Fuente: Elaboración propia

4.2.6.3. Identificación de compuestos químicos por HPLC-DAD ESI/MS

El análisis del perfil cromatográfico y espectro de masas generado para todas las fracciones a $\lambda=536\text{nm}$, mediante la relación de la masa y la absorbancia máxima de los picos, ha permitido la identificación con certeza de los compuestos betanina ($t_r=13,65\text{min}$; $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z=551$) en la fracción VI, isobetanina ($t_r=15,51\text{ min}$; $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z=551$) en la

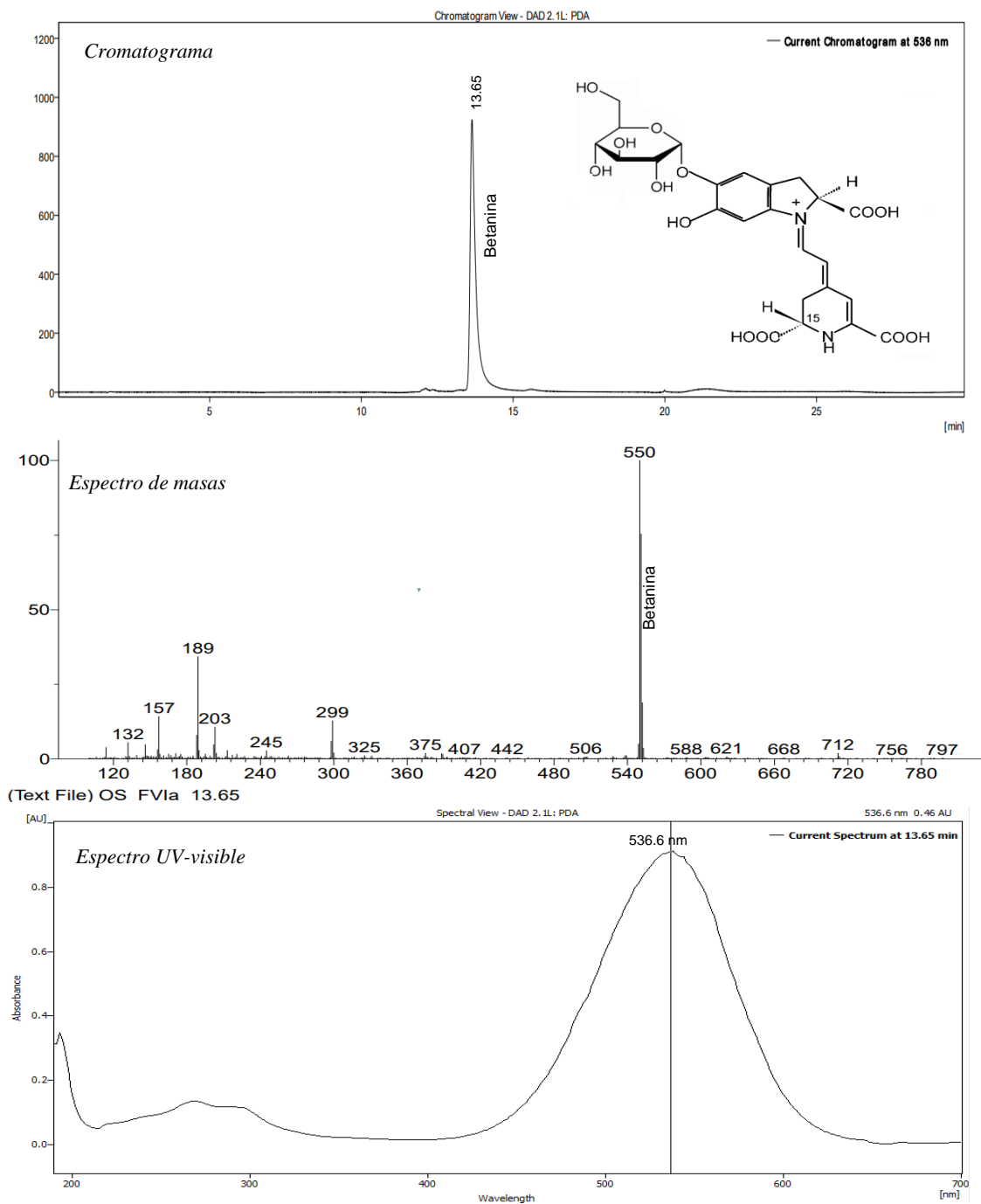
fracción VII y filocactina ($t_r=20,23$ min; $[M+H]^+$ $m/z=638$) en la fracción X (véase GRÁFICO 4-6), tal como se ha reportado para esta especie y similares (Jerz y otros, 2013; Garcia y otros, 2018; Ho Suh y otros, 2014).

Las fracciones analizadas a $\lambda=254$ nm, además de evidenciar la presencia de los compuestos detectados a $\lambda=536$ nm, también muestra la presencia de otros compuestos que se citan en la tabla 4-7, haciendo alusión a su masa y longitud de onda de máxima absorción UV-visible, de los picos más prominentes y con mejor resolución de su perfil cromatográfico. De esta manera, el compuesto con $t_r=9,32$ min ($[M+H]^+$ $m/z=325$) de la fracción IV, por su masa molecular, podría tratarse de vulgaxantina IV, sin embargo, su λ_{max} (281, 220, 200 nm), no concuerda con los valores teóricos esperados para betaxantinas (460 a 480 nm), aunque su coloración amarilla, da indicios de que podría tratarse de este tipo de compuestos (Herbach y otros, 2006). Por las absorbancias máximas del espectro de este compuesto, es posible que se trate de un lignano (206-287 nm), al igual que los compuestos no identificados de las fracciones I ($t_r=1,48$ min $[M+H]^+$ $m/z=381$; $\lambda_{max}=220, 195$ nm; $t_r=1,76$ min $[M+H]^+$ $m/z=542$; $\lambda_{max}=221, 196$ nm), fracción II ($t_r=2,72$ min $[M+H]^+$ $m/z=342$; $\lambda_{max}=217, 205$ nm), fracción III ($t_r=6,88$ min $[M+H]^+$ $m/z=370$; $\lambda_{max}=270, 222, 196$ nm), fracción VI ($t_r=13,07$ min $[M+H]^+$ $m/z=369$; $\lambda_{max}=256, 192$ nm), fracción X ($t_r=15,02$ min $[M+H]^+$ $m/z=205$; $\lambda_{max}=278$ nm), fracción XIII ($t_r=20,53$ min $[M+H]^+$ $m/z=765$; $\lambda_{max}=277, 220, 196$ nm) y la fracción XIV ($t_r=21,3$ min $[M+H]^+$ $m/z=701$; $\lambda_{max}=250, 194$ nm) (Eklund y otros, 2007; Kosińska y otros, 2011; Haribabua y otros, 2015).

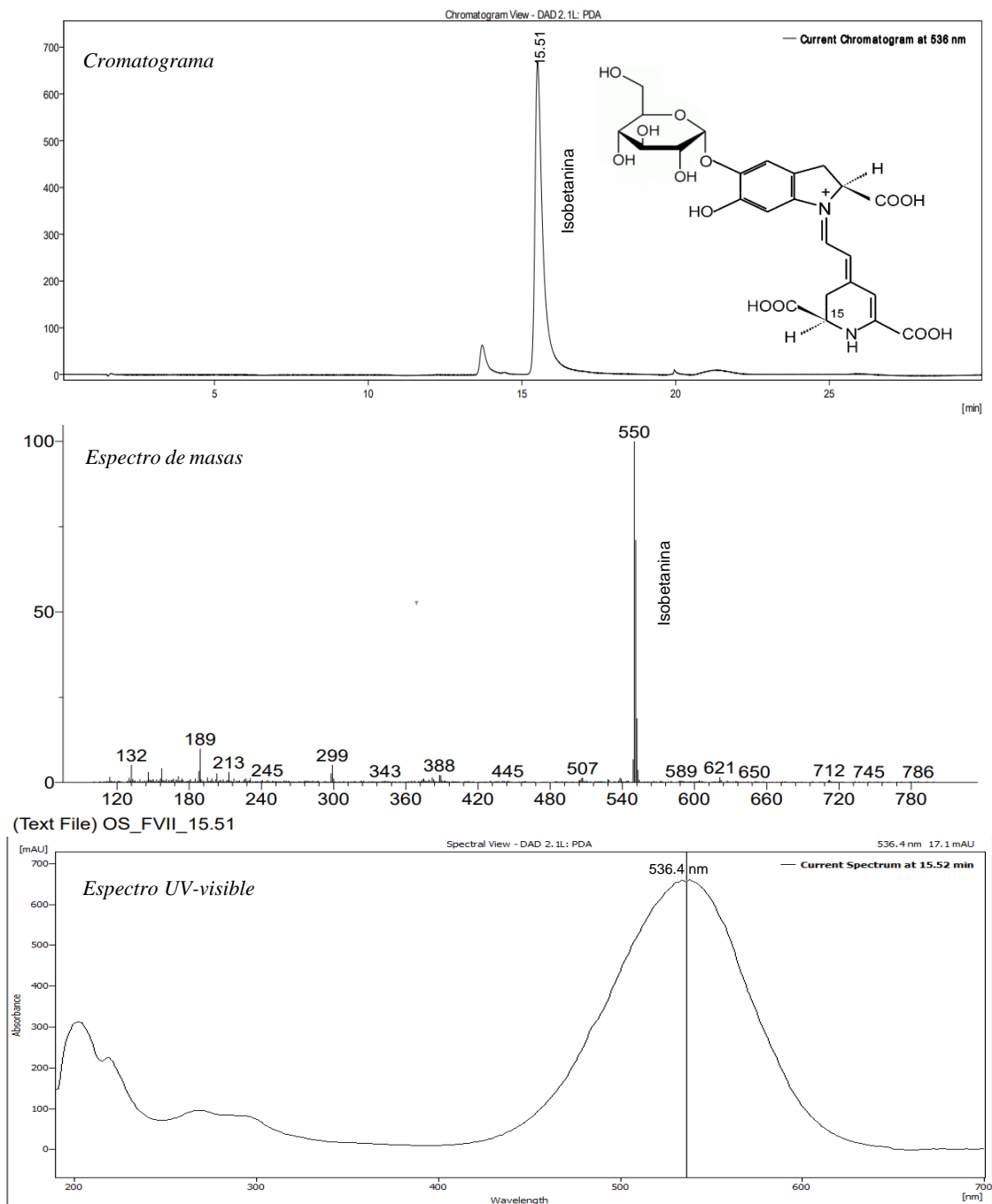
Otro compuesto detectado en la fracción VI a un $t_r=12,25$ min, por su masa molecular $[M+H]^+$ $m/z=355$, podría tratarse del lignano hinokinina, sin embargo al analizar sus absorbancias máximas (306, 253, 193nm), se descarta esta posibilidad, pudiéndose tratar de un flavonoide tanto por su coloración amarilla que es característica para este tipo de compuestos y por su longitud de onda de máxima absorción (240-285nm y 300-400nm), al igual que el compuesto no identificado de la fracción V ($t_r=11,96$ min $[M+H]^+$ $m/z=408$; $\lambda_{max}=305, 219, 204$ nm) (Markham & Mabry, 1975).

Gráfico 4-6 Cromatograma, espectro de masas y espectro UV-visible de compuestos identificados en el fraccionamiento del extracto de *O. soehrensii* por HPLC-DAD ESI/MS ($\lambda=536$ nm). A) Betanina: Fracción VI, B) Isobetanina: Fracción VII y C) Filocactina: Fracción X

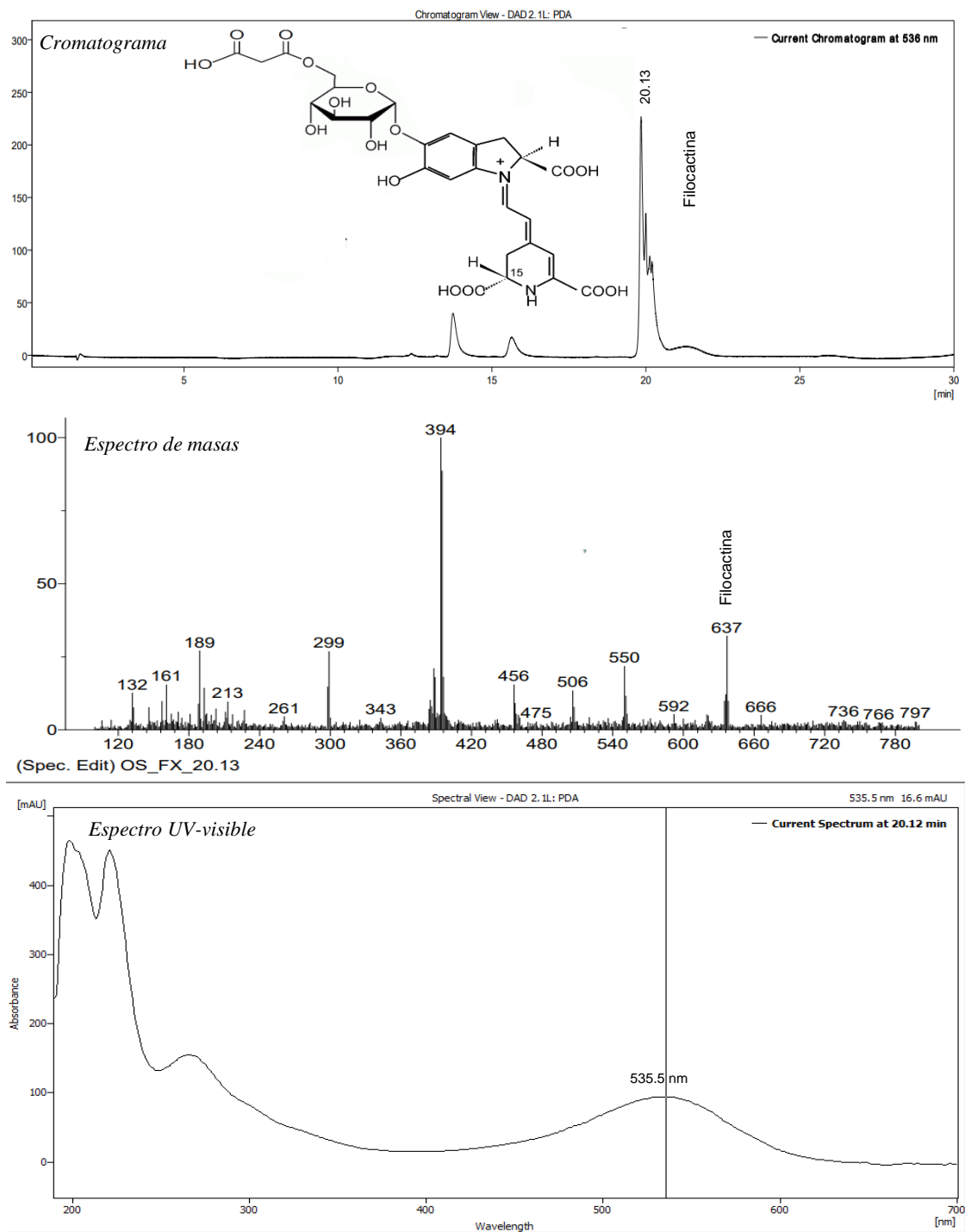
A) Betanina: Fracción VI



B) Isobetanina: Fracción VII



C) Filocactina: Fracción X



Fuente: elaboración propia.

Los compuestos no identificados de las fracciones VIII–IX ($t_r=19,99\text{min}$ $[M+H]^+$ $m/z=751$; $\lambda_{\text{max}}=536, 220, 203\text{nm}$) y XI–XII ($t_r=20,23\text{min}$ $[M+H]^+$ $m/z=737$; $\lambda_{\text{max}}=536, 452, 232\text{nm}$), por su longitud de onda de máxima absorción es muy probable que se traten de betacianinas (Tipe & Lock, 1990).

Los compuestos que fueron aislados, purificados e identificados como betanina e isobetanina, fueron empleados como sustancias de referencia en los análisis de valoración e identificación del extracto y de la forma farmacéutica obtenida a partir de dicho extracto.

Tabla 4-7 Compuestos detectados en fracciones del extracto de *O. soehrensii* por HPLC-DAD ESI/MS

Fracción	t_r [min]	UV-vis λ_{max} [nm]	$[M+H]^+$ m/z	HPLC-ESI (+) Ión fragmentos m/z	Compuesto identificado
I	1,48	220, 195	381	337, 234, 216, 152, 148	Ni*
	1,76	221,196	542	381, 292, 248, 157, 116, 104	Ni*
II	2,72	217, 205	342	299, 132, 136, 152, 157, 171, 189, 205	Ni*
III	6,88	270, 222, 196	370	325, 299, 276, 258, 229, 203, 189, 180, 157, 143, 121	Ni*
IV	9,32	281,220, 200	325	299, 203, 189, 157, 141, 114	Ni*
V	11,96	305, 219, 204	408	299, 224, 203, 189, 157, 146, 132, 114	Ni*
	12,25	306, 253, 193	355	309, 299, 203, 189, 157, 132	Ni*
VI	13,07	256, 192	369	299, 203, 189, 167, 157, 146	Ni*
	13,65	536	551	299, 203, 189, 157, 132	Betanina **
VII	13,70	536	551	299, 203, 189, 157, 132	Betanina**
	15,51	536	551	299, 189, 157, 132	Isobetanina**
VIII y IX	19,99	536, 220, 203	751	726, 636, 621, 550, 506, 390, 299, 227, 213, 189, 157, 132	Ni*
X	13,74	536	551	299, 213, 203, 189, 157, 132	Betanina **
	15,02	278	205	188, 159,146, 132	Ni*
	20,13	536, 266, 221, 198	638	550, 506, 456, 394, 388, 299, 189	Filocactina **
XI y XII	20,23	536, 452, 232	737	637, 675, 594, 551, 505, 389, 299, 189, 157	Ni*
XIII	20,53	277, 220, 196	765	650, 575, 563, 469, 393, 330, 299, 213, 189, 157	Ni*
XIV	21,30	250,194	701	679, 359, 299	Ni*

*Ni = No identificado, ** Jerz, Klose, Wybraniec, Villanueva, & Winterhalter (2013)

Fuente: Elaboración propia

4.2.7. Estructura de compuestos químicos identificados en el extracto

Los compuestos identificados en el extracto acuoso de semillas de *O. soehrensii* por HPLC-DAD ESI/MS, son la betanina, isobetanina y filocactina (véase TABLA 4-8).

Corroborando de esta manera, los resultados hallados para esta misma especie por otros autores (Tipe & Lock, 1990; Jerz y otros, 2013).

Tabla 4-8 Compuestos identificados en extracto acuoso de semillas de *O. soehrensii*

Fórmula empírica y nomenclatura		Fórmula estructural
Betacianinas	<p>Betanina $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$ PM = 550,5 g/mol $\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$ (535-538 nm) (Biswas y otros, 2013) Betanina: (2S) -1 - [(2E) -2 - [(2S) -2,6-dicarboxi-2,3-dihidro-1H-piridin-4-ilideno] etilideno] -6-hidroxi-5 - [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxi-2,3-dihidroindol-1-ium-2-carboxilato (PMDB, 2019)</p>	
	<p>Isobetanina $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$ PM = 550,5 g/mol $\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$ (535-538 nm) (Biswas y otros, 2013) Betanina: (2R) -1 - [(2E) -2 - [(2R) -2,6-dicarboxi-2,3-dihidro-1H-piridin-4-ilideno] etilideno] -6-hidroxi-5 - [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxi-2,3-dihidroindol-1-ium-2-carboxilato (PMDB, 2019)</p>	
	<p>Filolactina $C_{27}H_{29}N_2O_{16}$ PM= 636,5 g/mol $\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$ (Mosquera y otros, 2020) (2S) -4- [2 - [(2S) -2-carboxi-5 - [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -6 - [(2-carboxiacetil) oximetil] -3,4,5- ácido trihidroxioxan-2-il] oxi-6-hidroxi-2,3-dihidroindol-1-io-1-iliden] etiliden] -2,3-dihidro-1H-piridin-2,6-dicarboxílico (PMDB, 2019)</p>	<p>Filolactina (15): HOOC Isofilolactina (15): HOOC —</p>

Fuente: Biswas y otros (2013), PMDB (2019) y Mosquera y otros (2020)

4.2.8. Métodos de análisis propuestos para el extracto como materia prima

4.2.8.1. Métodos analíticos de identificación

a) Identificación por espectrofotometría UV – visible

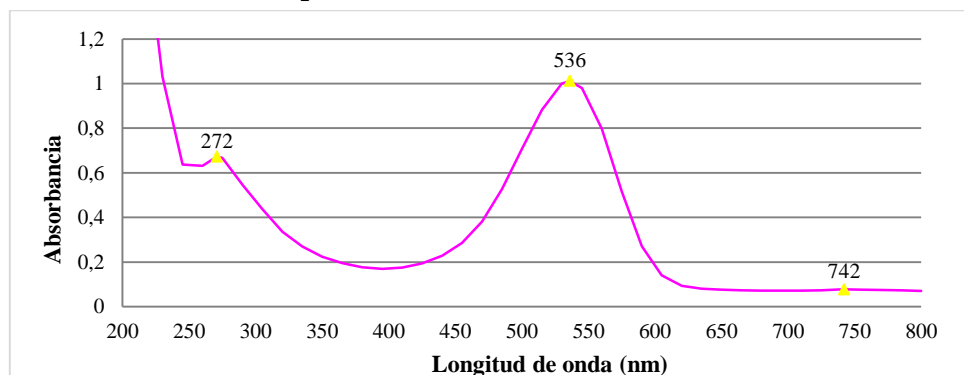
El patrón del espectro de absorción UV–vis del extracto de *O. soehrensii* (véase GRÁFICO 4-7), presenta dos picos de absorción máxima, el primero de mayor intensidad

en la región visible a 536 nm, característico de las betalaínas de tipo betacianinas y el segundo de menor intensidad en la región UV a 272 nm, posiblemente se trate de la ciclo-Dopa, compuesto que forma parte de la estructura de betacianinas, sin embargo, también podría tratarse de la presencia de proteínas; de forma adicional se observa un tercer pico a 742 nm imperceptible en el espectro pero detectado por el equipo (Tipe & Lock, 1990; Sánchez, 2006).

De acuerdo a la bibliografía existente, este espectro de absorción, es semejante a los obtenidos para esta especie por Tipe & Lock de Ugaz (1990), quienes también encontraron éste mismo patrón de absorbancia en el rango comprendido entre 350 y 650 nm de longitud de onda, mostrando un pico de absorbancia máxima a 536 nm de longitud de onda que evidencia la presencia de betanina, exactamente igual al obtenido con nuestra especie en estudio (Tipe & Lock, 1990).

De similar forma, un estudio de caracterización de pigmentos en diversas especies de *Amaranthus*, ha obtenido un espectro UV-visible con picos de absorbancia máxima a 535nm, 268 nm y 214 nm, que afirman la presencia de betalaínas de tipo betacianinas de forma muy idéntica en relación con nuestro extracto (Cai y otros, 1998). Estos estudios nos permiten aseverar que el extracto de *O. soehrensii*, presenta una cantidad importante de betalaínas de tipo betacianinas, siendo la betanina el compuesto más abundante de acuerdo a la intensidad de absorción que refleja su espectro UV-visible, dato que se corrobora con la identificación de este compuesto mediante HPLC-DAD- ESI/MS en el capítulo 4.2.6.

Gráfico 4-7. Espectro UV-visible del extracto de *O. soehrensii*



Fuente: Elaboración propia.

La comparación del espectro de absorción UV-vis del extracto *O. soehrensii* con los de *O. ficus indica* y *B. vulgaris*, nos ha permitido establecer ciertas similitudes y discrepancias respecto a los picos generados y sus intensidades correspondientes (véase ANEXO A-8), pudiéndose apreciar de forma evidente la ausencia de un pico correspondiente a betaxantinas en *O. soehrensii* a diferencia de las otras especies (Fernandez & Almela, 2001; Bilyc, 1979; Sánchez, 2006). La relación de proporcionalidad entre las intensidades de los picos de estas especies en términos porcentuales, se puede observar en el ANEXO A-9 y A-10.

b) Identificación por HPLC-DAD y HPLC-DAD ESI/MS

Considerando que el análisis de identificación del extracto será un ensayo de rutina previo a la transformación de la materia prima en un producto farmacéutico, este no deberá ser costoso, por tal motivo el método de identificación de compuestos por HPLC-DAD-ESI/MS propuesto en el capítulo 3.5.6.1, si bien sería el indicado para realizar este análisis de identificación bajo las mismas condiciones, este resulta ser muy costoso, por tal motivo fue simplificado a un análisis por HPLC-DAD. Para este efecto, se ha considerado al perfil cromatográfico obtenido a $\lambda=254$ nm, como patrón en el análisis de identificación del extracto de *O. soehrensii*, para ello dicho perfil deberá presentar la resolución de los picos y sus correspondientes espectros de absorción UV-vis que se describen en la tabla 4-9, de los cuales, la presencia del pico que presenta un $t_r=6,90\text{min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=370$; $\lambda_{\text{max}}=267, 220, 192, \text{nm}$) marca la diferencia más importante de esta especie frente a otras similares, considerándolo de esta manera como el marcador fitoquímico de identificación principal, seguido de los picos de $t_r=12,02\text{min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=408$; $\lambda_{\text{max}}=308, 253\text{nm}$) y $t_r=12,74 \text{ min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=369$; $\lambda_{\text{max}}=253 \text{ nm}$) para llevar a cabo la identificación de esta especie, sumado a la relación de proporcionalidad entre las áreas de los picos correspondientes a betanina de $t_r=13,58\text{min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=551$; $\lambda_{\text{max}}=536 \text{ nm}$) e isobetanina de $t_r=15,32\text{min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=551$; $\lambda_{\text{max}}=536 \text{ nm}$) (véase ANEXO A-6 a) y TABLA 4-10).

Otra propuesta interesante es el análisis del perfil cromatográfico obtenido a $\lambda=480$ nm, como patrón en la identificación del extracto de *O. soehrensii*, para ello dicho perfil deberá

presentar la resolución muy bien definida de los picos y sus correspondientes espectros de absorción UV-vis, tal como se observa en el cromatograma del ANEXO A-6 b).

La obtención del perfil cromatográfico bajo las condiciones de trabajo que se describen en el siguiente capítulo de análisis de valoración, nos genera otra opción para la identificación del extracto, esta consiste en considerar la relación de proporcionalidad de áreas que existe entre los picos de betanina e isobetanina, los que comparados con los cromatogramas de otras especies de composición similar, presentan proporciones diferentes a las encontradas en *O. soehrensii* (véase ANEXO A-11) (Castellanos & Yahia, 2008; Cejudo y otros, 2014; Schwartz & von Elbe, 1980; Garcia y otros, 2018).

Tabla 4-9 Picos y espectros de absorción UV-vis para la identificación del extracto de *O. soehrensii* por HPLC-DAD

	Compuesto	t _r [min]	UV-vis
			λ _{max} [nm]
1	Ni*	1.58	195, 227
2	Ni*	3.70	195, 220, 258
3	Ni*	6.90	192, 220, 267
4	Ni*	12.02	308, 253
5	Ni*	12.76	253
6	Betanina	13.58	536
7	Ni*	14.24	276
8	Isobetanina	15.32	536
9	Ni*	20.54	233, 277

*Ni = No identificado

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4-10 Comparación de la relación porcentual de áreas de betanina e isobetanina de la especie *O. soehrensii* por HPLC-DAD ESI/MS

Especie botánica	Betanina		Isobetanina		Área total	Relación porcentual de áreas (%)	
	t _r	Área	t _r	Área		Betanina	Isobetanina
<i>O. soehrensii</i>	13,58	1714,78	15,33	979,92	2694,70	63,64	36,36

Fuente: Elaboración propia.

4.2.8.2. Métodos analíticos de valoración

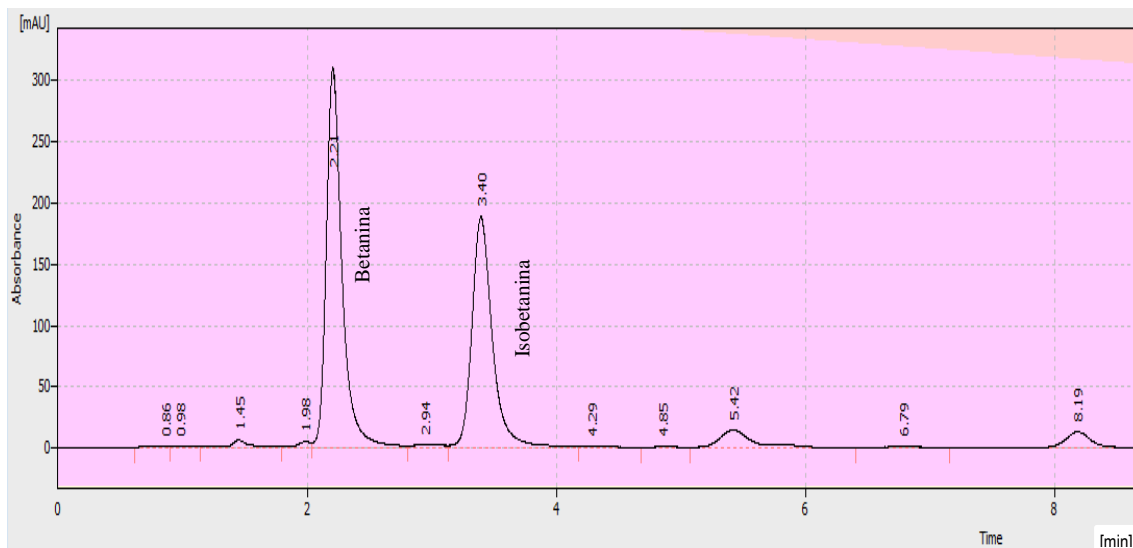
a) Valoración por HPLC-DAD

Para llevar a cabo este análisis, se ha designado como marcadores fitoquímicos de valoración del extracto de *O. soehrensii*, a la betanina e isobetanina, basados en los estudios realizados por espectrometría de masas en capítulos anteriores.

❖ Cuantificación de betanina

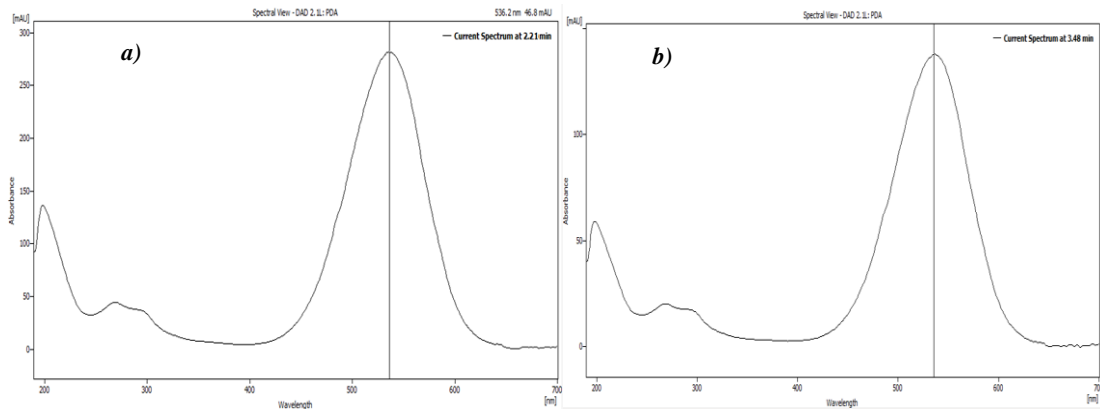
De acuerdo a los análisis de identificación del extracto de *O. soehrensii*, se optó por designar como marcador fitoquímico a la betanina, como compuesto mayoritario con una resolución muy buena a $\lambda_{\max}=536$ nm, respecto a otros compuestos del extracto y por tanto cuantificable. El perfil cromatográfico obtenido denota muy buena resolución de los picos de betanina e isobetanina (véase GRÁFICO 4-8). Los gráficos 4-9 y 4-10 nos muestran los espectros de absorción UV-vis de los picos correspondientes a betanina e isobetanina en el extracto estudiado, pudiéndose apreciar una $\lambda_{\max} = 536$ nm en ambos picos.

Gráfico 4-8 Cromatograma del extracto de *O. soehrensii* a $\lambda_{\max}= 536$ nm



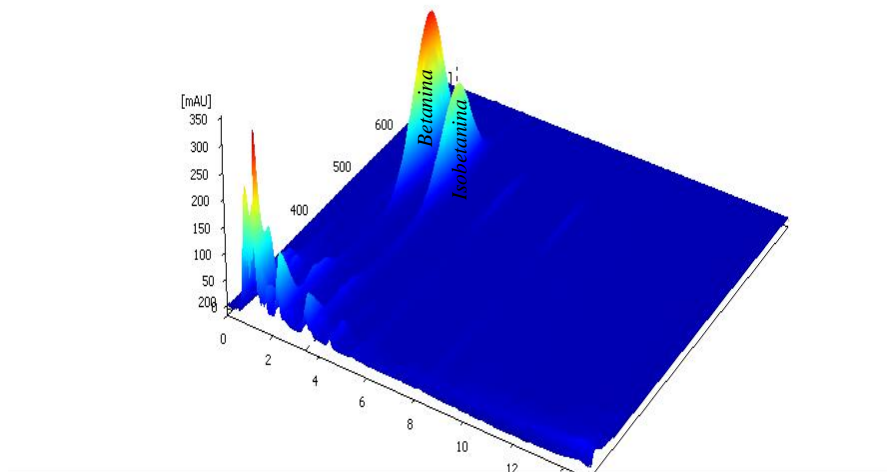
Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-9 Espectro de absorción UV- visible de a) Betanina y b) Isobetanina con $\lambda_{\max}= 536 \text{ nm}$ en ambos picos



Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-10 Cromatograma tridimensional del extracto *O. soehrensii* a $\lambda_{\max}=536 \text{ nm}$ (Betanina $t_r=2,21 \text{ min}$ e isobetanina $t_r=3,40 \text{ min}$)



Fuente: Elaboración propia.

Para llevar a cabo el análisis de cuantificación, se ha construido una curva de calibración con diez concentraciones por triplicado con el estándar betanina obtenida del extracto de semillas de *O. soehrensii* (véase TABLA 4-11). Se ha aplicado regresión lineal a dichos datos, cuyos resultados demuestran un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones de 0,008 – 2,000 mg/mL en la curva de calibración, con un coeficiente de correlación lineal de 0,9996 y su coeficiente de determinación 0,9993

(véase GRÁFICO 4-11). Por lo que asumimos que existe una relación directamente proporcional entre las variables concentración y el área del estándar betanina.

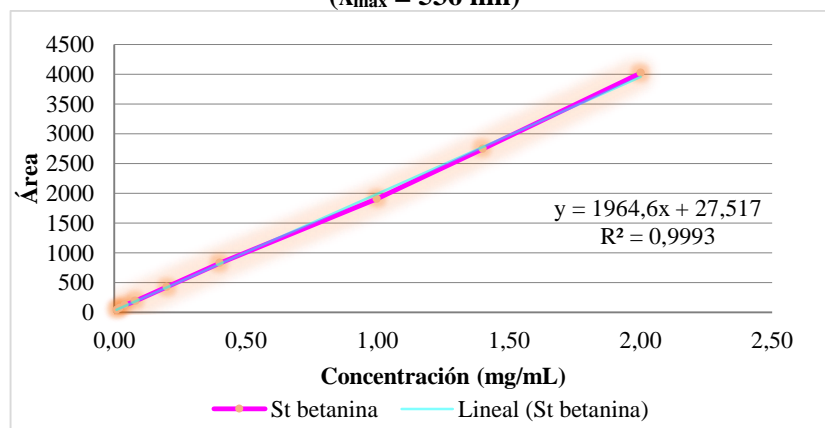
Tabla 4-11 Concentraciones y áreas del estándar (St) betanina obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda_{\max}=536$ nm

Código	Estándar betanina		
	c (mg/mL)	Área	t_r
C1	0,002	---	---
C2	0,004	---	---
C3	0,008	45,75	2,26
C4	0,020	72,59	2,24
C5	0,040	122,07	2,24
C6	0,080	194,40	2,23
C7	0,200	427,38	2,24
C8	0,400	827,33	2,23
C9	1,000	1910,21	2,22
C10	1,400	2745,67	2,21
CM	2,000	4015,94	2,18

Rango lineal

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-11 Curva de calibración del estándar (St) betanina obtenido por HPLC-DAD ($\lambda_{\max} = 536$ nm)



Fuente: Elaboración propia.

❖ Cuantificación de isobetanina

Para el ensayo de cuantificación de isobetanina se procedió de la misma manera que para el estándar de betanina. Designando en este caso como marcador fitoquímico a la isobetanina como segundo compuesto mayoritario cuantificable (véase GRÁFICO 4-8, 4-9 y 4-10).

Tabla 4-12 Concentraciones y áreas del estándar isobetanina obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda_{\text{max}}=536 \text{ nm}$

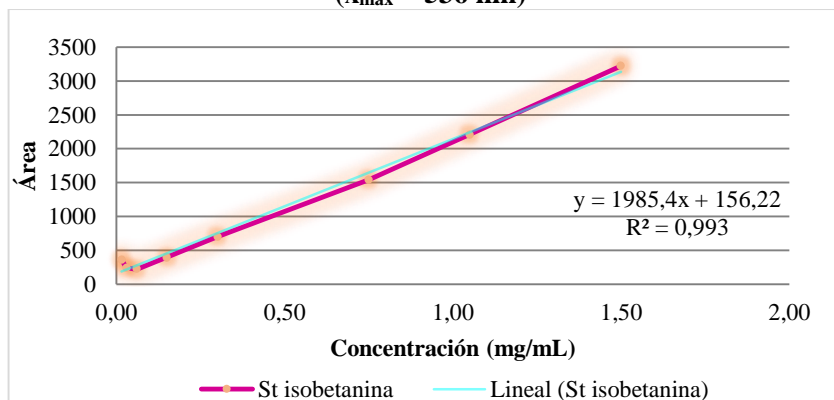
Estándar isobetanina			
Código	c (mg/mL)	Área	t _r
C1	0,002	---	---
C2	0,003	313,25	3,51
C3	0,006	364,93	3,45
C4	0,015	364,53	3,43
C5	0,030	242,79	3,43
C6	0,060	220,46	3,41
C7	0,150	398,06	3,42
C8	0,300	702,26	3,42
C9	0,750	1541,93	3,41
C10	1,050	2211,43	3,40
CM	1,500	3221,98	3,36

Rango lineal

Fuente: Elaboración propia.

La curva de calibración fue elaborada con diez concentraciones por triplicado del estándar isobetanina de *O. soehrensii*, cuyos datos se encuentran registrados en la tabla 4-12. El segmento lineal de esta curva de calibración se encuentra ubicado en el intervalo de concentración 0,015 – 1,500 mg/mL, siendo su coeficiente de correlación lineal de 0,9965 y su coeficiente de determinación 0,993 (véase GRÁFICO 4-12). Por lo que se asume que existe una relación directamente proporcional entre las variables concentración y el área del estándar isobetanina.

Gráfico 4-12 Curva de calibración del estándar (St) isobetanina obtenido por HPLC-DAD ($\lambda_{\text{max}} = 536 \text{ nm}$)



Fuente: Elaboración propia.

❖ Correlación entre áreas de betanina e isobetanina

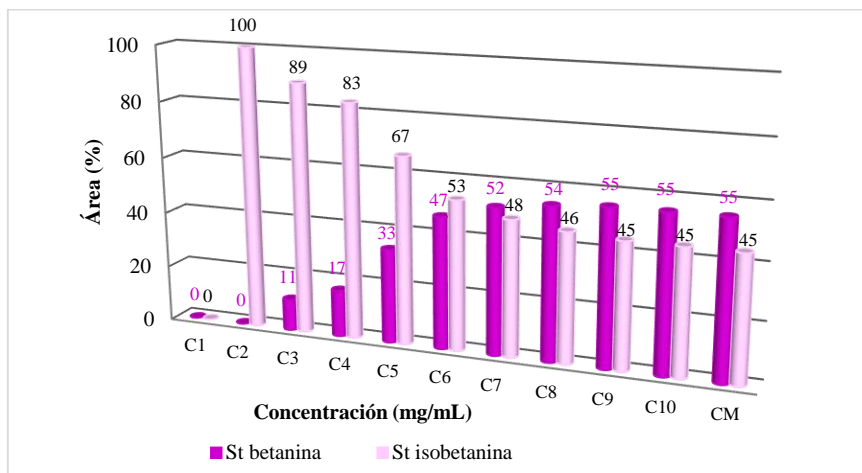
El comportamiento de la correlación de la proporcionalidad de áreas de los marcadores betanina e isobetanina expresados en términos porcentuales, nos permite establecer el intervalo de concentraciones en el que es pertinente realizar la cuantificación de estos compuestos en el extracto de *O. soehrensii* como materia prima, este comprende desde 0,400 - 2,000 mg/mL para betanina y 0,300 - 1,500 mg/mL para isobetanina (véase TABLA 4-13). El gráfico 4-13, nos muestra el comportamiento de las áreas en función a las concentraciones tanto del estándar betanina como de isobetanina, permitiéndonos evidenciar con bastante claridad el rango de concentraciones que permiten expresar una correlación porcentual casi constante entre estos compuestos, cuyas medias son de 55,07% y 44,93% respectivamente. El análisis del comportamiento individual de las áreas del estándar betanina respecto a las de la isobetanina en función de sus concentraciones, nos permite establecer como marcador fitoquímico de cuantificación principal a la betanina en el análisis de valoración del extracto de *O. soehrensii*.

Tabla 4-13 Concentraciones y áreas de los estándares betanina e isobetanina obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda_{\max}=536$ nm

Concentración	St betanina % Área	St isobetanina % Área	
C1	0,00	0,00	
C2	0,00	100,00	
C3	11,14	88,86	
C4	16,61	83,39	
C5	33,46	66,54	
C6	46,86	53,14	
C7	51,78	48,22	
C8	54,09	45,91	Rango acceptable
C9	55,33	44,67	
C10	55,39	44,61	
CM	55,48	44,52	
Promedio	55,07	44,93	
Mínimo	54,09	44,52	
Máximo	55,48	45,91	
s	0,66	0,66	
CV	1,20	1,47	

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-13 Comparación de la proporcionalidad de áreas (%) de los estándares betanina e isobetanina



Fuente: Elaboración propia.

El porcentaje de rendimiento del contenido de betanina en la muestra de extracto analizada corresponde a un 48,75% (área de betanina reportado= 942,98) y respecto al rendimiento de isobetanina, de un 35,56% (área de isobetanina reportado= 1568,43). Siendo la correlación porcentual entre las áreas entre dichos compuestos de 55,33% y 44,67%.

b) Valoración por espectrofotometría UV-visible

Las lecturas de las absorbancias a diferentes concentraciones del estándar betanina y extracto de *O. soehrensii*, se detallan en la tabla 4-14. Con estos datos, se confeccionó una curva de calibración, a la que se aplicó un análisis de regresión lineal que nos ha proporcionado un coeficiente de correlación lineal de 1 y un coeficiente de determinación 1 en ambos casos (véase GRÁFICO 4-14). Se asume que, en el rango de concentraciones evaluadas, existe una relación directamente proporcional entre las variables concentración y absorbancia. De esta manera establecemos estos rangos para realizar valoraciones de betanina y betacianinas de muestras de extracto de esta especie por este método.

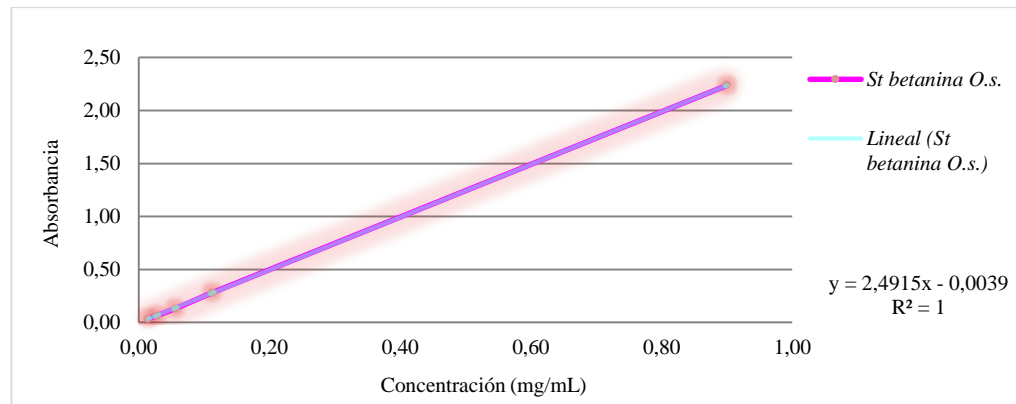
Tabla 4-14 Absorbancias obtenidas por E. UV-visible ($\lambda_{\max}=536$ nm del estándar) a diferentes concentraciones para betanina y extracto de *O. soehrensii*

N°	Estándar betanina de <i>O. soehrensii</i>		Estándar extracto <i>O.soehrensii</i>	
	Concentración (mg/mL)	Absorbancia ($\lambda_{\max}= 536$)	Concentración (mg/mL)	Absorbancia ($\lambda_{\max}= 536$)
1	0,01	0,03	0,04	0,07
2	0,03	0,07	0,08	0,14
3	0,06	0,13	0,16	0,28
4	0,11	0,28	0,79	1,31
5	0,90	2,24	1,97	3,26

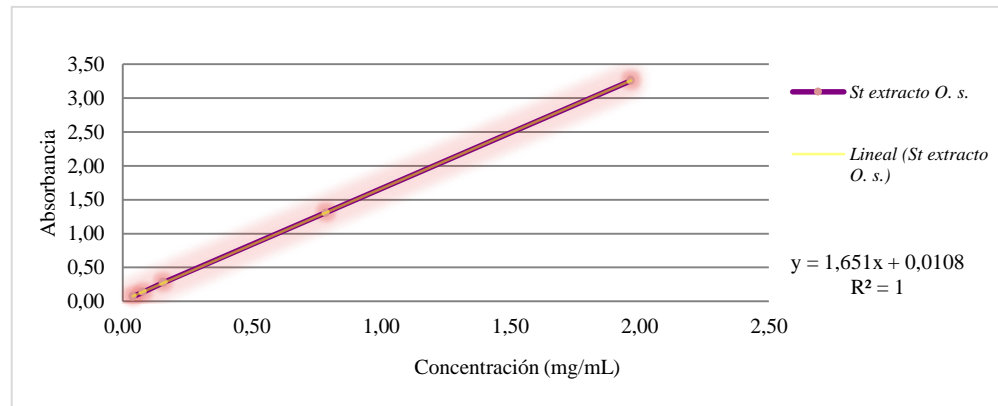
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 4-14 Curva de calibración obtenido por E. UV-visible a $\lambda_{\max}= 536$ nm para:

a) Estándar (St) betanina de *O. soehrensii*



b) Estándar (St) extracto de *O. soehrensii*



Fuente: Elaboración propia.

4.2.9. Estudio de estabilidad de pH del extracto

Se ha observado que los valores de pH que menor degradación mostraron a $\lambda=536$ nm, son a pH 7 (35%), pH 6 (42%), pH 5 (42%) y pH 4 (53%). Llegando a conformar el rango de pH 4 – 7 que reportó menor degradación, siendo a pH 7 el experimento que ha registrado menor degradación respecto a los otros experimentos (véase TABLA 4-15). Aunque hay publicaciones que han reportado como valor óptimo a pH 4 para el extracto *O. soehrensii*, el rango obtenido coincide respecto a otras publicaciones que citan un rango de pH estable de 3 a 7 (Tipe & Lock, 1990).

Los valores de pH que han evidenciado un porcentaje de degradación menor a una $\lambda=744$ nm, se dio a pH 8 y 10 con el 34 y 37% respectivamente. Respecto al porcentaje de degradación a $\lambda=272$ nm, se puede aseverar que la degradación no fue tan acentuada como lo reportado a $\lambda=536$ nm o 744 nm, siendo su promedio de degradación en general del 10,2% y en un caso (pH=10), incluso se vió que en lugar de sufrir degradación se observa un incremento de la cantidad de compuestos que absorben a dicha longitud de onda.

El espectro de absorción UV-vis obtenido para los experimentos de extracto de *O. soehrensii* sin modificación de pH (almacenados a 20°C +/-2°C y 4°C), se observan en el gráfico 4-15. Ambos espectros presentan 2 picos de máxima absorbancia, el más intenso a $\lambda=536$ nm, uno de menor intensidad a $\lambda=272$ nm y un tercer pico no perceptible a $\lambda=747$ nm, pero detectado por el equipo. El espectro del experimento almacenado a 20°C +/-2°C muestra un comportamiento similar al espectro de absorción obtenido para el experimento de pH 4, tanto en el porcentaje de degradación como sus máximas absorbancias (véase TABLA 4-15 y 4-16).

Respecto a los posibles desplazamientos de las absorbancias máximas en función al tiempo a $\lambda=536$ nm, podemos aseverar que los experimentos a pH 4 y 6 (véase ANEXO A-10), son los que han mostrado mayor estabilidad, evidenciando que sus absorbancias máximas iniciales de 536 nm disminuyen a 535 nm después de los 7 días, manteniéndose así hasta los 21 días (véase TABLA 4-16).

Tabla 4-15 Degradación porcentual del extracto de *O. soehrensii* en solución acuosa a diferentes valores de pH

pH	$\lambda=536$ nm	$\lambda=272$ nm	$\lambda=744$ nm
1	89	7	40
2	92	10	46
3	65	13	50
4	53	15	48
5	42	16	48
6	42	11	47
7	35	10	47
8	61	5	34
10	55	-1	37
Sin modificación	54	13	45
Sin modificación (4°C)	22	14	42

Fuente: Elaboración propia

Los espectros de absorción de los experimentos sin modificación de pH almacenados a 20°C y a 4°C (véase GRÁFICO 4-15), han mostrado sus longitudes de onda de absorción máxima de 536 nm, invariables en el tiempo, es decir no se han registrado desplazamiento alguno, manteniendo constante su longitud de onda de máxima absorbancia. Sin embargo, los experimentos a pH 1, 2, 3, 8 y 10 (véase ANEXO A-6), son los que han presentado un desplazamiento significativo de sus absorbancias máximas en función al tiempo (véase TABLA 4-16).

De manera adicional se hizo una lectura a los 47 días, con la que se pudo constatar que, en todos los experimentos, tanto el pico de absorción máxima a 536 nm como a 747 nm, se degradaron por completo a diferencia del pico a 272 nm que, al contrario, se hizo más intenso, sobre todo a pH 1, este fenómeno podría explicarse entendiendo que es probable que los productos de degradación de los otros compuestos que presentaban una absorbancia máxima ya sea a 536 o 742 nm, generan una absorción a 272 nm (véase ANEXO A-12).

Las absorbancias registradas a una $\lambda=536$ nm, en todos los experimentos, muestran un comportamiento decreciente en función del tiempo, lo que nos da a entender que está en curso un proceso de degradación de las betacianinas del extracto de *O. soehrensii* (véase GRÁFICO 4-16). Sin embargo, las absorbancias a una $\lambda=272$ nm en el primer día, registran un incremento aproximadamente del 5% y el segundo día muestran una caída

brusca que continua en decrecimiento hasta aproximadamente el quinto día y, es a partir de ese momento que se observa un incremento hasta el último día de experimentación (véase GRÁFICO 4-17).

Tabla 4-16 Estabilidad de las absorbancias máximas del extracto de *O. soehrensii* en solución acuosa a diferentes valores de pH en función del tiempo

pH	Inicio	2 días	7 días	21 días	47 días
1	536	539	536	504	---
2	536	534	531	517	---
3	536	535	534	531	---
4	536	536	535	535	---
5	536	536	534	534	---
6	536	536	535	535	---
7	536	536	535	534	---
8	536	538	535	534	---
10	536	546	535	530	---
Sin modificación	536	536	536	536	---
Sin modificación (4°C)	536	536	536	536	536

--- No se observa pico de absorción

Fuente: Elaboración propia.

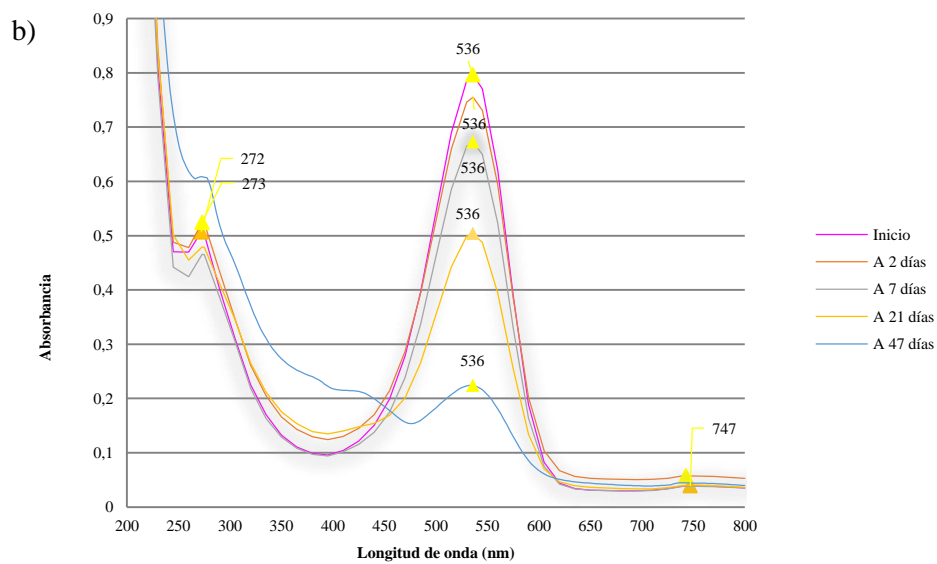
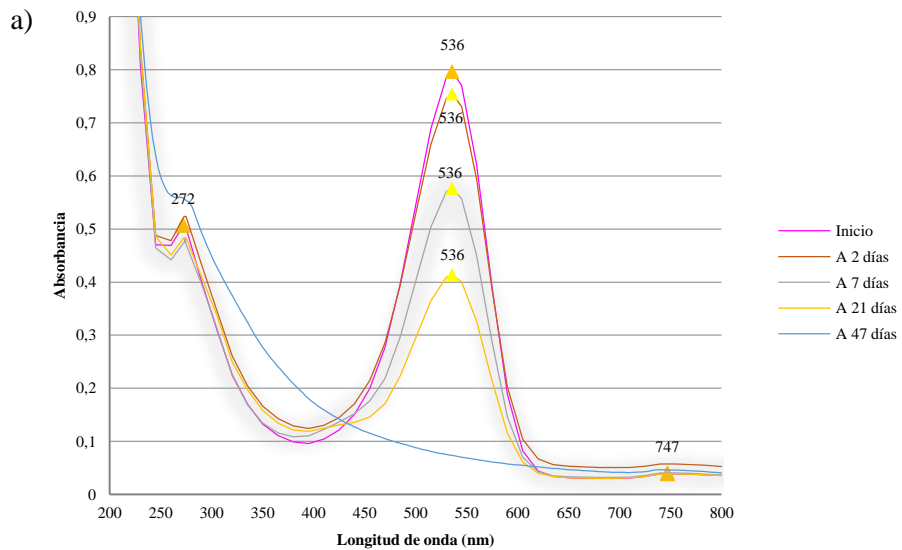
El conocimiento del rango de pH estable para el extracto de *O. soehrensii* en solución, nos permite tener control sobre esta característica para evitar el proceso de degradación de los componentes del extracto, durante procesos tanto de producción como de análisis en control de calidad, por efecto de solventes y otros componentes con los que podría interaccionar y dar lugar a degradación.

Las condiciones de trabajo para la obtención del extracto de *O. soehrensii* en el presente estudio, nos ha generado una solución de pH 4,5, que corresponde al rango estable de pH para esta especie de acuerdo a nuestro estudio de estabilidad, por tanto, no se ha necesitado la adición de ácidos como lo señalan estudios realizados con especies similares para evitar degradación de sus componentes, pues la propia composición de esta especie ha generado condiciones acidas aptas.

Por otro lado, el conocimiento del rango de pH estable, nos permite establecer el momento adecuado para la administración del extracto incluido en una forma farmacéutica, siendo conveniente que sea después de las comidas (estómago lleno) debido

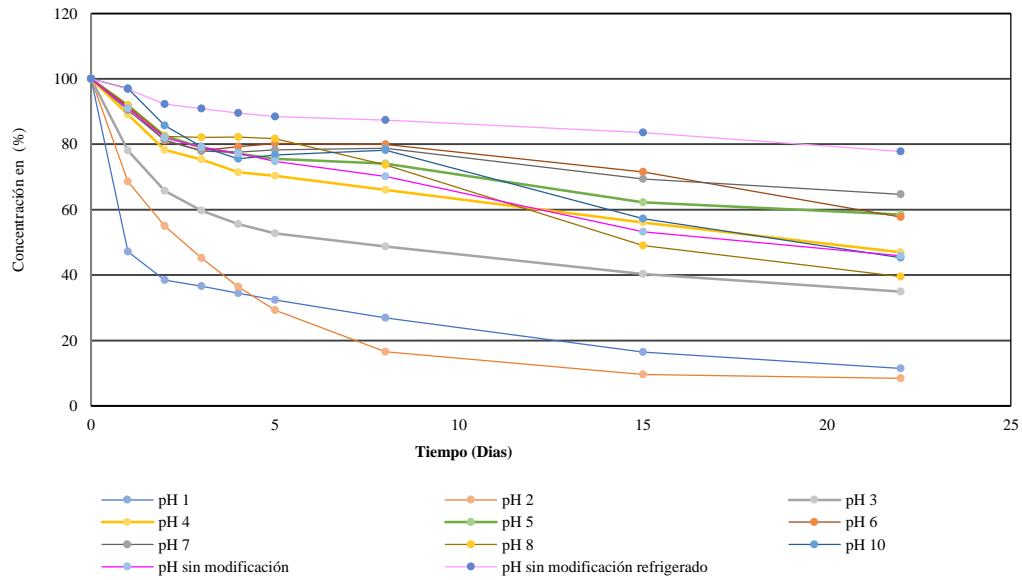
a que el pH en estas condiciones se encuentra entre 3,5 a 4, valores que se acercan al rango de pH estable (4-7) de nuestro estudio. No debe administrarse antes de las comidas (estómago vacío), debido a las condiciones de pH de aproximadamente 1, dato que según nuestros estudios de estabilidad genera degradación de los componentes del extracto.

Gráfico 4-15 Espectro de absorción UV-visible del extracto de *O. soehrensii* sin modificación de pH almacenado a 20°C a) y a 4°C b)



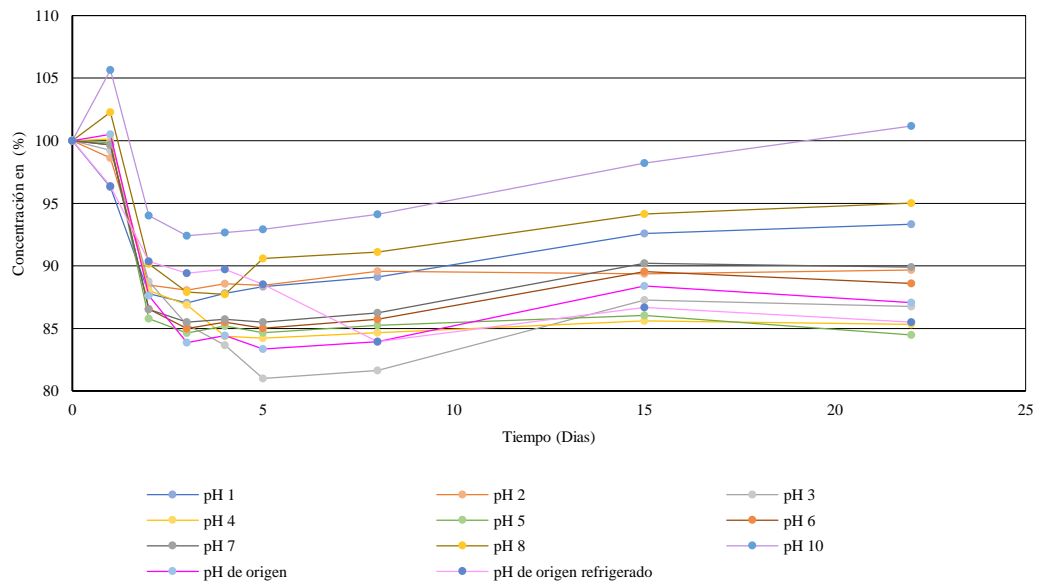
Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-16 Perfil de degradación de betacianinas ($\lambda_{\max}=536$ nm) del extracto *O. soehrensii* a diferentes valores de pH



Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-17 Perfil de degradación de compuestos de $\lambda_{\max}=272$ nm del extracto *O. soehrensii* a diferentes valores de pH



Fuente: Elaboración propia.

4.2.10. Estudio de la concentración de extracto por unidad de dosificación

❖ Estandarización de la cantidad de semillas

La cantidad de semillas obtenidas por cada modelo de cuchara ensayada al igual que sus promedios y desviaciones estándar se recogen en la tabla 4-17, en donde se observa que el promedio global encontrado por cuchara es de $7,42g \pm 0,36 g$.

Tabla 4-17 Masa promedio de semillas de *O. soehrensii* por cuchara

Nº de pesada	Cantidad de semillas (g)		
	Tipo de cuchara		
	1	2	3
1	6,23	6,53	8,98
2	6,77	7,10	9,03
3	6,93	6,49	8,37
4	5,99	7,53	8,72
5	6,72	6,87	8,56
6	6,65	7,28	8,43
7	7,04	6,93	8,84
8	6,77	7,45	8,66
9	6,40	6,45	8,40
10	6,69	7,02	8,82
Promedio	$6,62 \pm 0,23$	$6,96 \pm 0,28$	$8,68 \pm 0,17$
	Promedio global por cuchara		$7,42 \pm 0,36$

Fuente: Elaboración propia.

❖ Extracción acuosa por infusión

La cantidad de extracto seco obtenido por infusión correspondiente a una cuchara de semillas fue de $1,217g \pm 0,07g$, dándonos un porcentaje de rendimiento del $16,398 \pm 0,90\%$ (véase TABLA 4-18).

Tabla 4-18 Rendimiento porcentual de extracto seco de *O. soehrensii* obtenido por infusión

Nº Muestra	Semillas <i>O. soehrensii</i> (g)	Masa extracto liofilizado (g)	Rendimiento (%)
1	7,418	1,188	16,013
2	7,429	1,243	16,449
3	7,425	1,221	16,732
Promedio	$7,424 \pm 0,01$	$1,217 \pm 0,07$	$16,398 \pm 0,90$

Fuente: Elaboración propia.

❖ Cálculo de la cantidad de extracto por unidad de dosificación

Si bien se debe recurrir a investigaciones farmacológicas para la determinación del margen de seguridad para el extracto de la forma farmacéutica diseñada y definir su frecuencia de administración, se ha propuesto la administración de una unidad de dosificación cada 8 horas, considerando como base la ingestión oral a lo largo de un día, reportado en el uso medicinal tradicional por personas, de esta especie botánica (Navarro, 2012; PRODECO y CIMES, 2018; Girault, 1987a; Pardo, 2002; S/A, 2002).

Bajo las consideraciones planteadas, se ha visto conveniente fraccionar la cantidad de extracto obtenida por infusión en el anterior capítulo, en tres partes iguales, dándonos una cantidad de 0,406 g de extracto liofilizado. Esta cantidad de extracto es la que debe contener cada unidad de dosificación (véase TABLA 4-19).

Tabla 4-19 Cantidad de extracto de *O. soehrensii* por unidad de dosificación

Masa de extracto obtenida por infusión (g)	Masa de extracto fraccionado en 3 partes (g)	Cantidad de extracto (g) por unidad de dosificación
1,217	0,406	0,406

Fuente: Elaboración propia.

4.2.11. Evaluación citotóxica del extracto acuoso de *O. soehrensii*

El extracto acuoso de *O. soehrensii* y sus fracciones obtenidas por cromatografía no presentan actividad citotóxica sobre la línea celular evaluada. Los resultados obtenidos tanto para el extracto y sus fracciones se encuentran muy distantes en relación al control positivo (Miltefosina CI_{50} de $8,2 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) droga utilizada como anticancerígeno (véase Anexo A-14).

Estos resultados de citotoxicidad, corroboran los obtenidos por otros autores para esta misma especie botánica (Zambrana, 2007; Guarachi, 2005).

4.2.12. Fase de formulación de comprimido

Los resultados obtenidos en la fase de formulación se describen a continuación:

4.2.12.1. Selección de agentes adsorbentes

Considerando que el criterio de elección mide la capacidad de adsorción del agente adsorbente, el almidón de maíz resultó tener mayor capacidad de adsorción, con una

cantidad empleada de 1,82 g para lograr adsorber 1 mL de extracto en solución, quedando en segundo lugar la celulosa microcristalina con 1,91 g y la lactosa en tercer lugar con 1,98 g (véase TABLA 4-20).

Respecto al ángulo de reposo medido, la celulosa micocristalina resultó con un ángulo de reposo de 25,64° con una propiedad de flujo excelente, a muy poca diferencia de la lactosa que presentó un ángulo de reposo de 25,87 ° con una propiedad de flujo también excelente, quedando en último lugar el almidón de maíz con un ángulo de reposo de 40,60°, con propiedades de flujo de tipo adecuado- no necesita ayuda, sin embargo, resultó ser un material manejable (USP 37/ NF 32, 2014).

Tabla 4-20 Selección del agente adsorbente

Adsorbente	Extracto (mL)	Cantidad mín. adicionada de adsorbente (g)	Ángulo de reposo (°)	Propiedades de flujo (USP 37)
Almidón de maíz	1	1,82	40,60	Adecuado-no se necesita ayuda
Celulosa microcristalina	1	1,91	25,64	Excelente
Lactosa	1	1,98	25,87	Excelente

Fuente: Elaboración propia.

En los resultados del proceso de compresión, el almidón adsorbido con extracto de *O. soehresii*, consigue la obtención de comprimidos frágiles que no tienen la resistencia mecánica suficiente para mantener su integridad; por tanto, el extracto no presenta la capacidad aglutinante necesaria que se esperaba. De manera similar se observó el comportamiento de los comprimidos obtenidos a base de celulosa microcristalina, a diferencia de los comprimidos obtenidos a base de lactosa que presentaron buena resistencia mecánica.

Considerando la intolerancia que puede presentar la lactosa después de su ingestión oral y el costo elevado de éste material, se han constituido en factores que han determinado sus desventajas frente al almidón de maíz que, al contrario, es un material muy tolerable y de costo bajo respecto a los otros adsorbentes.

De esta manera, considerando el comportamiento del extracto adsorbido en almidón de maíz, se ha propuesto la fabricación de comprimidos por vía húmeda, tal como se describe en el procedimiento de fabricación del capítulo 3.5.11.2.

La relación extracto-adsorbente (1:3.14), para alcanzar la concentración de 406 mg de extracto por unidad de dosificación implica el uso de 1274 mg de almidón de maíz, alcanzando 1680 mg de masa total por comprimido. El tamaño resultante de esta forma farmacéutica nos conduciría a la formulación comprimidos efervescentes, aunque el carácter muy higroscópico del extracto dificultaría el proceso de elaboración, las características organolépticas del extracto son bastante aceptables y agradables, sin embargo, son procesos que demandan condiciones de fabricación controladas que podrían influir en el costo elevado del producto. Por otro lado, la formulación de comprimidos para ingestión oral, nos permitiría incluir el 50,00% de la concentración de extracto para alcanzar un tamaño de comprimido aceptable que no provoque dificultad al momento de su deglución por el paciente. Entre otras opciones de comprimidos a formular están los de tipo masticables y dispersables, que por las características organolépticas del extracto serían bastante aceptables en dichas formas farmacéuticas.

4.2.12.2. Selección de excipientes mediante diseños estadísticos experimentales

Los excipientes y sus concentraciones propuestas en los niveles tanto positivo (+) y negativo (-), para la obtención de la forma farmacéutica comprimidos para ingestión oral, se detallan en la tabla 4-21, previa revisión bibliográfica de incompatibilidades del extracto de *O. soehrensii* con dichas sustancias.

Tabla 4-21 Nivel (+) y Nivel (-) de los excipientes propuestos

Código	Excipientes	Nivel (+)	Nivel (-)
A	Almidón de maíz aglutinante	5 %	0 %
B	Povidona aglutinante	5 %	0 %
C	Gelatina aglutinante	5 %	0 %
D	Sacarosa aglutinante	5 %	0 %
E	Avicel PH 101	5 %	0 %
F	Estearato de Mg	2 %	1 %
G	Almidón de maíz disgregante	5 %	4 % Croscarmelosa sódica

Fuente: Elaboración propia.

La matriz resultante construida conforme al diseño de Plackett – Burman con los excipientes propuestos, se muestra en la tabla 4-22. Esta matriz refleja que deben realizarse ocho corridas o experimentos para los siete factores planteados.

Tabla 4-22 Matriz basada en el diseño de Plackett – Burman

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

Fuente: Elaboración propia.

Los parámetros de evaluación de los experimentos en sus diferentes fases y los criterios de aceptación para cada experimento se detallan en la tabla 4-23. Estos parámetros han permitido la discriminación de experimentos con resultados aceptables de los no aceptables.

Tabla 4-23 Criterios de aceptación

Parámetro a evaluar	Especificaciones	Fase de aplicación
Ángulo de reposo	Adecuado	Granulación
Friabilidad	≤1%	Compresión
Porcentaje de disolución (<i>Q</i>)	≥80%	Compresión

Fuente: Elaboración propia

Los resultados del ángulo de reposo, friabilidad y porcentaje de disolución referentes a los 8 experimentos realizados, se observan en la Tabla 4-24 y el Anexo A-16.

El análisis de los resultados obtenidos, mediante la prueba de hipótesis haciendo referencia al valor $t_{\alpha/2;gl}$ ($t_{0.05; 6} = 1.94$), ha permitido la determinación de los factores con significancia en función al ángulo de reposo, friabilidad y porcentaje de disolución, que

se describen en las tablas 4-25, 4-26 y 4-27 respectivamente (véase ANEXO 13). La síntesis de los factores con significancia más relevantes se detalla en la tabla 4-28.

Tabla 4-24 Resultados de los parámetros evaluados en la fabricación de comprimidos

Corrida	Ángulo de reposo (°)	Friabilidad (%)	Porcentaje de disolución (Q)
1	42,15 ± 1,09	1,11 ± 0,04	85,04 ± 3,64
2	33,10 ± 1,30	0,21 ± 0,01	70,05 ± 1,79
3	25,69 ± 0,73	0,35 ± 0,02	73,47 ± 3,98
4	32,07 ± 0,92	0,36 ± 0,01	75,01 ± 2,34
5	43,26 ± 1,46	0,70 ± 0,01	79,07 ± 2,43
6	26,19 ± 0,73	0,43 ± 0,01	62,27 ± 1,84
7	38,07 ± 0,22	0,91 ± 0,004	98,10 ± 2,18
8	36,15 ± 0,21	1,24 ± 0,01	83,20 ± 1,58

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4-25 Resultados de significancia de los factores evaluados en función al ángulo de reposo

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
								Ángulo de reposo (°)
1	+	-	-	+	-	+	+	42,15
2	+	+	-	-	+	-	+	33,10
3	+	+	+	-	-	+	-	25,69
4	-	+	+	+	-	-	+	32,07
5	+	-	+	+	+	-	-	43,26
6	-	+	-	+	+	+	-	26,19
7	-	-	+	-	+	+	+	38,07
8	-	-	-	-	-	-	-	36,15
Σ(+)	144,20	117,04	139,09	143,67	140,62	132,09	145,38	
Σ(-)	132,47	159,63	137,58	133,00	136,05	144,58	131,29	
E	11,73	-42,59	1,51	10,67	4,57	-12,48	14,10	
E _i	2,93	-10,65	0,38	2,67	1,14	-3,12	3,52	
(E _i) ²	8,60	113,34	0,14	7,11	1,31	9,74	12,42	
t _i	1,54	-5,58	0,20	1,40	0,60	-1,64	1,85	
t _{crítico}	1,94	Σ(E _i) ²	152,66	s	4,67			

Prueba de hipótesis: Ho: El factor ensayado no tiene efecto significativo sobre el ángulo de reposo cuando $-t_{crítico} \leq t_i \leq t_{crítico}$

Ha: El factor ensayado tiene efecto significativo sobre el ángulo de reposo cuando $-t_{crítico} > t_i > t_{crítico}$

Decisión estadística: Se rechaza la Ho para el factor B debido a que presenta efecto significativo sobre el ángulo de reposo ($t_i = -5,58$). Por tanto, el diseño experimental recomienda incluirlo en la formulación. Sin embargo, se acepta la Ho para los factores A ($t_i = 1,54$), C ($t_i = 0,20$), D ($t_i = 1,40$), E ($t_i = 0,60$), F ($t_i = -1,64$) y G ($t_i = 1,85$).

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4-26 Resultados de significancia de los factores evaluados en función a la friabilidad

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA Friabilidad (%)
1	+	-	-	+	-	+	+	1,11
2	+	+	-	-	+	-	+	0,21
3	+	+	+	-	-	+	-	0,35
4	-	+	+	+	-	-	+	0,36
5	+	-	+	+	+	-	-	0,70
6	-	+	-	+	+	+	-	0,43
7	-	-	+	-	+	+	+	0,91
8	-	-	-	-	-	-	-	1,24
$\Sigma(+)$	2,36	1,34	2,31	2,59	2,24	2,79	2,58	
$\Sigma(-)$	2,93	3,95	2,98	2,70	3,05	2,50	2,71	
E	-0,57	-2,61	-0,67	-0,12	-0,81	0,29	-0,14	
E_i	-0,14	-0,65	-0,17	-0,03	-0,20	0,07	-0,03	
$(E_i)^2$	0,02	0,42	0,03	0,00	0,04	0,01	0,00	
t_i	-1,28	-5,85	-1,51	-0,26	-1,82	0,64	-0,30	
$t_{crítico}$	1,94	$\Sigma(E_i)^2$	0,52	s	0,27			

Prueba de hipótesis: Ho: El factor ensayado no tiene efecto significativo sobre la friabilidad cuando $-t_{crítico} \leq t_i \leq t_{crítico}$
 Ha: El factor ensayado tiene efecto significativo sobre la friabilidad cuando $-t_{crítico} > t_i > t_{crítico}$

Decisión estadística: Se rechaza la Ho para el factor B ($t_i = -5,85$) debido a que presenta efecto significativo sobre la friabilidad. Por tanto, el diseño experimental recomienda incluirlo en la formulación. Sin embargo, se acepta la Ho para los factores A ($t_i = -1,28$), C ($t_i = -1,51$), D ($t_i = -0,26$), E ($t_i = -1,82$), F ($t_i = 0,64$) y G ($t_i = -0,30$)

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4-27 Resultados de significancia de los factores evaluados en función al porcentaje de disolución

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA Q
1	+	-	-	+	-	+	+	85,04
2	+	+	-	-	+	-	+	70,05
3	+	+	+	-	-	+	-	73,47
4	-	+	+	+	-	-	+	75,01
5	+	-	+	+	+	-	-	79,07
6	-	+	-	+	+	+	-	62,27
7	-	-	+	-	+	+	+	98,10
8	-	-	-	-	-	-	-	83,20
$\Sigma(+)$	307,62	280,80	325,65	301,39	309,49	318,88	328,20	
$\Sigma(-)$	318,59	345,41	300,56	324,82	316,72	307,33	298,01	
E	-10,97	-64,61	25,08	-23,44	-7,23	11,56	30,19	
E_i	-2,74	-16,15	6,27	-5,86	-1,81	2,89	7,55	
$(E_i)^2$	7,52	260,88	39,32	34,33	3,26	8,34	56,95	
t_i	-0,88	-5,17	2,01	-1,87	-0,58	0,92	2,41	
$t_{crítico}$	1,94	$\Sigma(E_i)^2$	410,60	s	7,66			

Prueba de hipótesis: Ho: El factor ensayado no tiene efecto significativo sobre el porcentaje de disolución cuando $-t_{crítico} \leq t_i \leq t_{crítico}$
 Ha: El factor ensayado tiene efecto significativo sobre el porcentaje de disolución cuando $-t_{crítico} > t_i > t_{crítico}$

Decisión estadística: Se rechaza la Ho para los factores B ($t_i = -5,17$), C ($t_i = 2,01$) y G ($t_i = 2,41$) debido a que presentan efecto significativo sobre el porcentaje de disolución. Por tanto, el diseño experimental recomienda no incluir en la formulación al factor B e incluir a los factores C y G. Sin embargo, se acepta la Ho para los factores A ($t_i = -0,88$), D ($t_i = -1,87$), E ($t_i = -0,58$) y F ($t_i = 0,92$)

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4-28 Significancias más relevantes de los factores evaluados en función al ángulo de reposo, friabilidad y porcentaje de disolución

Parámetro	A	B	C	D	E	F	G
Ángulo de reposo	1.54	-5.58 ↑	0.20	1.40	0.60	-1.64	1.85
Friabilidad	-1.28	-5.85 ↑	-1.51	-0.26	-1.82	0.64	-0.30
Porcentaje de disolución	-0.88	-5.17 ↓	2.01 ↑	-1.87	-0.58	0.92	2.41 ↑

Fuente: Elaboración propia.

Los efectos significativos detectados en los factores evaluados del diseño experimental mediante la prueba de hipótesis, ha permitido considerar su inclusión o exclusión en la formulación de comprimidos. Por tanto, este análisis permite plantear tres propuestas de formulaciones para este tipo de comprimidos que se describen en la tabla 4-29.

Tabla 4-29 Propuestas de formulación para el diseño y elaboración de comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii*

Código	Excipientes	Nivel +	Nivel -	Opción 1	Opción 2	Opción 3
A	Almidón de maíz aglutinante	5 %	0 %	-	-	-
B	Povidona aglutinante	5 %	0 %	-	5%	5%
C	Gelatina aglutinante	5 %	0 %	5%	-	5%
D	Sacarosa aglutinante	5 %	0 %	-	-	-
E	Avicel PH 101	5 %	0 %	-	-	-
F	Estearato de Mg ag. antifricción	2 %	1 %	1%	1%	1%
G	Almidón de maíz disgregante	5 %	4 % Croscar.	5%	5%	5%

Fuente: Elaboración propia.

Se procedió a la elaboración de comprimidos con la primera opción de formulación descrita en la tabla 4-30, a diferentes concentraciones de extracto, en función al tamaño de matrices y punzones de la máquina de comprimir que se disponía. Fueron los comprimidos de 203,00 mg y 120,00 mg de extracto de tamaños considerables, alcanzando los primeros un contenido de extracto equivalente al 50,00% de la concentración que se pretendía incorporar por unidad de dosificación. Esto implica la necesidad de aplicar dos unidades de comprimidos de esta concentración para alcanzar la dosis de 406mg de extracto en cada administración de esta forma farmacéutica.

Los resultados de los parámetros de evaluación de los comprimidos obtenidos en sus diferentes fases de fabricación, se muestran en la tabla 4-31.

Tabla 4-30 Propuesta de formulación cualitativa y cuantitativa de comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii*

Componentes	Composición por unidad de dosificación (%)		Composición por unidad de dosificación en función del peso total (mg)	
	Extracto de <i>O. soehrensii</i>	21,49	406,00	203,00
Almidón de maíz (adsorbente)	67,51	1275,43	637,76	377,00
Gelatina (aglutinante)	5,00	94,46	47,20	27,90
Estearato de magnesio (agente antifricción)	1,00	18,89	9,47	5,60
Almidón de maíz (disgregante)	5,00	94,46	47,20	27,90
Peso por comprimido	100,00	1889,25	944,63	558,40

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4-31 Resultados de parámetros evaluados en distintas fases de la fabricación de los comprimidos de *O. soehrensii*

Nº Ensayo	Ángulo de reposo (°)	Friabilidad (%)
1	35,75	0,55
2	29,59	0,66
3	33,69	0,69
Promedio	33,01	0,63

Fuente: Elaboración propia

4.2.13. Métodos analíticos para la evaluación de comprimidos

4.2.13.1. Valoración e identificación de betanina e isobetanina en comprimidos

Los resultados para la valoración de las diluciones preparadas (0,80mg/mL y 0,40mg/mL) nos ha dado rendimientos promedios de 105,81% y 97,12% en referencia al contenido de betanina e isobetanina respectivamente, empleando la curva de calibración. Considerando los resultados obtenidos, se puede aseverar que, a la concentración de 0,80mg/mL, la correlación entre áreas de betanina e isobetanina (53,50%: 46,50%) se asemejan más a los valores teóricos esperados (55,07%: 44,93%), a diferencia de los obtenidos a concentración 0,40mg/mL, tal como se ha visto en el estudio de la correlación entre dichas áreas (véase TABLA 4-32).

El perfil del cromatograma obtenido por HPLC-DAD a $\lambda_{\max}=536$ nm (véase GRÁFICO 4-18), es semejante al cromatograma obtenido en la valoración del extracto. En este cromatograma, de concentración 0,40 mg/mL, se pudo identificar el pico de la betanina con un $t_r=2,30$ minutos, corroborando además el segundo pico que corresponde a

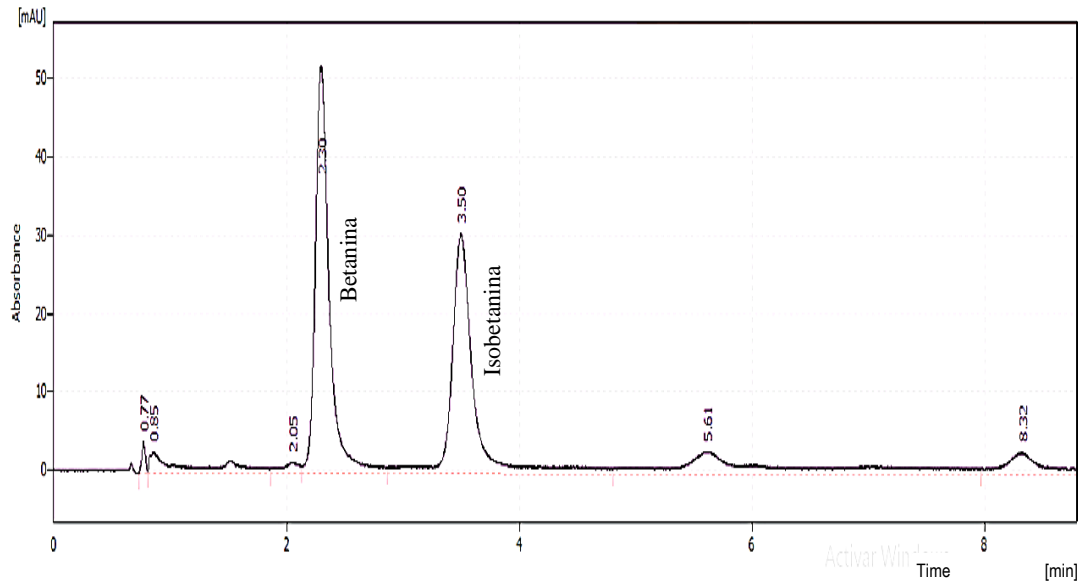
isobetanina, con un $t_r=3,50$ minutos. Ambos picos presentan una absorbancia máxima a 536 nm de longitud de onda (véase GRÁFICO 4-19 y 4-20).

Tabla 4-32 Rendimiento porcentual de betanina e isobetanina en comprimidos fabricados en base a extracto de *O. soehrensii*

C (mg/mL)	Betanina				Isobetanina				Correlación betanina: isobetanina (%)
	Área muestra	t_r (min)	Área Teórica (St)	Rendimiento (%)	Área muestra	t_r (min)	Área Teórica (St)	Rendimiento (%)	
0,80	835,88	2,28	793,70	105,31	726,59	3,49	721,11	100,76	53,50: 46,50
0,40	436,47	2,30	410,61	106,30	410,02	3,50	438,66	93,47	51,56: 48,44
			Promedio	105,81			Promedio	97,12	
			s	0,70			s	5,16	
			CV	0,66			CV	5,31	

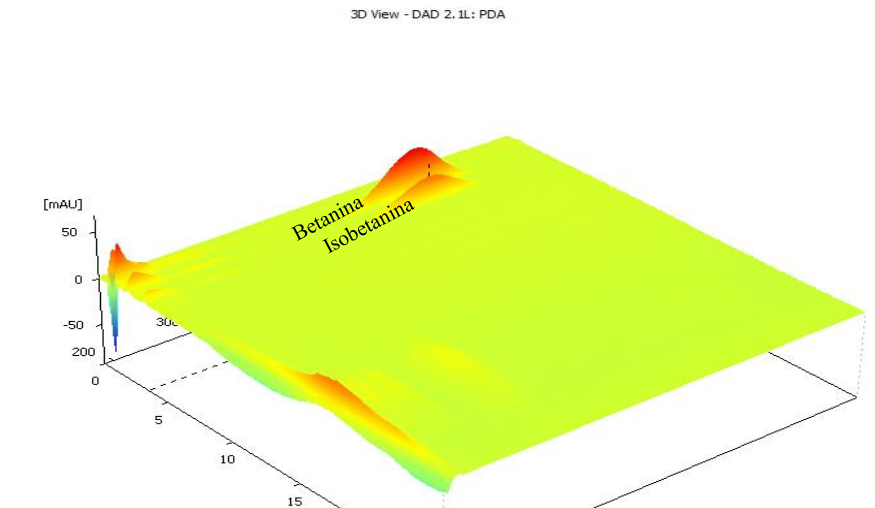
Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-18 Cromatograma del extracto de *O. soehrensii* a 0.40mg/mL, obtenido en la valoración de comprimidos por HPLC-DAD



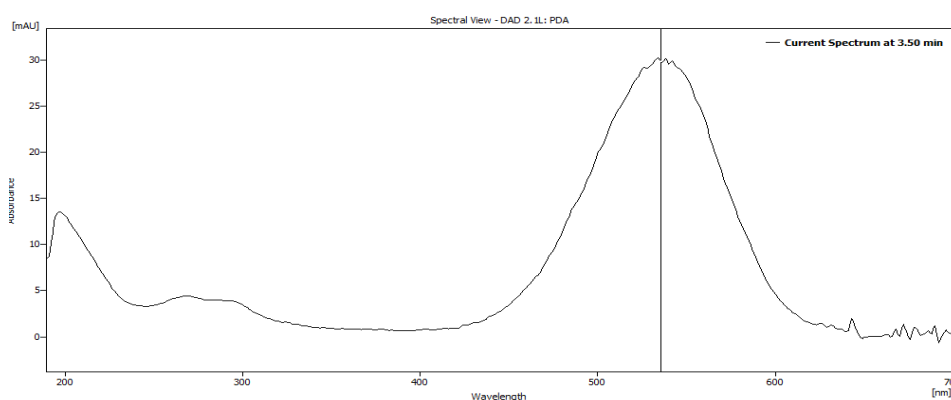
Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-19 Vista tridimensional del cromatograma y espectro UV-visible de betanina e isobetanina, obtenido en la valoración de comprimidos



Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4-20 Espectro UV-visible de isobetanina, obtenido de la valoración de comprimidos por HPLC-DAD



Fuente: Elaboración propia.

❖ Identificación de marcadores fitoquímicos en comprimidos

La identificación de los marcadores fitoquímicos betanina e isobetanina en comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii*, fueron detectados en los cromatogramas de HPLC-DAD obtenidos en la valoración de los mismos en el anterior capítulo, por comparación del perfil resultante de la muestra con el patrón del cromatograma obtenido

para el extracto de *O. soehrensii*. Dichos cromatogramas evidencian la elución de betanina e isobetanina por la absorbancia máxima que estos emiten a 536 nm en ambos casos (véase GRAFICO 4-19 y 4-20).

Otro método alternativo para la identificación del extracto de *O. soehrensii* en comprimidos con mayor certeza, podría ser la aplicación del método analítico de identificación por HPLC-DAD a $\lambda_{\text{max}}=254\text{nm}$ y 480 nm planteado para el análisis del extracto de *O. soehrensii*.

4.2.13.2. Prueba de disolución de comprimidos de *O. soehrensii*

El porcentaje de disolución promedio calculado para los 6 comprimidos ensayados, fue de 94,33% en base a betanina y 93,67% en base a extracto, resultado que cumple con la especificación establecida ($Q \geq 80\%$) para este producto (véase TABLA 4-33).

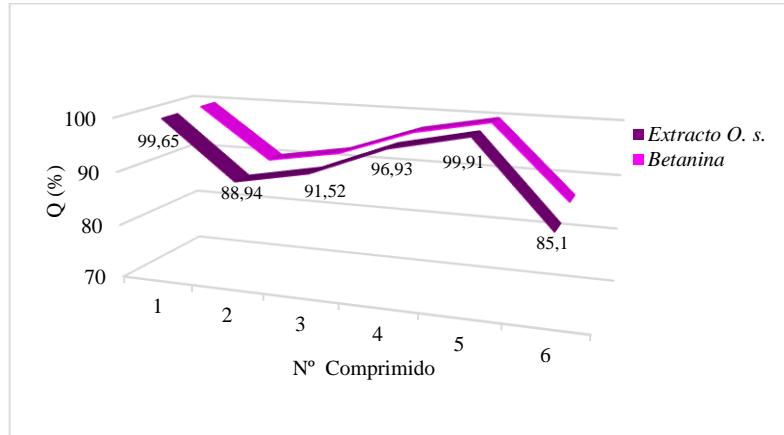
Tabla 4-33 Resultados prueba de disolución de comprimidos de *O. soehrensii*

N° Tableta	Extracto		Betanina	
	Cantidad disuelta (mg)	Q	Cantidad disuelta (mg)	Q
1	203,04	99,65	150,24	99,69
2	181,22	88,94	135,78	90,09
3	186,47	91,52	139,26	92,40
4	197,50	96,93	146,57	97,25
5	203,58	99,91	150,60	99,92
6	173,39	85,10	130,59	86,65
	<i>Q Promedio</i>	93,67		94,33
	s	6,10		5,46
	CV	6,51		5,79

Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 4-21 se muestra los resultados de la prueba de disolución expresados en porcentaje de disolución de extracto de *O. soehrensii* y betanina por cada comprimido analizado.

Gráfico 4-21 Porcentaje de disolución de extracto de *O. soehrensii* y betanina



Fuente: Elaboración propia

Conclusiones y recomendaciones

❖ Conclusiones

La formulación de comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii* fue diseñada siguiendo los principios básicos que exige la fase de preformulación y posterior formulación de formas farmacéuticas.

En la etapa de preformulación, para la identificación del extracto de *O. soehrensii*, se ha propuesto tres alternativas, que permiten diferenciarlo de otras especies botánicas que podrían presentar una composición similar respecto a los contenidos de betalainas y otros compuestos.

La primera alternativa consiste en la obtención de un cromatograma y su espectro de masas por HPLC-DAD ESI/MS del extracto de *O. soehrensii* a $\lambda=254$ nm, dicho cromatograma muestra la presencia de dos picos importantes que responden a los compuestos betanina ($t_r=13,58\text{min}$; $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=551$; $\lambda_{\text{max}}=536\text{nm}$) e isobetanina ($t_r=15,32\text{min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=551$; $\lambda_{\text{max}}=536$ nm), la proporción de estos picos es un aspecto que marca una diferencia relevante frente a los cromatogramas de otras especies de contenidos similares, que se muestran en proporciones totalmente diferentes; por otro lado, el pico que en realidad permite diferenciarlo de otras especies, se trata del compuesto no identificado que eluye a $t_r=6,90\text{min}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=370$; $\lambda_{\text{max}}=267, 220, 192\text{nm}$), constituyéndose en el principal marcador fitoquímico de identificación del extracto de *O. soehrensii* frente a otras especies de composición similar. De forma complementaria en este proceso de identificación, también se puede considerar la presencia de los picos minoritarios, pero significativos, estos son los compuestos no identificados que eluyen a un $t_r=12,02$ min ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=408$; $\lambda_{\text{max}}=308, 253\text{nm}$) y $t_r=12,74$ min ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=369$; $\lambda_{\text{max}}=253$ nm).

Como segunda alternativa, se propone la misma técnica, pero sin acoplar a masas (HPLC-DAD), generando un cromatograma a longitudes de onda de 254 nm y 480 nm bajo las mismas condiciones de trabajo, que permita la identificación de los compuestos

citados anteriormente, basados en el análisis de la presencia de sus picos y respectivos espectros de absorción UV-visible.

La tercera alternativa, presenta un espectro de absorción UV-visible del extracto de *O. soehrensii*, resaltando sus picos de mayor intensidad con longitudes de onda máxima a 536 nm y 272 nm, constituyéndose en las principales características de su espectro que la diferencia de otras especies de composición similar. Otro factor de diferenciación, es la relación porcentual de las intensidades de los picos, siendo de 61,10% (536 nm) y 38,90% (272 nm).

Otra alternativa adicional que contribuye con el análisis de identificación, consiste en realizar un fraccionamiento del extracto de *O. soehrensii* mediante la aplicación de la técnica cromatográfica en columna sólido líquido descrita en el capítulo Fraccionamiento del extracto acuoso (4.2.6.2), en cuya fracción X se debe evidenciar la presencia de filolactina por HPLC-DAD mediante su espectro absorbancia máxima UV-visible ($\lambda_{\max}=536$ nm), además de los compuestos betanina ($\lambda_{\max}=536$ nm) en la fracción VI, e isobetanina ($\lambda_{\max}=536$ nm) en la fracción VII.

De todas las alternativas planteadas para el análisis de identificación, si bien la técnica por HPLC-DAD ESI/MS sería la más apropiada, los costos de los análisis rutinarios serían muy elevados, siendo conveniente optar por la técnica por HPLC-DAD.

Para realizar la valoración del extracto de *O. soehrensii* por HPLC-DAD, se ha designado cuantificar a la betanina como el marcador fitoquímico principal, al ser éste uno de los compuestos mayoritarios que muestra el cromatograma obtenido por HPLC-DAD con un $t_r=2,21$ min ($\lambda_{\max}=536$ nm), respecto a otros compuestos del mismo extracto. También se ha considerado cuantificar la isobetanina como un marcador fitoquímico secundario con un $t_r=3,40$ min ($\lambda_{\max}=536$ nm), como referencia respecto a la relación porcentual de su área frente a la betanina. Para dicha valoración, se ha confeccionado una curva de calibración con la sustancia estándar betanina e isobetanina ($\lambda_{\max} = 536$ nm).

Para la valoración del extracto de *O. soehrensii* por espectrofotometría UV-visible, se ha elaborado una curva de calibración en base al contenido de betanina y extracto de *O. soehrensii* ($\lambda_{\max} = 536$ nm), cuyos rangos lineales para realizar cuantificaciones se

encuentra entre las concentraciones de 0,01 - 0,90mg/mL y 0,04 - 1,97mg/mL respectivamente.

En la etapa de preformulación de comprimidos, la elevada higroscopicidad del extracto de *O. soehrensii* (34,7%), no ha permitido su uso directo como sólido, por tanto, el uso de un adsorbente ha resultado ser muy necesario. De los adsorbentes propuestos, el que presento mayor capacidad de adsorción de extracto, fue el almidón de maíz, respecto al avicel PH-101 y lactosa. La evaluación de la capacidad aglutinante del extracto, con el ensayo de la compactación directa de los polvos adsorbidos, muestra que únicamente la lactosa ha permitido la obtención de comprimidos con buena resistencia mecánica a diferencia de los comprimidos con almidón de maíz y el avicel PH 101, que resultaron frágiles.

Considerando la mayor capacidad de adsorción de los agentes adsorbentes ensayados, sumado a las posibles respuestas fisiológicas a estos excipientes por parte del paciente a quien va dirigido éste producto, se ha optado por el almidón de maíz, siendo además de coste más bajo. Al evidenciar que el extracto de *O. soehrensii* no presenta la suficiente capacidad de aglutinación, se ha visto la necesidad de la adición de un agente aglutinante para la granulación del polvo adsorbido, además de un desintegrante y agente antifricción para lograr la obtención de un comprimido que cumpla las especificaciones que se exigen para esta forma farmacéutica.

Para la selección de los excipientes adecuados, se han realizado una serie de experimentos basados en diseños estadísticos experimentales de tipo diseños factorial fraccionados saturados de R.L. Plackett & J.P. Burman. Los factores evaluados fueron siete, correspondientes a los excipientes que se han propuesto ensayar, en ocho corridas o experimentos ($k+1$, donde k = número de factores), los mismos que fueron analizados, tomando en cuenta los criterios de evaluación de ángulo de reposo, friabilidad y porcentaje de disolución.

La construcción de la matriz con los siete factores y ocho experimentos, ha permitido la estimación de los efectos más importantes, en función a los criterios de evaluación

planteados, a los factores de tipo aglutinantes, como la gelatina en primera instancia y a la polivinilpirrolidona como una segunda alternativa.

Por lo tanto, la formulación final plantea tres opciones, una que incluye gelatina, otra polivinilpirrolidona y una tercera posibilidad que contempla ambos aglutinantes. No obstante, se optó la experimentación con la primera opción de formulación que incluye extracto de *O. soehrensii* el 21,49%, almidón de maíz 67,51% (adsorbente), gelatina 5,00% (aglutinante), almidón de maíz 5,00% (disgregante) y estearato de magnesio 1,00% (agente antifricción). El contenido de extracto que se incluyó por unidad de dosificación fue de 203,00 mg, para comprimidos de tamaño aceptable que cumplen con las especificaciones características para esta forma farmacéutica. De esta manera, fue posible la inclusión del 50,00% de la concentración de extracto que se pretendía por cada unidad de dosificación, de tal modo que su administración debe comprender el uso de dos unidades de comprimidos cada ocho horas.

La concentración de extracto que se pretendía incluir en esta forma farmacéutica implica una masa total por comprimido de aproximadamente 1889,25 mg, cantidad que representa un tamaño de comprimido demasiado grande para un comprimido de ingestión oral. Sin embargo, la posibilidad de formular un comprimido efervescente que incluya la concentración de extracto requerido, sería una opción que ameritaría otro estudio, al igual que las opciones de granulados extemporáneos dispersables o efervescentes.

Para llevar a cabo las pruebas de valoración e identificación de comprimidos en base a extracto de *O. soehrensii*, se han diseñado métodos analíticos debido a la inexistencia de los mismos en farmacopeas oficiales de mayor consulta como la USP 37/ NF 32. Para la valoración de betanina e isobetanina en los comprimidos fabricados, se ha planteado el método analítico por HPLC-DAD, cuyo cromatograma comparado con el perfil cromatográfico del extracto *O. soehrensii* obtenido a $\lambda_{\max} = 536\text{nm}$, presenta los mismos compuestos. Aseverando de esta forma, que el método de fabricación para la obtención de éstos comprimidos, no afecta la composición cuali-cuantitativa del extracto, permaneciendo sus componentes sin alteraciones.

Para la identificación de los compuestos característicos en el extracto de *O. soehrensii* procedente de los comprimidos, se ha propuesto verificar en el perfil cromatográfico obtenido en el análisis de valoración, la presencia de betanina e isobetanina mediante su espectro de absorción UV-visible en donde para ambos casos deberá presentar una $\lambda_{\max}=536\text{nm}$, respetando su proporcionalidad de áreas.

Para realizar la prueba de disolución en comprimidos a base de extracto de *O. soehrensii*, se ha diseñado un método analítico ante la inexistencia de una monografía en las farmacopeas de mayor consulta, según las características de solubilidad (82,38mg/mL) que ha mostrado el extracto de *O. soehrensii*, llegando a establecer las condiciones, aparatos, especificaciones y procedimiento para llevar a cabo esta prueba biofarmacéutica.

❖ Recomendaciones

Se sugiere realizar estudios de estabilidad para la determinación del tiempo de vida útil de los comprimidos elaborados, la posibilidad de incluir un recubrimiento para esta forma farmacéutica y/o un material de acondicionamiento adecuado que permita la protección de la luz, oxígeno y humedad, factores que se consideran muy críticos que pueden afectar la estabilidad del extracto de *O. soehrensii* en los comprimidos fabricados.

Se recomienda realizar los análisis de control de calidad complementarios a los realizados por el presente trabajo.

Continuar con los estudios de purificación y aislamiento en mayor escala de los marcadores fitoquímicos betanina, isobetanina y otros compuestos no identificados, para su uso como sustancia de referencia que permita facilitar los análisis de valoración e identificación del extracto como materia prima y de comprimidos en base a *O. soehrensii*, brindando resultados más confiables.

Se recomienda continuar con el análisis por RMN u otras técnicas que permitan la identificación de los compuestos detectados en el presente trabajo y catalogados como no identificados.

Bibliografía

- Altamirano, R., Drdák, M., Simon, P., Rajniaková, A., Karovicová, J., & Preclík, L. (1993). Thermal degradation of betanine in various water alcohol model systems. *Food Chemistry*, 46(1), 73-75. doi:10.1016/0308-8146(93)90078-t
- Alvarez, A., & Huayta, E. (2000). *Medidas y errores*. (2 ed.). La Paz: Universidad Mayor de San Andrés. 189 p.
- Amaguayo, S. (2013). *Elaboración de tabletas adelgazantes a partir de tres plantas existentes en la provincia de Chimborazo a escala piloto*. Memoria de Bioquímico Farmacéutico. Ecuador. E.S.P.CH, Facultad de Ciencias. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2435/1/56T00320.pdf>
- Amela, J., & Valero, E. (2001). Estudios de Preformulación. En R. Salazar, *Gestión de la Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos* (págs. 95-160). Barcelona: Romargraf S.A. 523 p.
- Andersen, L., & Gonzales, A. (2019). *El VIH está incrementando en Bolivia, pero queda concentrado en pocos municipios SDSN-Bolivia*. Recuperado el 16 de septiembre de 2020, de <https://www.sdsnbolivia.org/el-vih-esta-incrementando-en-bolivia-pero-queda-concentrado-en-pocos-municipios/>
- Andia, V., Hermoza, E., Pereda, A., & Tineo, J. (2017). Elaboración de yogur con *Chenopodium quinoa* “quinua” y colorante de *Opuntia soehrensii* “ayrampo”. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 613-619. Obtenido de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume2/3/5/100.pdf>
- Apaza, A. (2017). *Influencia de parámetros fisicoquímicos en la extracción de pigmentos de Ayrampo (Opuntia Soehrensii B.), sobre el contenido de fenoles totales, betacianinas totales y capacidad antioxidante*. Memoria de Ingeniero Agroindustrial. Perú. Universidad Nacional de Moquegua. Obtenido de https://repositorio.unam.edu.pe/bitstream/handle/UNAM/57/T095_71978393_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Attoe, E., & von Elbe, J. (1982). Degradation Kinetics of Betanine in Solutions As Influenced by Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(4), 708-712. doi:<https://doi.org/10.1021/jf00112a021>
- Attoe, E., & von Elve, J. (1985). Oxygen Involvement in Betanine Degradation: Effect of Antioxidants. *Journal of Food Science*, 50(1), 106-110. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13287.x
- Azeredo, H. (2008). Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365-2376. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x

- Beck, S., Domic, A., García, C., Meneses, R., Yager, K., & Halloy, S. (2010). *El Parque Nacional Sajama y sus Plantas Departamento de Oruro, Bolivia*. Recuperado el 05 de septiembre de 2020, de <https://www.academia.edu/38082936/El_Parque_Nacional_Sajama_y_sus_Plantas>
- Bermejo, A., & Leiro, V. (2008). Herpes genital. Actualización terapéutica. *Dermatología Argentina*, 14(2), 147-150. Obtenido de <https://www.dermatolarg.org.ar/index.php/dermatolarg/article/view/37/23>
- Bilyc, A. (1979). Extractive Fraccionation of Betalaines. *Journal of Food Science*, 44(4), 1249-1251. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb03491.x>
- Bilyk, A., & Howard, M. (1982). Reversibility of Thermal Degradation of Betacyanines under the Influence of Isoascorbic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(5), 906-908. doi:10.1021/jf00113a024
- Biswas, M., Dey, S., & Sen, R. (2013). Betalains from *Amaranthus tricolor* L. *Journal of Pharmacognosy an Phytochemistry*, 1(5), 87-95. Obtenido de <https://www.phytojournal.com/vol1Issue5/Issue_jan_2013/14.1.pdf>
- Bolivia Sol. (2011). *Estudios de la UMSA revelan que la planta evanta cura la leishmaniasis*. Recuperado el 18 de septiembre de 2013, de <<https://boliviasol.wordpress.com/2011/09/18/estudios-de-la-umsa-revelan-que-la-planta-evanta-cura-la-leishmaniasis/>>
- Cabello, I., & Lock, O. (2003). *Betalainas*. En: Muñoz O. (coord). (2003). *Antocianos y betalinas colorantes naturales de aplicación industrial*. Santiago. Recuperado el 18 de septiembre de 2020, de <https://www.google.com/search?q>.
- Cai, Y., & Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, 65(7), 1248-1252. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., & Corke, H. (1998). Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2063-2070. doi:10.1021/jf9709966
- Caldas, J., Morales, P., Ludeña, F., Betalleluz, A., Chirinos, R., Noratto, G., & Campos, D. (2015). Stability of Betacyanin Pigments and Antioxidants in Ayrampo (*Opuntia soehrensii* Britton and Rose) Seed Extracts and as a Yogurt Natural Colorant. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(3), 541-549. doi:10.1111/jfpp.12633
- Calla, J., Gimenez, A., Troye-Blomberg, M., & Fernandez, C. (2009). An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as anti-Leishmania agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells.

Scandinavian Journal Immunology, 69(3), 251-258. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02219.x

Cameli Pons, J., & Cameli Aguilar, J. (2001). Formulación de formas de dosificación sólidas de administración oral: Comprimidos, casos prácticos. En R. Salazar, *Gestión de la Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*. (págs. 164-170). Barcelona: Romargraf S.A. 523 p.

Carpio, Y., & Portugal, J. (2014). *Determinación de parámetros tecnológicos para la obtención de un colorante natural de Ayrampo (Opuntia soehrensii) y su aplicación en la obtención de un alimento a base de harina de yuca (Manihot esculenta crantz)*. Memoria de Ingeniero Químico. Perú. Universidad Nacional de San Agustín. Obtenido de <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3931/IQcarayl052.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Castellanos, E., & Yahia, E. (2008). Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pears Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758-5764. doi:10.1021/jf800362t

CDC. (2014). *Herpes genital: Hoja informativa de los CDC*. Recuperado el 10 de julio de 2019, de <<https://www.cdc.gov/std/spanish/herpes/stdfact-herpes-s.htm>>

Cejudo, M., Chahal, M., Louaileche, H., Parrado, J., & Heredia, F. (2014). Betalain Profile, Phenolic Content, and Color Characterization of Different Parts and Varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8491-8499. doi:10.1021/jf502465g

CNIB. (2020). *Pub Chem Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. Centro Nacional de Información Biotecnológica*. Recuperado el 21 de enero de 2020, de <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>

Du, X., Li, L., Behboodi, F., Welle, A., Li, J., Heissler, S., . . . Levkin, P. (2017). Bio-inspired Strategy for Controlled Dopamine Polymerization in Basic Solutions. *Polymer Chemistry*, 8(14), 2145-2151. doi:10.1039/c7py00051k

Echeverría, J., Paniagua, N., & Bussmann, R. (2020). Airampo ayrampo (Azara) Doweld Cactaceae. *Ethnobotany of the Andes*, 1-3. doi:10.1007/978-3-319-77093-2_13-1

Eklund, P., Backman, J., Kronberg, L., Smeds, A., & Sjonholm, R. (2007). Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(1), 97-107. doi:10.1002/jms.1276

Falcón, J., & Juárez, R. (2016). *Evaluación del contenido de polifenoles y betalainas en una bebida elaborada a partir de Sancayo (Corryocactus brevistylus) y Ayrampo (Opuntia soehrensii)*. Memoria de Ingeniero Industrial Alimentario. Perú. Universidad Nacional de San Agustín Arequipa. Recuperado el 03 de agosto de 2020, de <<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4180>>

- Falconi, M. (2011). *Elaboración y control de calidad de comprimidos fitofarmacéuticos a base de extractos de Manzanilla (Matricaria Chamomilla L.), Ajo (Allium sativum) y Jengibre (Zingiber officinale)*. Memoria de Bioquímico Farmacéutico. Ecuador. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Recuperado el 04 de agosto de 2020, de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1620>
- Fernandez, J., & Almela, L. (2001). Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2), 415-420. doi:10.1016/S0021-9673(00)01224-3
- Fernández, J., Almela, L., Obón, J., & Castellar, R. (2010). Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 253-259. doi:10.1007/s11130-010-0189-x
- Gandia, F., Garcia, F., & Escribano, J. (2005). A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *Journal of Chromatography*, 1078(1-2), 83-89. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.013
- García Barrera, F., Reynoso, C., & Gonzales de Mejía, E. (1998). Stability of betalains extracted from garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Science and Technology International*, 4(2), 115-120. doi:10.1177/108201329800400206
- García, T., Gomez, A., Guajardo, D., Welti, J., & Cano, P. (2018). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: a comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1-13. doi:doi:10.1016/j.jfca.2018.11.002
- Girault, L. (1987a). *Kallawayá curanderos itinerantes de los Andes*. Bolivia: : UNICEF-OPS-OMS-PL-488. 670 p.
- Godenzi, J. (2013). *El Ayrampo, potencial frutícola en vías de extinción en la región Ayacucho*. Recuperado el 05 de abril de 2020, de <http://www.juliopablogodenzivargas.blogspot.com/>
- Guarachi, M. (2005). *Evaluación de la actividad antiviral de Opuntia soehrensii utilizando como modelo la infección in vitro en cultivo de líneas celulares por Virus Respiratorio Sincitial*. Memoria de Bioquímico. Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/>. 138 p.
- Han, D., Joogn, S., Hee, S., & Man, D. (1998). Repeated Regeneration of Degraded Red Beet Juice Pigments in the Presence of Antioxidants. *Journal of Food Science*, 63(1), 69-72. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb15678.x
- Haribabua, K., Ajitha, M., & Venkata, U. (2015). Quantitative estimation of (-)-hinokinin, a trypanosomicidal marker in Piper cubeba, and some of its commercial formulations using HPLC-PDA. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 130-136. doi:10.1016/j.jpha.2014.03.001

- Harris, N., Javellana, J., Davies, K., Lewis, D., Jameson, P., Deroles, S., . . . Schwinn, K. (2012). Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BNC Plant Biology*, 12(1), 1-12. doi:10.1186/1471-2229-12-34
- Havlíková, L., Míková, K., & Kyzlink, V. (1983). Heat Stability of Betacyanins. *Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 177(4), 247-250. doi:doi:10.1007/bf01082487
- Herbach, K., Rohe, M., Stintzing, F., & Carle, R. (2006). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research international*, Vol. 39(Nr. 6). Obtenido de <https://sci-hub.se/10.1016/j.foodres.2006.01.004>
- Herbach, K., Stintzing, F., & Carle, R. (2004). Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Preparations. *Journal of Food Chemistry and Toxicology*, 69(6), C491-C498. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb10994.x
- Herbach, K., Stintzing, F., & Carle, R. (2006). Betalain Stability and Degradation—Structural and Chromatic Aspects. *JFS R: Concise Reviews/Hypotheses in Food Science*, Vol. 71(Nr. 4). Recuperado el 03 de septiembre de 2020, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/>. Germany
- Hilou, A., Nacoulma, O., & Guiguemdé, T. (2006). In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 236-240. doi:10.1016/j.jep.2005.08.006
- Ho Suh, D., Lee, S., Yeon Heo, D., Suk Kim, Y., Kim Cho, S., Lee, S., & Hwan Lee, C. (2014). Metabolite Profiling of Red and White Pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) for Comparing Betalain Biosynthesis and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34), 8764-8771. doi:10.1021/jf5020704
- Huang, A., & von Elbe, J. (1985). Kinetics of the Degradation and Regeneration of Betanine. *Journal of Food Science*, 50(4), 1115-1120. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13024.x
- Huang, A., & von Elbe, J. (1987). Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *Journal of food science*, 52(6), 1689-1693. doi:10.1111/j.1365-2621.1987.tb05907.x
- Huayta, Y. (2016). *Determinación de los parámetros de coloración y su estabilidad del colorante Ayrampo (Tunilla soehrensii Britt & Rose) en la elaboración de yogurt*. Memoria de Ingeniero Industrial. Perú. Universidad Nacional del Altiplano. Recuperado el 01 de agosto de 2020, de <<http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3268>> .105 p.
- IPNI. (2020). *International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens*. Recuperado el 01 de septiembre de 2020, de <https://www.ipni.org/>
- Jackman, R., & Smith, J. (1996). Anthocyanins and betalains. *Natural Food Colorants*, 244-309. doi:doi:10.1007/978-1-4615-2155-6_8

- Jerz, G., Klose, B., Wybraniec, S., Villanueva, S., & Winterhalter, P. (2013). Preparative Separation and Pigment Profiling of Betalains from Fruits of *Opuntia ficus* by Ion-Pair High-Speed Countercurrent Chromatography (IP-HSCCC) and Off-Line LC-ESI-MS/MS. *Tropical and Subtropical Fruits: Flavors, Color, and Health Benefits*, 3-27. doi:10.1021/bk-2013-1129.ch001
- Jimenez, Y. (2014). *Evaluación de la estabilidad del colorante de Airampo (Opuntia soehrensii Britton & Rose)*. Memoria de Ingeniero Industrial. Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú. Recuperado el 06 de septiembre de 2020, de <<http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/2653/Jimenez%20Ygnacio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. 103 p.
- Justo, R. (2018). *Obtención de extracto colorante por maceración a partir de las semillas de Ayrampo (Opuntia soehrensii) procedentes de la provincia de Candarave*. Memoria de Ingeniero en Industrial Alimentarias. Perú. Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna. Recuperado el 20 de agosto de 2020, de <http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/3246/1377_2018_justo_condori_rm_fcag_alimentarias.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 103 p.
- Karim, R. (2011). *Botiquín ancestral de la municipalidad indígena de Tilcara*. Recuperado el 15 de agosto de 2018, de <<https://docplayer.es/32226220-Botiquin-ancestral-de-la-municipalidad-indigena-de-tilcara.html>>
- Kobayashi, N. (2002). *Contributions to Betalain Biochemistry New structures, condensation reactions, and vacuolar transport*. Memoria de Dr. rer. nat. Toronto. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät. Recuperado el 20 de septiembre de 2020, de <<https://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/02/03H029/prom.pdf>>
- Kosińska, A., Urbalewicz, A., & Penkac, K. (2011). SE-HPLC-DAD Analysis of Flaxseed Lignan Macromolecule and its Hydrolysates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(4), 263-271. doi:doi:10.2478/v10222-011-0030-8
- Kugler, F., Graneis, S., & Stintzing, F. (2007). Studies on Betaxanthin Profiles of Vegetables and Fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 62(5-6), 311-318. doi:10.1515/znc-2007-5-601
- Litter, M. (1988). *Compendio de farmacología* (5 ed.). Argentina: El Ateneo. 932 p.
- Lock, O. (1997). *Colorantes naturales*. Perú: Fondo. Recuperado el 16 de septiembre de 2020, de <https://books.google.com.bo/>. Perú: <https://books.google.com.gt/books?id=LjmH_3qjaEIC&printsec=frontcover&source=gs_atb#v=onepage&q&f=false>
- Markham, K., & Mabry, T. (1975). Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. *The Flavonoids*, 45-77. doi:10.1007/978-1-4899-2909-9_2
- Merino, J., & Perez, K. (2019). *Efecto antihipertensivo del extracto hidroalcohólico de la semilla de Tunilla soehrensii Britton & Rose (Airampo) con inducción en ratas albinas*. Memoria

- de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Recuperado el 01 de agosto de 2020, de <http://168.121.45.184/bitstream/handle/20.500.11818/4225/TESIS_MERINO_PEREZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 60 p.
- Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia. (2009). *Agenda nacional de prioridades de investigación en salud*. Recuperado el 03 de octubre de 2018, de <<http://www.sns.gob.bo/Bolivia>>
- Montesdeoca, V. (2010). *Elaboración y Control de Calidad de comprimidos fitofarmacéuticos de Ajenjo (Artemisia absinthium L.), Romero (Rosmarinus officinalis L.) y Manzanilla (Matricaria Chamonilla L.) para combatir la menstruación dolorosa*. Memoria de Bioquímico Farmacéutico. Ecuador. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Recuperado el 04 de agosto de 2020, de <<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/391/1/56T00202.pdf>>. 123 p.
- Mora, C. (2012). *Formulación de Formas Farmacéuticas sólidas*. La Paz, Bolivia: Maestría en Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos FCFB. 26 p.
- Mora, C. (2012). *Preformulación de Formas Farmacéuticas Sólidas*. La Paz, Bolivia: Maestría en Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos FCFC. 26 p.
- Mosquera, N., Cejudo, M., Heredia, F., & Hurtado, N. (2020). Identification of New Betalains in Separated Betacyanin and Betaxanthin Fractions from Ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Plant Foods for Human Nutrition*. doi:10.1007/s11130-020-00837-9
- MSP. (2009). *Tablas peruanas de composición de alimentos*. Recuperado el 07 de septiembre de 2020, de <<https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/1034/tablas-peruanas-QR.pdf?sequence=3&isAllowed=y>>
- Nattes, P., & Quispe, Z. (2018). *Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de Ayrampu (Opuntia soehrensii) para el desarrollo galénico de un gel de limpieza de manos*. Memoria de Químico Industrial. Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Tecnología. Recuperado el 02 de agosto de 2020, de <<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18232/PG-2044.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. 136 p.
- Navarro, M. (2012). *Servicio de recopilación y documentación de medicina tradicional natural, ancestral de Candarave, utilización de plantas curativas y rituales curativos*. Recuperado el 17 de julio de 2018, de <<https://dokumen.site/download/plantas-curativas-de-candarave>>
- Olivero, J. (1982). Formas compactadas de polvos: Comprimidos y Granulados. En J. Helman, *Farmacotécnica Teórica y Práctica. Tomo VI* (pág. 1742). México: Continental S.A. 1970 p.

- OMS. (2004). *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales*. Recuperado el 19 de septiembre de 2018, de <<https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/index1.html>>
- OMS. (2008). *Alocución al Congreso de la OMS sobre Medicina Tradicional Beijing, República Popular China*. Recuperado el 19 de septiembre de 2018, de <<https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/address-at-the-who-congress-on-traditional-medicine>>
- OMS. (2020). *VIH/sida*. Recuperado el 15 de marzo de 2021, de <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>>
- OMS. (2020). *Virus del herpes simple*. Recuperado el 15 de septiembre de 2020, de <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus#vhs2>>
- Palma, S., Caire, G., Campa, M., Chávez, K., Robles, M., Gutierrez, M., . . . Valenzuela, A. (2020). A Comprehensive HPLC-DAD-ESI-MS Validated. *Applied Sciences MDPI*, *10*(22), 1-17. doi:<https://doi.org/10.3390/app10228147>
- Pardo, O. (2002). *Etnobotánica de algunas cactáceas y suculentas del Perú*. Recuperado el 18 de julio de 2018, de <<http://www.chlorischile.cl/pardo/pardoppal.htm>>
- Pareda, A., Andía, V., Hermoza, E., Tineo, J., & Ramirez, D. (2014). Optimización de la concentración de *Lactobacillus acidophilus* en terminos del pH. *Kuntur*(2), 65-72. Recuperado el 02 de agosto de 2020, de <<https://www.udaff.edu.pe/sitio/archivos/files/Investigacion/Kuntur/Segunda%20Edicion/revista%2002%20-%20comprimido.pdf>>
- Pasch, J., & von Elbe, J. (1979). Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *Journal Of Food Science*, *44*(1), 72-75. doi:10.1111/j.1365-2621.1979.tb10007.x
- Pavokovic, D., & Krsnik, M. (2011). Complex Biochemistry and Biotechnological Production of Betalains. *Food Technol. Biotechnol*, *49*(2), 145-155. Recuperado el 01 de agosto de 2013, de <<https://www.ftb.com.hr/archives/55-49-2/1131-complex-biochemistry-and-biotechnological-production-of-betalains>>
- Pérez, B. (1994). *Catálogo de plantas medicinales*. Lima: CIPI.
- Piattelli, M., & Minale, L. (1964). Pigments of Centrospermae-II, distribution of betacyanins. *Phytochemistry*, *3*(5), 547-557. doi:10.1016/s0031-9422(00)82927-1
- Pinillos, J., & Lopera, C. (2009). Elaboración de una formulación farmacéutica a través de un diseño experimental de mezclas. *Vitae*, *16*(3), 338-353. Recuperado el 05 de agosto de 2020, de <<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a08.pdf>>
- PMDB. (2019). *Plant Metabolome Database Departamento de Bioinformática Universidad SASTRA*. Recuperado el 02 de 09 de 2019, de <<http://scbt.sastra.edu/pmdb/>>

- Ponce D`León, L. (2013). *Diseño de estudios de estabilidad*. Maestría en Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos FCFB. 21 p.
- POZ. (2019). *Virus del herpes simple (herpes oral y genital)*. Recuperado el 20 de agosto de 2020, de <<https://www.poz.com/basics/vih-sida-en-espanol/virus-del-herpes-simple>>
- PRODECO y CIMES. (2018). *Medicina Intercultural*. Recuperado el 20 de julio de 2018, de <<http://medicinaintercultural.org/cd/plantas/airampo>>
- Puentes, J., & Hurrell, J. (2015). Plantas andinas y sus productos comercializados con fines medicinales y alimentarios en el Área Metropolitana Buenos Aires-La Plata, Argentina. *Blacpma*, 14(3), 206-236. Recuperado el 01 de septiembre de 2020, de <https://www.researchgate.net/publication/282704118_Plantas_andinas_y_sus_productos_comercializados_con_fines_medicinales_y_alimentarios_en_el_Area_Metropolitana_Buenos_Aires-La_Plata_Argentina>
- Quispe, J. J. (2009). *Investigación industrial*. La Paz, Bolivia: Maestría en Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos FCFB. 101 p.
- Ramirez, A., Covarrubias, J., Flores, C., Martínez, R., Gonzáles, J., Reyes, T., . . . Rivera, L. (2007). Infecciones oportunistas presentes en individuos con VIH/SIDA: Virus del Herpes Simple Tipo 1 y 2, Citomegalovirus y Herpesvirus Tipo 8 asociado a sarcoma de Kaposi. *Respyn*, 8(1). Recuperado el 05 de julio de 2018, de <<https://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2007/spn071f.pdf>>
- Ravikiran, A., Arthanareeswari, M., Kamaraj, P., & Praveen, C. (2016). Hygroscopicity categorization of pharmaceutical solids by gravimetric sorption analysis: a systematic approach. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(4). Recuperado el 27 de enero de 2020, de <https://www.researchgate.net/publication/316216546_Hygroscopicity_categorization_of_pharmaceutical_solids_by_gravimetric_sorption_analysis_A_systematic_approach>
- Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6 ed.). London-USA: RPS.
- S/A. (2002). *Farmacopea (Herbolaria)*. Recuperado el 01 de agosto de 2013, de <<http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/catamarca/alucinogenos/temas%5Ccultura%5Cclinik2.htm>>
- Sánchez, N. (2006). *Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada : Extracción y Caracterización de los Principales pigmentos de la Opuntia joconoste c.v. (Xoconostle)*. Memoria de M. en Tecnología Avanzada. México. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Recuperado el 07 de abril de 2020, de <<https://docplayer.es/84145420-Instituto-politecnico-nacional-area-de-alimentos-extraccion-y-caracterizacion-de-los-principales-pigmentos-del-opuntia-joconoste-c-v.html>>. 107 p.

- Schwartz , S., & von Elbe, J. (1980). Quantitative Determination of Individual Betacyanin Pigments by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(3), 540-543. doi:doi:10.1021/jf60229a032
- Schwartz, S., & von Elve, J. (1983). Identification of Betanin Degradation Products*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 176(6), 448-453. doi:doi:10.1007/bf01042560
- Schwertner, H., & Stankus, J. (19 de abril de 2015). Characterization of the Fluorescent Spectra and Intensities of Various Lignans: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection†. *Journal of Chromatographic Science*, 53(9), 4. doi:doi:10.1093/chromsci/bmv041
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (2 ed.). Colombia: Quebecor-Impreandes. 247 p.
- Shirota, O., Kumakura, M., Sekita, S., & Satake, M. (1997). Lignans from a cactus, *Opuntia soehrensii*. *Natural Medicines*, 51(3). Recuperado el 7 de septiembre de 2020, de <https://dl.ndl.go.jp/view/> Tokyo: https://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_10759127_po_ART0010021128.pdf?contentNo=1&alternativeNo=
- Skopińska, A., Szot, D., Starzak, K., Mizrahi, Y., & Wybraniec, W. (2015). The Effect of Ascorbic Acid Supplementation on Betacyanin Stability in Purple Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Juice. *Challenges of Modern Technology*, 6(4), 14-18. Obtenido de <<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.baztech-bdb67ab0-b1dc-45bf-851a-f9fe9c48f305>>
- Soriano, J., Franco, M., Pelayo, C., Armella, M., Yáñez, M., & Guerrero, I. (2007). Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la "Jiotilla" (*Escontria chiotilla* [Weber] Britton & Rose). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 19-25. Recuperado el 02 de marzo de 2020, de <<https://www.redalyc.org/pdf/620/62060103.pdf>>
- Soto, H. (2014). *Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del Zea Mays L. (maíz morado), Rubus glaucus (mora andina); Opuntia soherensii (ayrampo) y Diseño de un gel de limpieza cutánea*". Memoria de Químico Farmacéutico. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Recuperado el 01 de agosto de 2020 , de <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3888/Soto_hh.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 89 p.
- Stintzing, F., & Carle, R. (2004). Funtional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19-38. doi:10.1016/j.tifs.2003.07.004

- Terceros, P., Quelca, B., & Solares, M. (2007). *Plantas Medicinales en Bolivia Estado de Arte*. Recuperado el 10 de septiembre de 2020, de <<https://dokumen.tips/reader/f/69936-plantas-medicinales-en-bolivia-estado-de-arte-5682085ae2f91>>
- Tesoriere, L. y otros. (2004). *Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 941–945. doi:10.1093/ajcn/80.4.941
- Tipe, O., & Lock, O. (1990). Estudio de la estabilidad del extracto de Ayrampo (*Opuntia soehrensii Brett*) y de la betanina. *Sociedad Química del Perú*, 26-45. Recuperado el 05 de septiembre de 2020, de <<https://www.researchgate.net/publication/275652048>>
- Tropicos. (2020). *Opuntia soehrensii Britton & Rose*. Recuperado el 1 de septiembre de 2020, de <<http://legacy.tropicos.org/Name/5100878?langid=66>>
- USP 37/ NF 32. (2014). *Intervalo o temperatura de fusión* (Vol. I). Estados Unidos de América. 1897 p.
- Valverde, E. (2000). Extracción de materias primas vegetales. En N. Sharapin, *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (2 ed.). Colombia: Quebecor-Impreandes. 247 p.
- Vidaurre, P., Paniagua, N., & Moraes, M. (2006). *Etnobotánica en los Andes de Bolivia*. Recuperado el 02 de septiembre de 2020, de <Etnobotánica en los Andes de Bolivia>
- Vila, J. (2001). *Tecnología Farmacéutica* (Vol. I). Madrid, España: SINTESIS S.A. 622 p.
- Vila, J. (2001). *Tecnología Farmacéutica* (Vol. II). Madrid, España: SÍNTESIS S.A. 591 p.
- von Elbe, J., Young, I., & Amundson, C. (1974). Color stability of betanin. *Journal of Food Science*, 39(2), 334-337. doi:doi:10.1111/j.1365-2621.1974.tb02888.x
- WHO. (2002). *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*. Recuperado el 25 de septiembre de 2020, de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42424/WHO_TRS_902.pdf?sequence=1>
- WHO. (2021). *WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard*. Recuperado el 28 de junio de 2021, de <<https://covid19.who.int/>>
- Wiley, R., & Lee, Y. (1978). Recovery of betalains from red beets by a diffusion-extraction procedure. *Journal of Food Science*, 43(4), 1056-1058. doi:10.1111/j.1365-2621.1978.tb15231.x
- Wybraniec, S. (2005). Formation of Decarboxylated Betacyanins in Heated Purified Betacyanin Fractions from Red Beet Root (*Beta vulgaris L.*) Monitored by LC–MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3483-3487. doi:10.1021/jf048088d

- Wybraniec, S., & Mizrahi, Y. (2005). Generation of Decarboxylated and Dehydrogenated Betacyanins in Thermally Treated Purified Fruit Extract from Purple Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6704-6712. doi:10.1021/jf050700t
- Wyler, H., & Dreiding, A. (1957). Kristallisiertes Betanin. Vorläufige Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta*, 40(21), 191-192. doi:10.1002/hlca.19570400122
- Wyler, H., & Dreiding, A. (1962). Abbauprodukte des Betanidins 4. (vorläufige) Mitteilung über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. *Helvetica Chimica Acta*, 45(2), 638-640. doi:10.1002/hlca.19620450229
- Zambrana, S. (2007). *Caracterización de la actividad biológica de Opuntia soehrensii empleando como modelo la infección in vitro del virus Herpes simplex*. Memoria de Máster Scientiarum Mención: Virología. Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, Institutos de Servicios de Laboratorio e Investigación en Salud. 104 p.
- Zdzisław, J. (2008). *Medycyna Konwencjonalna I Medycyna Tradycyjna w Rejonie Kanionu Colca, Perú*. Recuperado el 01 de septiembre de 2020, de <<https://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.baztech-article-AGH5-0020-0142>>

Anexos

Anexo A-1: Recolección de semillas de *O. soehrensii*



Fuente: propiedad del autor

**Anexo A-2: Certificación de autenticación de la especie botánica *O. soehrensii*
por el Herbario Nacional**



HERBARIO NACIONAL DE BOLIVIA

Casilla 10077 Correo Central. La Paz – Bolivia / Campus Universitario, Calle 27 Cota Cota
Teléfonos (591 -2) 2121751 – 2792582 – 2792416 • Fax (591-2) 2770962
e-mail: lpb@accelerate.com, lpb.dir@accelerate.com

PLANTAS COLECTADAS POR: LOURDES AQUINO TARQUI (La Paz)

Determinadas por: LPB - Dr. Stephan Beck

Fecha: 14 de mayo de 2015

1 Cactaceae

Airampo ayrampo (Azara) Doweld
Syn: *Opuntia soehrensii*



Anexo A-3: Extracción acuosa de semillas de *O. soehrensii*



Fuente: Propiedad del autor

**Anexo A-4: Tabla de registro de ganancia de humedad en el extracto seco de
*O. soehrensii***

Tiempo (Hrs.)	Muestra 1		Muestra 2		HR (%)	Temperatura (°C)	Promedio Incremento (%)
	Peso extracto expuesto a humedad (g)	Incremento (%)	Peso extracto expuesto a humedad (g)	Incremento (%)			
0,0	0,5111	0,00	0,54	0,00	85	19,3	0,00
0,3	0,5168	1,12	0,5436	0,67	85	19,3	0,89
0,5	0,5171	1,17	0,5472	1,33	85	19,3	1,25
0,8	0,5232	2,37	0,5516	2,15	85	19,3	2,26
1,0	0,5263	2,97	0,5548	2,74	85	19,3	2,86
1,5	0,5273	3,17	0,5612	3,93	85	19,3	3,55
2,0	0,5401	5,67	0,5684	5,26	87	19,3	5,47
2,5	0,5497	7,55	0,5724	6,00	88	19,3	6,78
3,1	0,56	9,57	0,5804	7,48	89	19,3	8,52
3,5	0,5612	9,80	0,5852	8,37	89	19,4	9,09
4,0	0,5816	13,79	0,5912	9,48	90	19,4	11,64
4,5	0,5899	15,42	0,5984	10,81	90	19,4	13,12
5,0	0,6099	19,33	0,6032	11,70	90	19,4	15,52
5,8	0,6242	22,13	0,6096	12,89	91	19,4	17,51
19,7	0,6507	27,31	0,7264	34,52	95	18,7	30,92
20,0	0,6536	27,88	0,7256	34,37	94	18,7	31,13
21,0	0,6628	29,68	0,7292	35,04	94	18,8	32,36
22,2	0,6704	31,17	0,734	35,93	94	19,1	33,55
24,0	0,6777	32,60	0,7384	36,74	94	19,2	34,67
Promedio					89,2	19,2	

Fuente: Elaboración propia

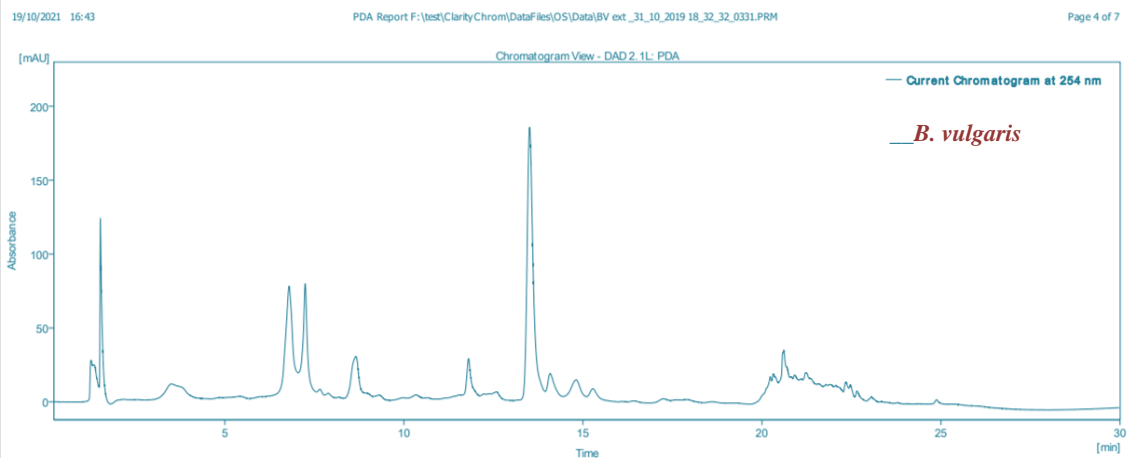
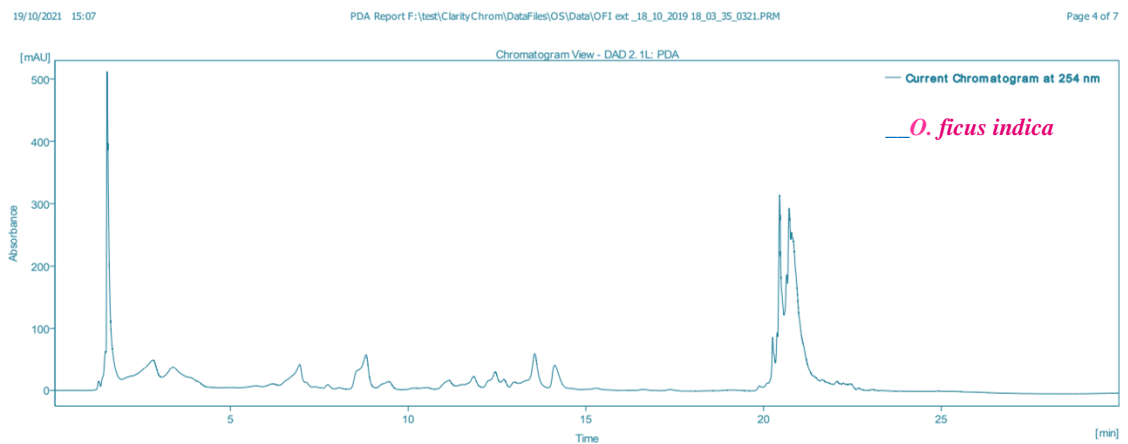
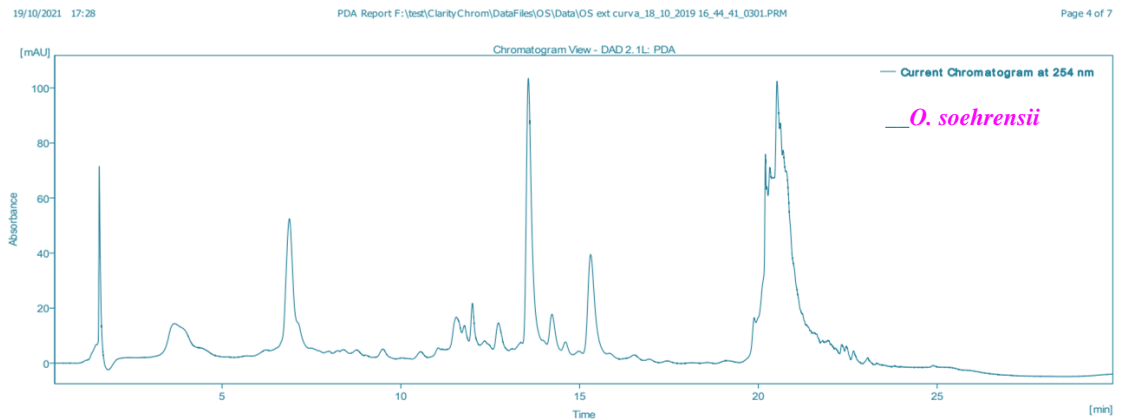
Anexo A-5: Purificación de compuestos del extracto de *O. soehrensii* por cromatografía en columna



Fuente: Propiedad del autor.

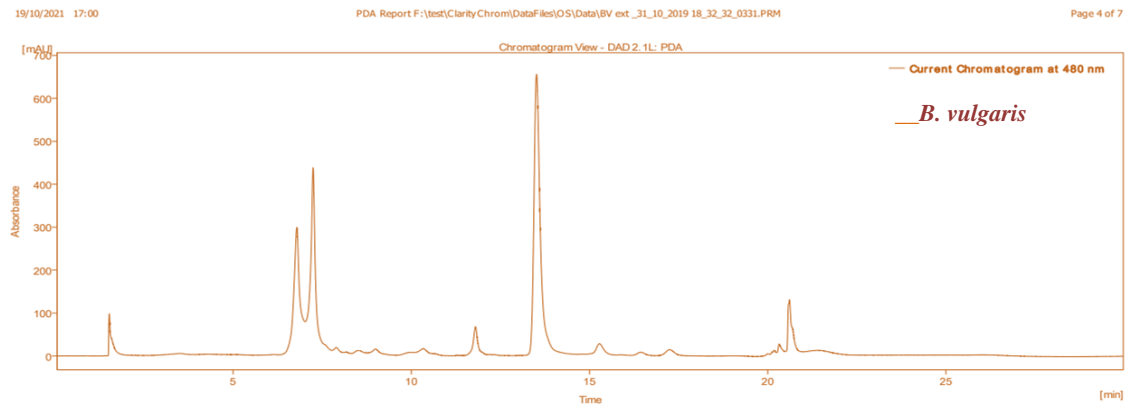
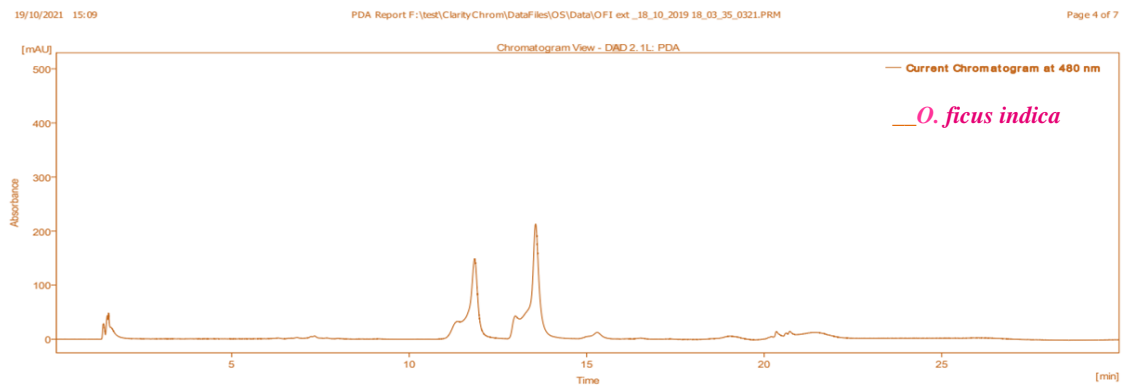
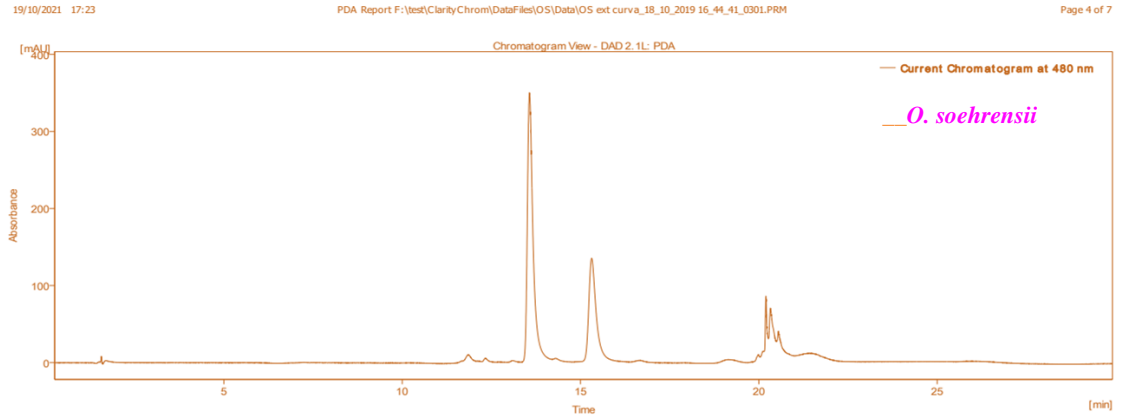
Anexo A-6: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD ESI/MS de *O. soehrensii*, *O. ficus indica* y *B. vulgaris*: a) $\lambda=254\text{nm}$; b) $\lambda=480\text{nm}$ y c) $\lambda=536\text{nm}$

a) $\lambda=254\text{ nm}$



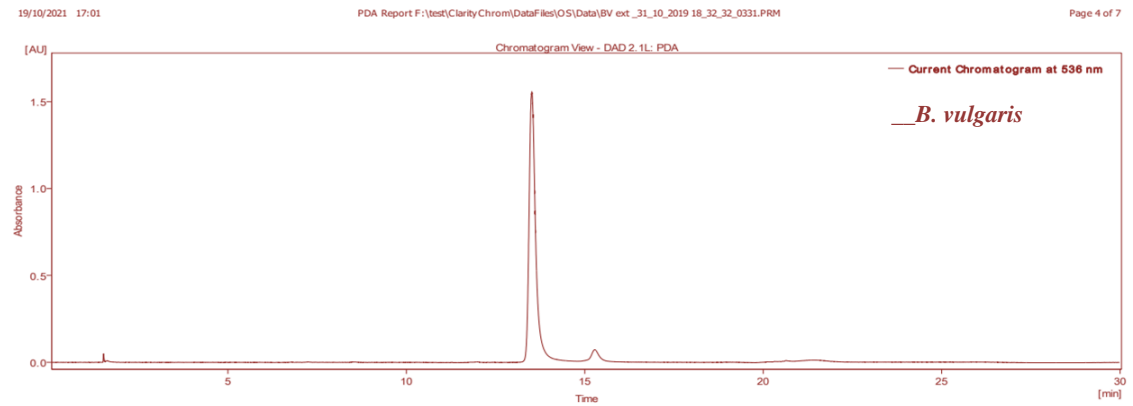
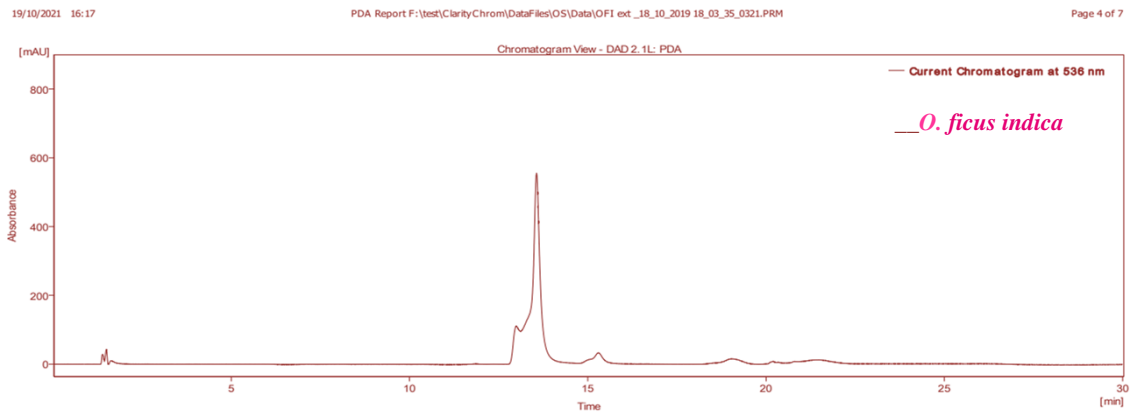
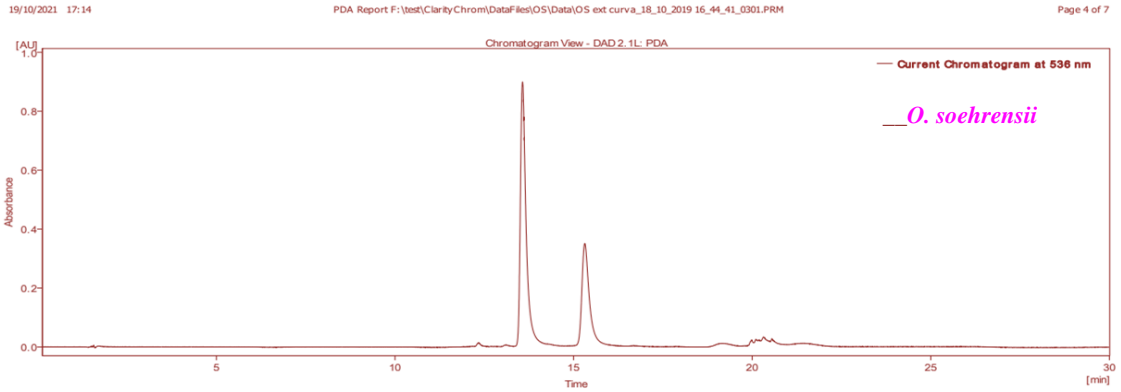
Fuente: Propiedad del autor.

b) $\lambda=480\text{ nm}$



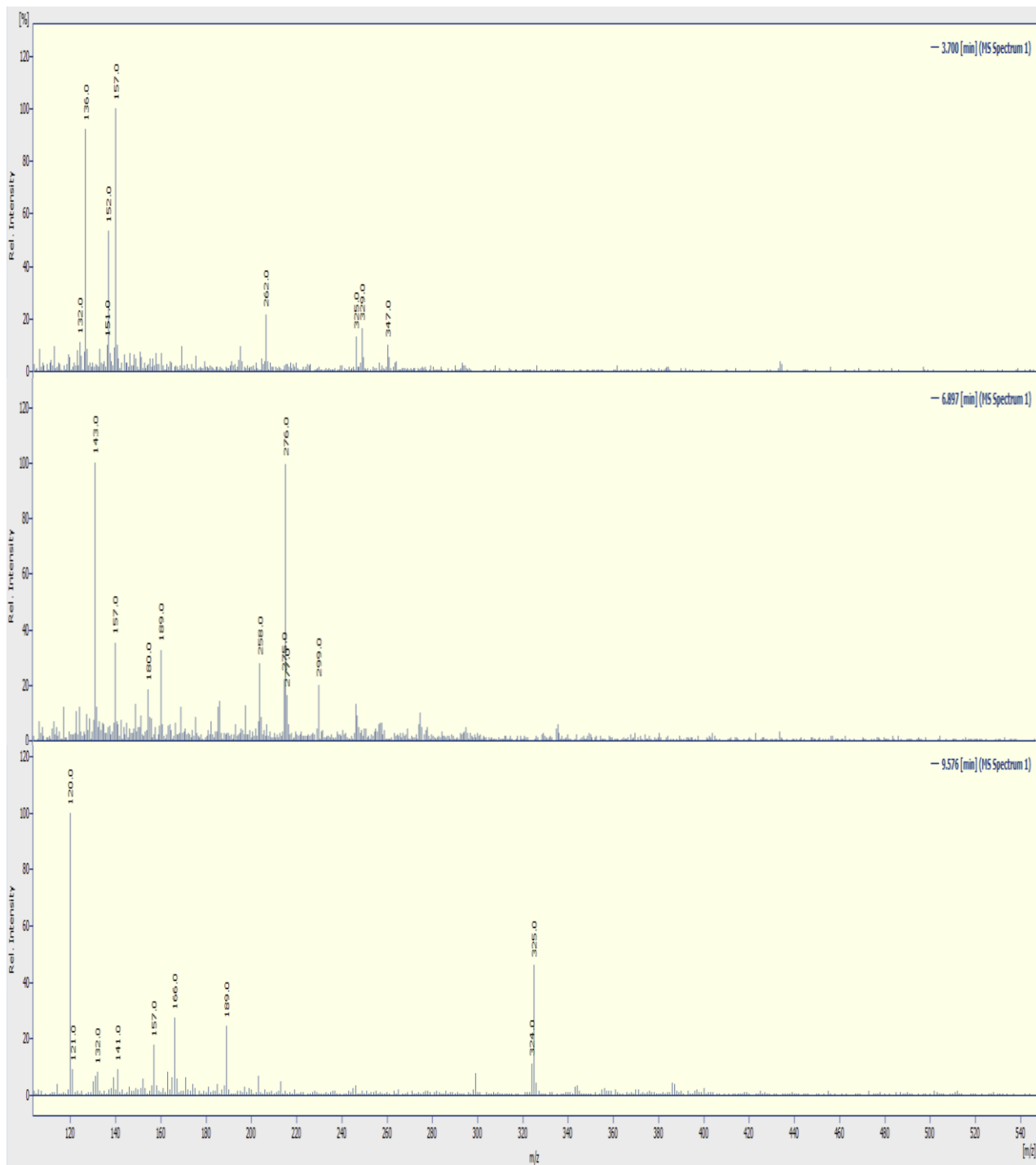
Fuente: Propiedad del autor.

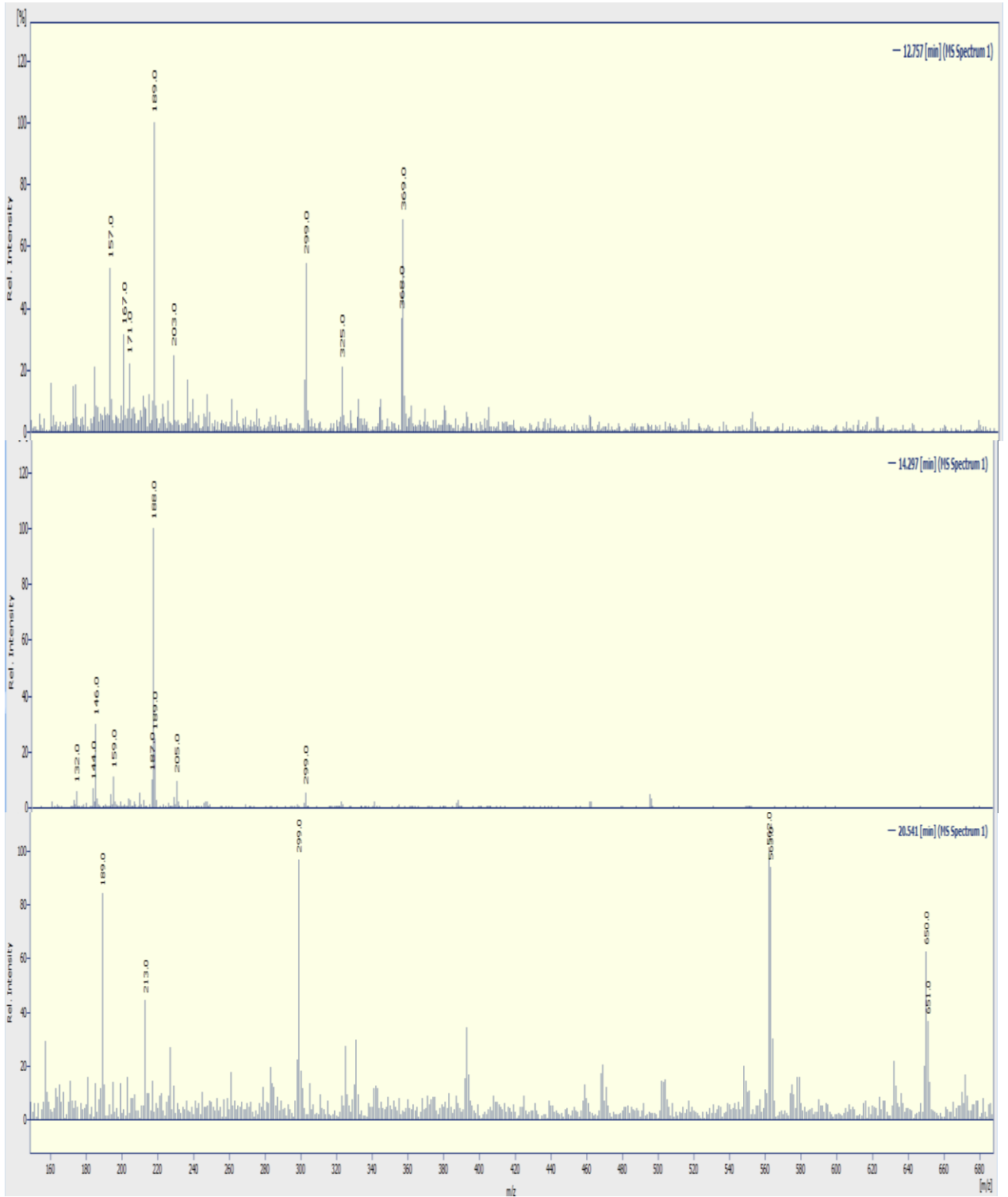
c) $\lambda=536\text{nm}$



Fuente: Propiedad del autor.

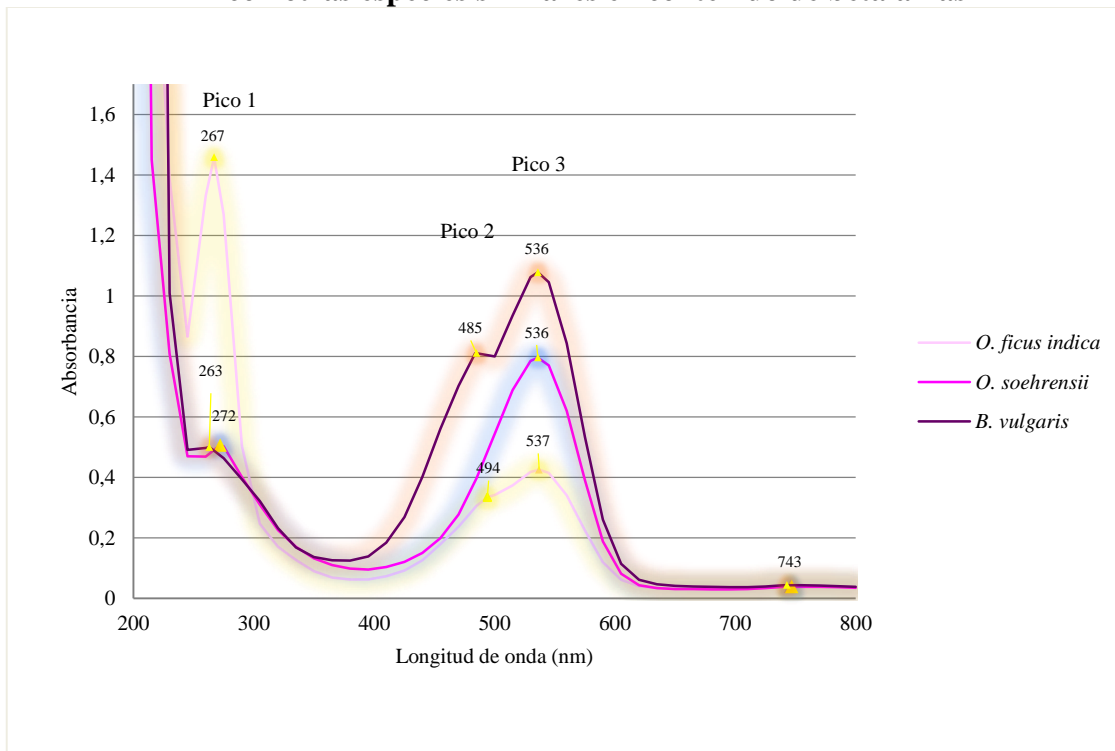
Anexo A-7: Espectro de masas de compuestos característicos del extracto de *O. soehrensii* obtenido por HPLC-DAD ESI/MS





Fuente: Elaboración propia.

Anexo A-8: Gráfico de comparación de espectros UV–visible de *O. soehrensii* con otras especies similares en contenido de betalainas



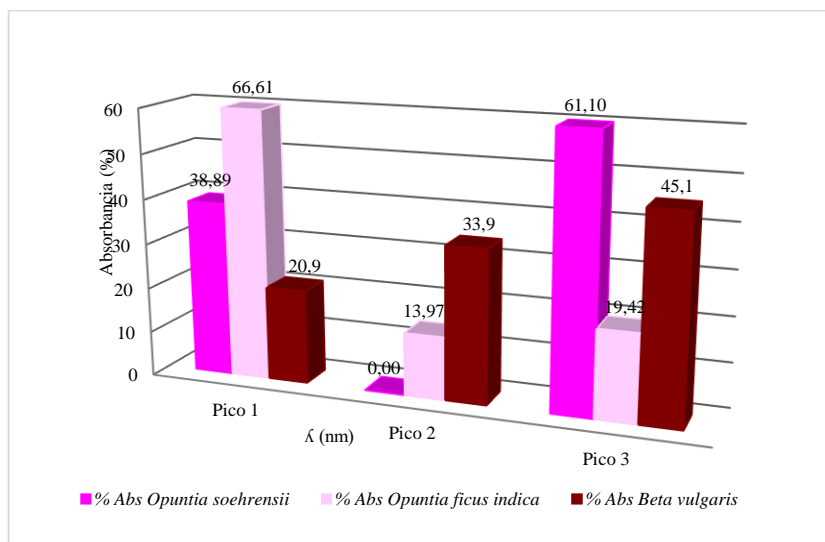
Fuente: Elaboración propia.

Anexo A-9: Tabla de comparación de absorbancias en términos porcentuales de los picos de mayor intensidad de las especies *O. soehrensii*, *O. ficus indica* y *Beta vulgaris*

	Pico 1			Pico 2			Pico 3		
	λ_{max} (nm)	Abs	% Abs	λ_{max} (nm)	Abs	% Abs	λ_{max} (nm)	Abs	% Abs
<i>O. soehrensii</i>	272	0.51	38.90	---	---	---	536	0.80	61.10
<i>O. ficus indica</i>	267	1.46	66.61	485	0.31	13.97	537	0.43	19.42
<i>B. vulgaris</i>	263	0.50	20.94	484	0.81	33.95	536	1.08	45.12

Fuente: Elaboración propia.

Anexo A-10: Gráfico de comparación de absorbancias máximas porcentuales de extractos de *O. soehrensii*, *O. ficus indica* y *B. vulgaris*



Fuente: Elaboración propia.

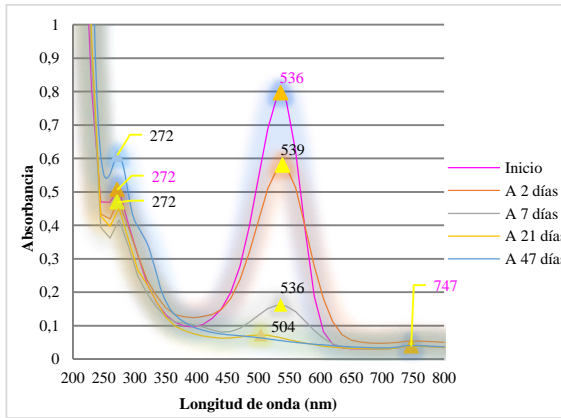
Anexo A-11: Tabla de comparación de la relación porcentual de áreas de betanina e isobetanina de las especies *O. soehrensii*, *O. ficus indica* y *B. vulgaris* obtenidas por HPLC-DAD ESI/MS

Especie botánica	Betanina		Isobetanina		Área total	Relación porcentual de áreas (%)	
	t _r	Área	t _r	Área		Betanina	Isobetanina
<i>O. soehrensii</i>	13,58	1714,78	15,33	979,92	2694,70	63,64	36,36
<i>O. ficus indica</i>	13,56	1172,30	15,31	313,89	1486,19	78,88	21,12
<i>B. vulgaris</i>	13,53	2506,38	15,29	475,05	2981,43	84,07	15,93

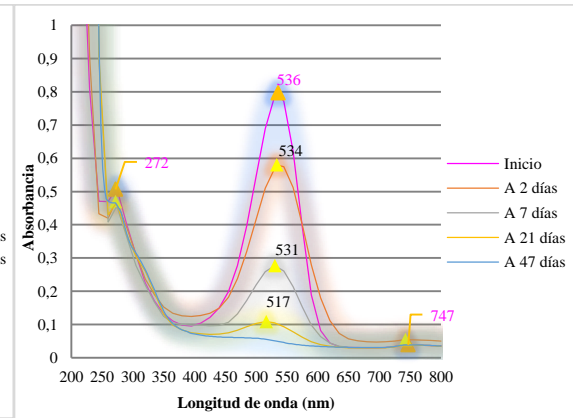
Fuente: Elaboración propia.

Anexo A-12: Gráficos de espectros de absorción UV-visible de extracto de *O. soehrensii* a diferentes pH:

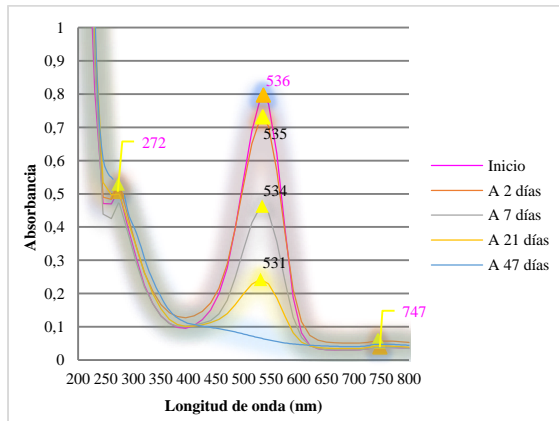
pH 1



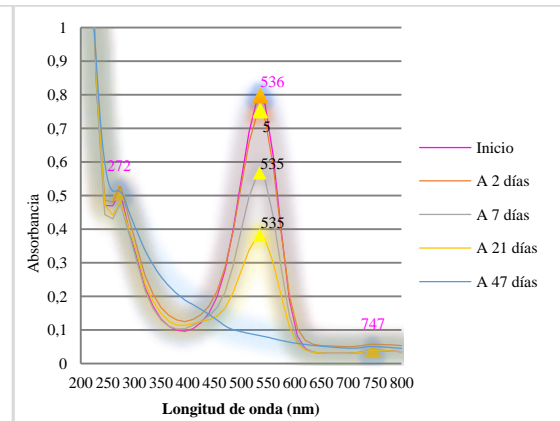
pH 2



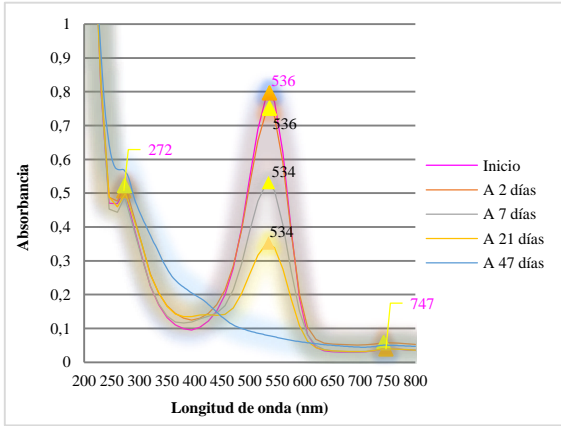
pH 3



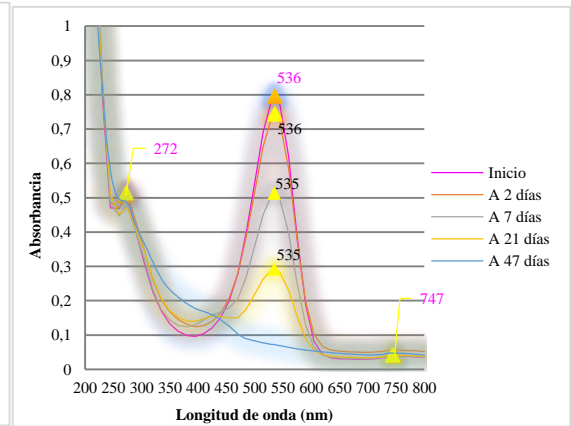
pH 4



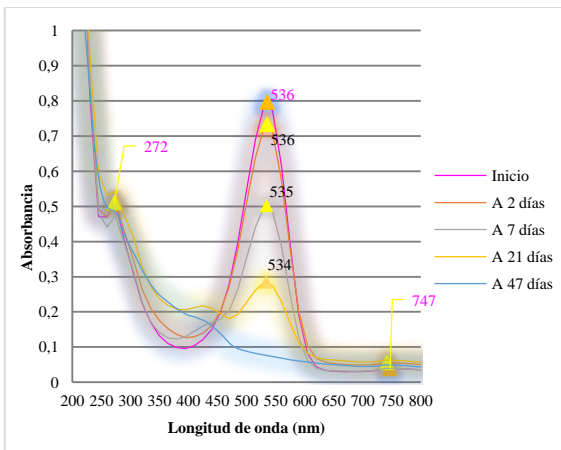
pH 5



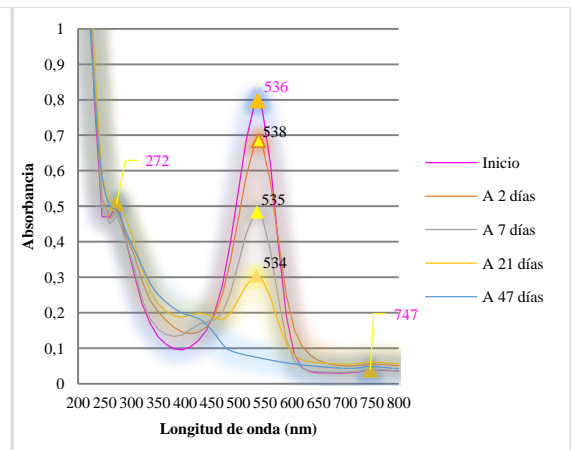
pH 6



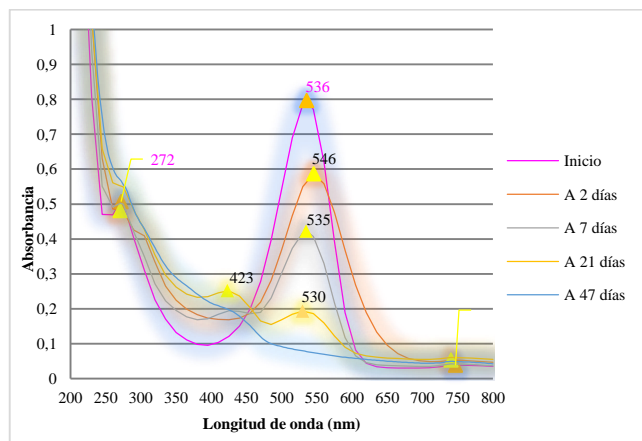
pH 7



pH 8

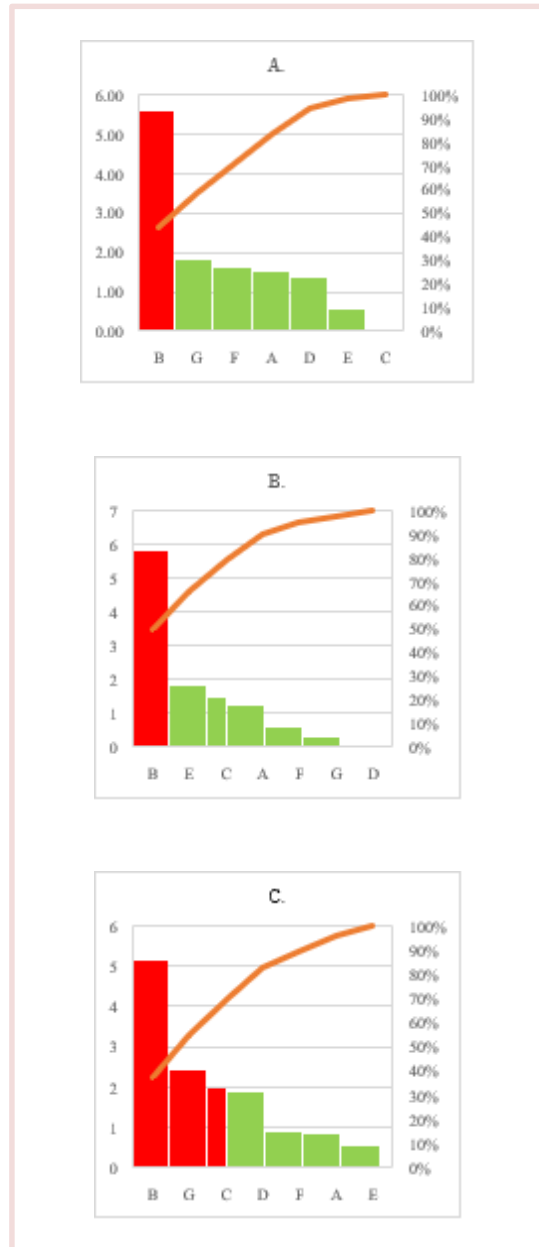


pH 10



Fuente: Elaboración propia.

Anexo A-13: Diagrama de Pareto de las significancias más relevantes de los factores evaluados en función al ángulo de reposo (A), friabilidad (B) y prueba de disolución (C)



Fuente: Elaboración propia.

Anexo A-14: Tabla de resultados de la evaluación citotóxica del extracto acuoso de *O. soehrensii* y sus fracciones

Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas -IIFB

Universidad Mayor de San Andrés - UMSA

Evaluaciones Citotóxica por Método Fluorométrico (Resazurina) sobre Células RAW 264.7 (Macrófagos Murinos)

Fechas de Evaluación : 12-2019

Autor: Efrain Salamanca Capusiri

Supervisor: Alberto Giménez

Muestras : LURDES

Valores de CI 50 en µg/mL : Evaluaciones a 100 - 50- 25- 12,5- 6,2- 3,1 µg/mL

	Producto	RAW 264.7
1	FI/19	86±15
2	FIII/19	83±13
3	FIV/19	99,1±1
4	FIX/19	77,5±20
5	FV/19	88,5±10
6	FVI/19	94±6,5
7	FVII/19	87,4±14
8	FVIII/19	89±8,5
9	FX/19	76,1±2,4
10	FXI/19	87±13
11	FXII/19	84,4±9
12	FXIII/19	83,5±5
13	FXIV/19	85,7±12
14	OsEXTOMaC1	46±13,2
15	OsEXTOMaC2	73,1±5
16	BVExto	100±8,2
17	Betanina	93,2±8,4
	CAT	15,1±3,2
	Miltefosina	8,2±1,3

Anexo A-15: Tabla de evaluación del volumen de disolución para distintas concentraciones de extracto de *O. soehrensii* en comprimidos

Cantidad de extracto (mg) de <i>O. soehrensii</i> por comprimido	Volumen de medio requerido (mL)	Volumen de medio más exceso requerido (mL)	Volumen final de medio (mL)
120	1,46	4,37	500
203	2,46	7,39	500
406	4,93	14,79	500

Fuente: Elaboración propia

Anexo A-16: Datos experimentales obtenidos para la determinación del ángulo de reposo, friabilidad y porcentaje de disolución

A. Tabla: Datos experimentales obtenidos para la determinación del ángulo de reposo

N° exp	Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3			Promedio
	Altura (mm)	Ancho (mm)	Angulo de reposo (°)	Altura (mm)	Ancho (mm)	Angulo de reposo (°)	Altura (mm)	Ancho (mm)	Angulo de reposo (°)	
1	30,10	66,60	42,11	32,10	69,80	42,61	33,40	74,90	41,73	0,44
2	23,00	69,85	33,37	21,80	66,05	33,43	22,10	69,40	32,49	0,52
3	17,95	75,65	25,39	19,10	79,35	25,71	19,85	81,50	25,97	0,29
4	26,05	82,75	32,19	27,45	86,65	32,36	25,95	84,20	31,65	0,37
5	19,55	42,55	42,58	21,50	45,25	43,54	20,25	42,45	43,65	0,59
6	18,00	73,30	26,16	17,30	71,20	25,92	18,30	73,40	26,50	0,29
7	28,15	72,05	38,00	28,40	72,25	38,17	28,10	71,85	38,03	0,09
8	22,05	60,50	36,09	21,00	57,55	36,12	21,65	59,05	36,25	0,09

Para n=3; $t_{(a;2=0,05;v=2)}=4,303$

B. Tabla: Datos experimentales obtenidos para la determinación de la friabilidad

N° exp	Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3			Promedio
	Masa o (g)	Masa r (g)	Friabilidad %	Masa o (g)	Masa r (g)	Friabilidad %	Masa o (g)	Masa r (g)	Friabilidad %	
1	9,2838	9,1821	1,10	9,2661	9,1643	1,10	9,3522	9,2473	1,12	0,014
2	9,3379	9,3187	0,21	9,3524	9,3328	0,21	9,3086	9,2890	0,21	0,003
3	9,7290	9,6946	0,35	9,6259	9,5932	0,34	9,7825	9,7481	0,35	0,008
4	10,3938	10,3571	0,35	10,3562	10,3195	0,35	10,2559	10,2190	0,36	0,004
5	11,0355	10,9585	0,70	11,0929	11,0152	0,70	10,0932	10,0233	0,69	0,004
6	10,4200	10,3756	0,43	10,4594	10,4142	0,43	10,4122	10,3680	0,42	0,004
7	9,9754	9,8851	0,91	10,0932	10,0016	0,91	9,9344	9,8445	0,90	0,001
8	8,5683	8,4625	1,23	8,6947	8,5866	1,24	8,6001	8,4934	1,24	0,004

Para n=3; $t_{(a;2=0,05;v=2)}=4,303$

C. Tabla: Datos experimentales obtenidos para la determinación del porcentaje de disolución

Vaso	N°	Q							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	86,93	70,00	78,27	72,36	81,39	62,64	98,09	85,13	
2	86,90	70,54	73,86	73,51	77,58	62,90	101,00	82,46	
3	85,93	66,78	74,10	78,49	76,91	64,07	95,61	84,11	
4	78,82	71,58	76,43	75,07	82,54	59,46	98,03	83,17	
5	88,34	71,17	69,74	74,04	78,14	63,65	99,79	80,75	
6	83,31	70,23	68,41	76,59	77,84	60,93	96,08	83,59	
Promedio	85,04 ± 3,64	70,05 ± 1,79	73,47 ± 3,98	75,01 ± 2,34	79,07 ± 2,43	62,27 ± 1,84	98,10 ± 2,18	83,20 ± 1,58	
s	3,47	1,71	3,79	2,23	2,31	1,75	2,08	1,50	

Para n=6; $t_{(a;2=0,025;v=5)}=2,571$; lecturas realizadas a 536 nm