

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: "Formulación de un jarabe de *Capraria biflora* L."

Autora: Beatriz Monteagudo Jiménez

Tutores: MSc. Miguel Ángel Alba de Armas

Dra. C. Liliana Vicet Muro

Asesora: Dra. C. Mirtha Mayra González Bedia

Santa Clara, Julio 2019
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Academic Department Pharmacy

DIPLOMA THESIS

Title: "Formulación de un jarabe de *Capraria biflora* L."

Author: Beatriz Monteagudo Jiménez

Thesis Director: MSc. Miguel Ángel Alba de Armas

Dra. C. Liliana Vicet Muro

Asesora: Dra. C. Mirtha Mayra González Bedia

Santa Clara Julio, 2019
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos:+530142281503-1419

Pensamiento

*Porque tú, oh Señor Jehová,
eres mi esperanza, Seguridad mía
desde mi juventud.*

Salmos 71: 5

Dedicatoria

Desde lo más profundo de mi alma deseo dedicarle esta tesis a:

Mí Padre Celestial por haberme dado esta gran victoria y caminar a mi lado durante toda la carrera. Gracias PAPÁ.

Mí esposo Osvaldo Delgado González por estar a mi lado en momentos buenos y malos, por su gran amor y paciencia, y por su apoyo incondicional.

Mis padres Manuel Monteagudo Ulacia y Ana Ibís Jiménez Montes por guiarme y enseñarme en cada momento de mi vida, por sus consejos durante toda mi carrera y por su comprensión. Sin ellos no hubiera podido lograr esta gran victoria. LOS AMO.

Agradecimientos

Deseo brindar mis más sinceros agradecimientos a:

- *Mi Dios todopoderoso por haberme dado la dicha de la vida, por haberme regalado esta carrera y por permitirme llegar hasta el final. Mil gracias.*
- *Mi esposo Osvaldo Delgado González por ser mi tierno y dulce amor, por estar conmigo en cada instante de mi carrera y a mi lado desde primer año, por ser mi complemento, por su paciencia y por su ayuda incondicional a cada instante.*
- *Mis padres Manuel Rafael Monteagudo Ulacia y Ana Ibís Jiménez Montes quienes jugaron un papel súper importante dentro del círculo de mi vida y la llenaron de alegría y cariño, por su gran dedicación, comprensión y ayuda durante toda mi carrera; pues cuando pensaba que no podía ellos me alentaron a seguir adelante para que pudiera hacer este sueño realidad; además por el gran favor que me hicieron al recolectarme toda la planta necesaria. Los Amo.*
- *Mis tutores Miguel Ángel Alba de Armas y Lilibiana Vicet Muro por brindarme sus conocimientos, por su gran paciencia en el desarrollo de este trabajo, por su dedicación y por brindarme toda la ayuda posible para que esta investigación sea todo un éxito.*
- *Mi asesora Mirtha Mayra González Bedía, por su gran entrega y dedicación hacia mi trabajo, por sus consejos, por su ayuda incondicional y por su asistencia cada vez que la necesité.*
- *Enoel, Xiomara, Anita y Venancio, por estar siempre dispuestos a ayudarme en los laboratorios, por su gran comprensión y paciencia.*
- *Norman Montenegro por ayudarme tanto en el procesamiento de los datos estadísticos.*
- *Yisel por brindarme sus conocimientos y estar dispuesta a ayudarme en todo tiempo.*

Agradecimientos

- *Roberto González por ayudarme en la recolección del material vegetal, Laura Machado Hernández y Rosa María González por apoyarme en el lavado de las hojas de la planta.*
- *Mis profesores que durante toda la carrera estuvieron conmigo, por su apoyo, comprensión y gran paciencia.*
- *Mis compañeros de aula que durante estos cinco años estuvieron conmigo, por sus consejos y por el ánimo que todos me dieron en algún momento de la carrera, en especial a Laura Machado Hernández, quien batalló conmigo momentos duros y difíciles y a pesar de ello siempre estuvo ahí para mí.*
- *Al Grupo Cristiano Universitario por brindarme su apoyo en oración cada vez que me encontraba en pruebas y por sus consejos.*
- *Mis hermanos Arletys Monteagudo y Manuel Monteagudo por su preocupación durante toda mi carrera.*
- *Mis suegros Osvaldo Delgado Leal y Rosa María González por sus consejos, preocupación y ayuda brindada durante todo este tiempo.*
- *Todas aquellas personas que de una forma u otra hicieron posible esta culminación de mis estudios tan exitosa.*

¡A todos muchas gracias!

RESUMEN

En el presente trabajo se abordan los resultados obtenidos de los estudios físico-químicos realizados a extractos acuosos obtenidos de las hojas de *Capraria biflora* L. con vistas a la formulación de un jarabe con posible acción gastroprotectora. Las pruebas realizadas para la caracterización físico-química son la determinación de sólidos totales, índice de refracción, densidad, pH, análisis capilar, determinación de las características organolépticas y el tamizaje fitoquímico. Los resultados obtenidos en estas pruebas son adecuados y similares a los de otros extractos vegetales acuosos reportados en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. En el tamizaje fitoquímico se detectó la presencia de fenoles y/o taninos, flavonoides, aminoácidos libres, alcaloides, saponinas y azúcares reductores. Se realizó además la determinación del contenido fenólico y de flavonoides para un extracto, donde se evidenció valores de 12.7 mg EAG/gES y 6.84 µgQE/mg respectivamente. Se realizó un diseño de experimento 2³ para la formulación y elaboración del jarabe, el extracto acuoso se utilizó a dos concentraciones (10 % y 20 %), al igual que la sacarosa (65 % y 85 %) y en la técnica de elaboración se trabajó a dos temperaturas (ambiente y 50°C), siendo las variables respuestas estudiadas el índice de refracción, densidad relativa y pH. Como principales resultados se obtuvo que la variable pH tuvo una disminución significativa cuando se trabajó a altas concentraciones de sacarosa y/o altas temperaturas, el índice de refracción disminuyó significativamente cuando se trabajó a altas temperaturas y la densidad experimentó una disminución significativa cuando la concentración de sacarosa es baja. Se realizó un estudio de estabilidad física de las formulaciones elaboradas, donde se apreció que cuando la concentración de sacarosa se encuentra en un nivel bajo (65 %) los valores de pH son significativamente menores que a tiempo cero, atribuible a una posible contaminación microbiana, lo cual permite decir que estas formulaciones no son estables desde el punto de vista físico a los 30 días de elaboradas.

ABSTRACT

In the present work, the results obtained from the physico-chemical studies carried out on 10 aqueous extracts obtained from the leaves of *Capraria biflora* L. are studied with a view to the formulation of a syrup with possible gastroprotective action. The tests carried out for the physical-chemical characterization are the determination of total solids, refractive index (IR), density, pH, capillary analysis, determination of organoleptic characteristics and phytochemical screening. The results obtained in these tests are adequate and similar to those of other aqueous plant extracts reported in the National Form of Phytopharmaceuticals and Apifarmacos. In phytochemical screening, the presence of phenols and / or tannins, flavonoids, free amino acids, alkaloids, saponins and reducing sugars are detected. The determination of the phenolic and flavonoid content for an extract was also carried out, evidencing values of 12.7 mg EAG / gES and 6.84 µgQE / mg respectively. An experiment design 23 is made for the formulation and elaboration of the syrup, for it the aqueous extract is used at 10% and 20% and the sucrose at 65% and 85%, in the elaboration technique we worked at two temperatures (ambient and 500C), with the variables studied being IR, density and pH. As main results it was obtained that the variable pH has a significant decrease when working at high concentrations of sucrose and / or high temperatures, the refractive index decreases significantly when working at high temperatures and the density undergoes a significant decrease when the concentration of Sucrose is low. A study of the physical stability of the elaborated formulations was carried out, being able to appreciate that when the sucrose concentration is at a low level (65%) the pH values are significantly lower than at zero time, attributable to a possible microbial contamination. which allows us to say that these formulations are not stable from the physical point of view at 30 days of elaboration.

Índice

ÍNDICE

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Consideraciones generales acerca de las plantas medicinales	4
2.2. Familia Scrophulariaceae	4
2.2.1. Generalidades.....	4
2.2.2 Antecedentes químicos de la familia <i>Scrophulariaceae</i>	5
2.3 Género <i>Capraria biflora</i> L.	5
2.3.1 Origen y distribución geográfica	5
2.3.2 Descripción botánica y taxonómica	5
2.3.3 Principales usos atribuidos a la <i>Capraria biflora</i> L.....	6
2.3.4 Antecedentes de estudios químicos y biológicos de <i>Capraria biflora</i> L.....	6
2.3.5 Antecedentes de estudios fitoquímicos de <i>Capraria biflora</i> L.	8
2.4 Consideraciones generales sobre métodos de extracción	8
2.4.1 Métodos de extracción	8
2.5 Compuestos fenólicos	9
2.5.1 Flavonoides.....	9
2.5.2 Identificación	10
2.6 Estandarización de extractos.....	10
2.6.1 Antecedentes de la estandarización de extractos.....	11
2.6.2 Límites de especificaciones	12
2.7 Formas farmacéuticas con productos naturales.....	13
2.7.1 Jarabes farmacéuticos	13
2.8 Calidad mediante diseño	16
2.8.1 Diseños de experimento.....	17
2.9 Estudios de estabilidad física.....	17

Índice

3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Equipos, reactivos y materiales empleados	19
3.2. Preparación del material vegetal	21
3.2.1. Recolección del material vegetal.....	21
3.2.2. Secado y molinado del material vegetal	21
3.3. Obtención de los extractos acuosos	22
3.3.1. Caracterización físico-química de los extractos para su futura estandarización .	22
3.4 Evaluación fitoquímica de los extractos	25
3.4.1 Tamizaje fitoquímico	25
3.5 Procedimiento de los límites de especificaciones de calidad por el método de Bowker	28
3.6 Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales	29
3.6.1 Determinación del contenido de fenoles totales	29
3.6.2 Determinación del contenido de flavonoides totales.....	30
3.7 Obtención de los extractos para la elaboración de los jarabes	31
3.8 Valoración de los jarabes del extracto acuoso de <i>Capraria biflora</i> L.....	31
3.9 Diseño de experimentos para el desarrollo del jarabe.	33
3.9.1 Control de la calidad tecnológica.....	33
3.10 Estudio de estabilidad de los jarabes.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1. Preparación del material vegetal	36
4.1.1. Procesamiento del material vegetal.....	36
4.2 Obtención de los extractos	37
4.2.1 Caracterización físico-química de los extractos	37
4.3 Tamizaje fitoquímico.....	40
4.4 Determinación preliminar de los límites de especificación por el método de Bowker .	44
4.5 Determinación del contenido total de fenoles y flavonoides	45
4.5.1 Determinación del contenido de fenoles totales.....	45
4.5.2 Contenido de flavonoides totales.....	46

Índice

4.6 Jarabes del extracto acuoso de <i>Capraria biflora</i> L. y sus componentes.....	48
4.7 Valoración de los jarabes del extracto acuoso de <i>Capraria biflora</i> L.....	50
4.8 Evaluación de los jarabes de <i>Capraria biflora</i> L. obtenidas mediante diseño factorial 2 ³	51
4.8.1. Calidad tecnológica de los jarabes	51
4.9 Estudio de estabilidad física de los jarabes	58
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUCCIÓN

Para curar determinadas patologías que afectan la salud, en muchas ocasiones se ha tenido que recurrir a ciertos procedimientos terapéuticos que se apartan de la medicina convencional. La medicina natural cobra cada vez más defensores y ejecutores, debido fundamentalmente a las formas nativas de curación y a la carencia de efectos secundarios de estas terapias. Por lo tanto, surgen iniciativas científicas de establecer un tratamiento fitoterapéutico que involucre: la selección, dosificación, vía de administración y recomendaciones para el paciente acerca de la alternativa natural (1-3).

Las investigaciones que han usado productos naturales han hecho posible una significativa contribución en el desarrollo de nuevos fármacos. Teniendo en consideración su diversidad química incomparable y mecanismos nuevos de acción, los productos naturales han jugado un papel esencial en el surgimiento de nuevas drogas, y una cierta cantidad de esos productos se han convertido en fármacos importantes en los sistemas de salud en muchas partes del mundo (4-6). Se estima que cerca de 10 mil especies vegetales con fines medicinales, son empleadas con este fin, la mayor parte en la medicina tradicional (7, 8).

En la actualidad, hay un sensible aumento de la demanda de fármacos con extractos vegetales estandarizados y existe un enfoque particular en la búsqueda de nuevos principios activos provenientes de las plantas (9). Este significativo aumento en la utilización de los vegetales, que constituyen una importante alternativa terapéutica, obedece no solo a los cambios culturales de muchos pueblos, sino también fundamentalmente al elevado costo de los fármacos sintéticos. Los extractos o los fitocomplejos están constituidos por varias moléculas bioactivas, algunas potencialmente tóxicas, donde la concentración podría ser crucial, de ahí que los estudios toxicológicos preclínicos son imprescindibles para respaldar y asegurar científicamente su efectividad e inocuidad (10, 11).

La estandarización de productos de origen natural se define como el proceso de prescribir un conjunto de estándares o características inherentes, parámetros constantes, valores cualitativos y cuantitativos definitivos que llevan a un aseguramiento de la calidad, la eficacia, la seguridad y la reproducibilidad. Es el proceso de desarrollar y acordar estándares técnicos que se resuelven por la

Introducción

experimentación y observaciones. Por lo tanto la estandarización es una herramienta clave en el proceso de control de calidad (12, 13).

La especie *Capraria biflora* L. (*Schrophulariaceae*) es una planta que se ha estudiado poco a nivel mundial; sin embargo, en la Universidad Central Martha Abreu de Las Villas hace algunos años que se les ha llevado a cabo investigaciones en base a sus propiedades farmacológicas y estudios toxicológicos (14-16). El extracto acuoso de las hojas de esta especie ha sido recomendado en afecciones que involucran episodios dolorosos o mediados por inflamación, lo cual fue comprobado en un extracto acuoso obtenido de sus hojas a diferentes dosificaciones (200, 400 y 800 mg/Kg) tanto en modelos de inflamación aguda (edema plantar por carragenina, migración leucocitaria) como crónica mediante la inducción de granulomas por discos de algodón (16, 17). Dosis similares fueron evaluadas en modelos de úlcera gástrica por etanol e indometacina, lo cual demostró su efecto gastroprotector; así como en modelos de analgesia, que se mostró su actividad a las dosis ensayadas (15, 17).

A pesar de que se han llevado a cabo varias investigaciones con el extracto acuoso de las hojas de la especie *Capraria biflora* L., nunca se ha formulado una forma farmacéutica líquida teniendo en cuenta las propiedades farmacológicas ya comprobadas en investigaciones anteriores, con el fin de que en un futuro pueda incorporarse al laboratorio de producción local de medicina natural y tradicional; de aquí se deriva el **problema científico** siguiente: A pesar de que se ha demostrado el potencial farmacológico del extracto acuoso de las hojas de la especie *Capraria biflora* L., especialmente como gastroprotector, así como su seguridad tanto en aplicaciones agudas como crónicas, no se dispone de ninguna formulación líquida que permita su administración oral.

Se plantea la siguiente **Hipótesis**: Es posible obtener un jarabe del extracto acuoso de las hojas de la especie *Capraria biflora* L. con calidad tecnológica y estabilidad física satisfactorias, que permita su empleo futuro como gastroprotector.

Con la realización del presente estudio se proponen los siguientes objetivos:

Introducción

1.1 Objetivo general

- Formular el extracto acuoso de las hojas de la especie *Capraria biflora* L. en forma de jarabe, con calidad tecnológica y estabilidad física satisfactorias.

1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar parámetros físico-químicos del extracto acuoso de las hojas de la especie en estudio para su futura estandarización.
2. Proponer los posibles componentes y aspectos del proceso tecnológico que puedan conducir a un jarabe tecnológicamente adecuado y físicamente estable.
3. Evaluar la influencia de variables de formulación y de metodologías de preparación en la calidad tecnológica y estabilidad física de los jarabes.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Consideraciones generales acerca de las plantas medicinales

Las “plantas medicinales” son un conjunto de especies que poseen principios químicos conocidos como metabolitos activos, que proporcionan diferentes utilidades a la nutrición y que se aplican al campo de la medicina. Hoy se sabe que sus propiedades son responsabilidad de algunos grupos de sustancias de diversa composición química conocidas como metabolitos secundarios. Su marcada acción fisiológica sobre el organismo humano y animal les confiere su valor medicinal, siendo indiscutibles las ventajas de estas sustancias obtenidas del metabolismo de las plantas para la más natural asimilación por el hombre (18, 19).

Las diversas formas en que se utilizan, es en la preparación de decocciones e infusiones en zonas rurales y países pobres, pasando por los productos fitoterapéuticos, hasta la obtención de principios activos en países desarrollados para la elaboración de medicamentos (20, 21).

En los países en desarrollo las plantas medicinales son utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, por lo que representan un área en franca expansión (7).

2.2. Familia Scrophulariaceae

2.2.1. Generalidades

La especie objeto de estudio en este trabajo pertenece a la familia *Scrophulariaceae*, orden *Scrophulariales* (22).

Es una familia de aproximadamente 270 géneros y unas 5100 especies. Entre los géneros más conocidos de la familia están *Verbascum* con 360 especies, *Eremophila* con 215, *Scrophularia* con 200, *Selago* con 190, *Buddleja* con 125, *Jamesbrittenia* con 85, *Manulea* con 75, *Diascia* con 70, *Nemesia* con 65, *Zaluzianskyia* con 55, *Sutera* con 50 especies, *Iceolaria* con una cantidad entre 300 y 400, *Linaria* con 150 y *Digitalis* con un aproximado entre 20 y 30 especies; siendo este último el más utilizado para la producción de drogas (22, 23).

2.2.2 Antecedentes químicos de la familia *Scrophulariaceae*

Los compuestos que más se informan son saponinas, flavonoides, esteroides, triterpenoides, y heterósidos cianogénicos encontrados en la especie *Linaria* y los heterósidos de aucubina, naftoquinonas y antraquinonas, auronas e iridoides. Los alcaloides no son muy comunes pero se encuentran en algunas especies, en particular los del tipo terpenoide, quinazolina y quinazolidina (24, 25).

2.3 Género *Capraria biflora* L.

El género de *Capraria* comprende cinco especies: *Capraria peruviana*, *Capraria lanceolata*, *Capraria semiserrata*, *Capraria mexicana* y *Capraria biflora* L. de la cual estaremos haciendo referencia (26). Es conocida con variados nombres en diferentes partes del mundo: esclaviosa, escabiosa, magüiro, majuito, viuda (Cuba) (27), té del país en Puerto Rico, escobo en Colombia, en México es conocida como claudiosa; coat-weed en EUA, fregosa y piñón en Venezuela; en Martinica se conoce como the d'Amérique; the du pays en Guadalupe y chá-de-Calcada en Brasil (26).

2.3.1 Origen y distribución geográfica

Esta planta es un pequeño arbusto común en terrenos calcáreos y cercanías de las costas. Puede encontrarse en casi toda la isla de Cuba. También puede localizarse desde Bahamas y el Sur de la Florida, pasando por la Indias Occidentales, hasta Suramérica; y desde el Norte de América Central hasta el noroeste de México (28). Es una especie silvestre, común que se mantiene en floración y fructificación durante todo el año, automultiplicándose continuamente ya que las semillas que caen provocan el surgimiento de nuevas plantas que sustituyen a las viejas (26).

2.3.2 Descripción botánica y taxonómica

Capraria biflora L. es un subarbusto o hierba perenne, erecta, con tallos de 0,40 a 2 m de altura. Posee un tallo ramificado desde la base y más arriba, ramas alternas, los tallos hirsutos (pelos largos, erectos y más o menos tiesos), ocasionalmente glabros (sin pelos) pero siempre con pelos escasos en las ramas jóvenes, de 3 a 5 mm de diámetro en la sección media (22, 26, 29). Pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, orden

Revisión Bibliográfica

Scrophulariales, familia *Scrophulariaceae*, género *Capraria* y especie *Capraria biflora* L. (2).

Esta planta presenta hojas alternas espatuladas (con forma de espátula) a lanceoladas (con forma de lanza), de 1,4 a 12 cm de largo por 0,3 a 3,2 cm de ancho, el margen serrado (dientes agudos dirigidos hacia el ápice) a lo largo de la parte media superior, con 3 nervios principales emergiendo cerca de la base, sumergidos en el haz, resaltados en el envés y la base cuneada (márgenes rectos o cóncavos que forman un ángulo de 45 a 90°) (26).

2.3.3 Principales usos atribuidos a la *Capraria biflora* L.

La especie *Capraria biflora* L. es la única de su género a la que se le confieren usos medicinales. Se ha utilizado para tratar la fiebre y sus propiedades diuréticas, estimulantes y digestivas (en asociación con otras plantas), han sido también señaladas como beneficiosas para la digestión, evidenciado en su uso como antidiarreico (30); y se reconoce como astringente en las heridas. El extracto acuoso ha demostrado efectos analgésicos periféricos y centrales; y para el tratamiento de afecciones del tracto urinario, ováricas y/o uterinas en forma de baños o de loción. Además, se usa como sudorífica, febrífuga y en el tratamiento de la influenza. Las hojas y tallos son usados además para aliviar algunos desordenes dérmicos, como escabiosis y escozor (31). También se refiere su uso en el tratamiento de dolor de oído, hemorroides, reumatismo y procesos inflamatorios. Es usada como té de hierbas (32) y algunos autores le atribuyen una acción análoga al té de China; y en Yucatán se usa para sangrado de la nariz, reflujo blanco y granos de la piel (33).

2.3.4 Antecedentes de estudios químicos y biológicos de *Capraria biflora* L.

Se desarrollaron investigaciones con el principio activo denominado biflorina aislada a partir de las raíces de la planta que permitieron verificar su actividad citotóxica y el potencial antioxidante tanto in vitro como in vivo; se demostró además que esta es capaz de incrementar la respuesta lograda por el 5-fluorouracilo (5-FU) inoculado en modelos de tumores, lo cual demostró su actividad como agente inmunoadyuvante (34).

En estudios realizados se comprobó, a través de técnicas experimentales el efecto analgésico (test de contorsiones y plato caliente) del extracto acuoso obtenido a

Revisión Bibliográfica

partir de las hojas de *Capraria biflora* L. a dosis de 200 mg/Kg de peso al comparar con los fármacos de referencia utilizados; se evaluaron los efectos antiinflamatorio agudo (edema plantar por carragenina, peritonitis inducida por carragenina y evaluación de la migración leucocitaria en embriones de *Danio rerio*), lo cual demostró que el extracto posee una potente actividad antiinflamatoria a dosis de 200 mg/kg de peso por vía intraperitoneal y 400 mg/kg de peso por vía oral (16).

Valido (2011), evaluó la actividad antiinflamatoria crónica y gastroprotectora del extracto acuoso de las hojas de esta planta. El efecto antiinflamatorio se comprobó mediante el modelo experimental de granulomas inducidos por discos de algodón, concluyendo que posee actividad a todas las dosis estudiadas 200, 400 y 800 mg/kg. Para comprobar la actividad gastroprotectora se emplearon las técnicas de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto y por indometacina. Con el primer modelo se obtuvo actividad gastroprotectora a todas las dosis estudiadas, con porcentajes de inhibición similares a la atropina, mientras que, en el segundo, las dosis de 400 y 800 mg/kg resultaron las más activas, con porcentajes de inhibición comparables a la ranitidina (17).

Se determinó el efecto gastroprotector de una fracción butanólica a partir del extracto acuoso de esta especie. Esta fracción mostró actividad en los modelos agudos estudiados con grado de ulceración y porcentajes de inhibición al omeprazol. Similares resultados fueron obtenidos en el modelo de úlcera subaguda por indometacina, donde la dosis de 200 mg/kg mostró resultados comparables a la ranitidina. La administración de la fracción butanólica aumentó los valores de la enzima superóxido dismutasa (15).

Se realizó un estudio de toxicidad límite a dosis única con objetivo de evaluar el posible grado de toxicidad del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. El ensayo se realizó según las regulaciones de la Organización para la Cooperación Económica y para el Desarrollo (OECD), a través del test de dosis límite a un nivel de dosis de 2000 mg/kg por vía oral. En el ensayo no se observaron afectaciones ni en el peso vivo de los animales, ni en el análisis macroscópico de los órganos, lo que muestra que no existieron evidencias de ningún signo de toxicidad ni mortalidad en los grupos tratados (16).

En 2013 se evaluó la toxicidad por dosis repetida (28 días) del extracto acuoso de las hojas de esta planta en ratas de la línea Sprague-Dawley para lo cual se administró por vía oral en las dosis de 400, 800 y 1600 mg/kg de peso vivo. El ensayo concluyó que el extracto no evidenciaba efectos tóxicos en los animales (14).

2.3.5 Antecedentes de estudios fitoquímicos de *Capraria biflora* L.

En el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L. se ha comprobado la presencia de compuestos reductores, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y aminoácidos. Mediante las técnicas cromatográficas y espectroscópicas empleadas fueron identificadas por primera vez la presencia de naringenina, manitol, derivados metoxilados de apigenina y luteolina, el ácido 7-O- β apigeninglucurónido y feoforbide. La cromatografía gaseosa de la fracción clorofórmica permitió la identificación, de los ácidos palmíticos, laúrico y hendecanoico (16). Otros investigadores reportaron la presencia de compuestos tipo taninos, en abundancia en los extractos acuosos de la planta, aunque no son informadas las características estructurales de los mismos (35).

2.4 Consideraciones generales sobre métodos de extracción

2.4.1 Métodos de extracción

El proceso de extracción se define como la separación de porciones medicinales activas a partir de los tejidos de plantas y animales, mediante el empleo de disolventes selectivos, utilizando procedimientos establecidos. Existen diversas técnicas de extracción consideradas “clásicas u oficiales”, siendo las más utilizadas en el campo de los productos naturales la maceración, la extracción por soxhlet, la percolación y la hidrodestilación (36). También están las consideradas “modernas” como es el caso del ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercrítico y la extracción acelerada por disolvente (conocida también como extracción por fluido automatizado o extracción por líquido presurizado) (37). Estas nuevas técnicas de extracción a pesar de ser más rápidas, utilizar menos cantidad de disolvente y en algunos casos ser automatizadas, por lo general tienen como inconveniente el elevado costo de los equipos empleados.

2.5 Compuestos fenólicos

2.5.1 Flavonoides

Los estudios con flavonoides aparecen muy bien representados en la literatura especializada, fundamentalmente, dirigidos a la identificación, evaluación y validación de técnicas que pueden ser utilizadas para el control de la calidad de drogas que los contienen. Las técnicas cromatográficas son las más referidas pues permiten separar las sustancias o aislarlas de un medio más o menos complejo, lo cual las hace muy ventajosas tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo. La gran variedad estructural de estos metabolitos explica el amplio espectro que describe la literatura en cuanto a condiciones cromatográficas establecidas (38).

Los flavonoides pueden extraerse satisfactoriamente con disolventes en frío o en caliente, tanto de muestras frescas como secas. Los disolventes de elección para la extracción son generalmente combinaciones de agua con metanol, etanol o acetona en relación (1:5 y 1:1 v/v), siendo baja la proporción de agua requerida para la extracción cuando se trata de material fresco (39). Las agliconas de los flavonoles y flavonas son raramente encontrados como constituyentes internos de los vegetales, ellos son frecuentemente localizados sobre las superficies externas de hojas (40). Desde el punto de vista de aislamiento y purificación a la Cromatografía en Columna y la Cromatografía en Capa Delgada le corresponde el mayor porcentaje de publicaciones, seguida de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), siendo las condiciones propias de la cromatografía en fase reversa las más representadas, empleando usualmente como disolventes las mezclas de metanol/ ácido acético/ agua, metanol/ agua/ácido fórmico, acetona/ ácido acético/ agua en gradientes o en modo isocrático (41).

Para el aislamiento de los flavonoides es usada con mucha frecuencia la cromatografía en columna, utilizando celulosa microcristalina o gel de sílice (tamaño de partícula 0,06-0,03) y como fases móviles metanol: ter-butanol: ácido acético: agua, n-butanol: ácido acético: agua; se recomienda también como sistema de elución las mezcla cloroformo y acetato de etilo, benceno y metanol, entre otras como diclorometano/ metanol/ agua; acetato de etilo: metanol, en dependencia de la polaridad que muestren los componentes a separar (42, 43).

2.5.2 Identificación

Como características generales se observan: la solubilidad en disolventes polares, su carácter fenólico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. Existen muchas técnicas para identificar a los flavonoides, entre ellas se encuentran las reacciones de coloración y precipitación, espectrofotometría ultravioleta, espectrofotometría infrarroja, espectrometría de masas, difracción de rayos X, y resonancia magnética nuclear, entre otros. Una de las reacciones de coloración más referida es la reacción de Shinoda, de la que resultan coloraciones características según el tipo de núcleo de los flavonoides (36) y la reacción con tricloruro de aluminio y 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4 D) por formación de complejos estables con colores más o menos específicos para diferentes tipos de flavonoides (44) que presentan una marcada absorción en la región ultravioleta visible que permiten su identificación (36, 45).

2.6 Estandarización de extractos

La estandarización se puede definir como el establecimiento de calidad farmacéutica reproducible mediante la comparación de un producto con sustancias de referencia establecidas y mediante la definición de cantidades mínimas de uno o varios compuestos o grupos de compuestos. Un extracto estandarizado (o extracto Tipo A) es un extracto para el que los componentes activos son conocidos. De este modo se puede establecer una estandarización de los constituyentes activos. El contenido de compuestos activos se enumera en la etiqueta con la intención de informar a los consumidores que el producto contiene la cantidad mencionada de los componentes activos. Existen otros tipos de extractos: Extracto cuantificado (Tipo B) es un extracto estandarizado en función de aquellos constituyentes que contribuyen a su actividad. Otro tipo de extractos (Tipo C) son extractos estandarizados en función de componentes de desconocida relevancia farmacológica, los cuales sirven como marcadores de calidad (46).

Un extracto estandarizado también es considerado como un extracto de planta vegetal o de animal que tiene uno o más componentes presentes en una cantidad específica garantizada por el hombre a través de varios procesos, llevando al extracto a niveles antinaturales de compuestos químicos, que generalmente se

expresa en por ciento. La intención detrás de la estandarización de plantas es obtener extractos de calidad y garantizar que el consumidor obtenga un producto en el que la química sea consistente de un lote a otro (47).

2.6.1 Antecedentes de la estandarización de extractos

Muchos productos provenientes de la botánica tienen efectos farmacológicos conocidos, sin embargo, emplear toda una planta, o partes de ella, para crear un producto, no puede proveer de la cantidad exacta de principios activos requerida para producir un efecto farmacológico benéfico. Es por eso que los científicos han intentado identificar los componentes de una planta que tienen una actividad farmacológica definida. La estandarización de fármacos convencionales normalmente indica un rango garantizado de concentración del ingrediente activo conocido, para el cual se ha establecido una clara relación dosis-efecto (48).

Según la Asociación Norteamericana de Productores de Fitofármacos (AHPA) ha expandido la definición del término, y ahora estandarizado se refiere al cuerpo de información y controles necesarios para producir materiales de razonable coherencia. Esto se logra a través de la minimización de las variaciones inherentes a la composición de los productos naturales a través de prácticas de aseguramiento de la calidad, aplicados a los procesos de producción de extractos (49, 50).

Los extractos estandarizados surgieron de la necesidad de crear un producto uniforme para ser empleado en ensayos clínicos. En términos generales, hay dos tipos. Una se basa en la identificación y cuantificación de un extracto a un compuesto marcador químico característico y el segundo, identifica y concentra uno o más como componentes activos, lo que lo acerca al nivel de un aislado químico. Esto significa que otros constituyentes naturales se desplazan a expensas de uno o varios compuestos (51).

En Europa, son ampliamente reconocidas cuatro categorías de constituyentes relevantes para la estandarización Busse, Werner (28 de agosto de 2016) (51):

- a. Componentes con actividad clínica conocida (principios activos)
- b. Componentes con actividad farmacológica conocida o que de otra forma contribuyen a la eficacia (marcadores activos)

- c. Componentes relevantes para el control de calidad (marcadores analíticos inactivos)
- d. Componentes con potencial impacto negativo (marcadores negativos, por ejemplo, alérgenos, toxinas).

2.6.2 Límites de especificaciones

Se conoce como especificación de calidad a los requisitos que deben reunir las materias primas, productos, materiales y servicios. Las especificaciones sirven de base para la evaluación de la calidad de los mismos (52).

Las especificaciones de calidad se clasifican en bilaterales (simétrica o asimétrica) con sus límites de especificación superior e inferior; y unilaterales (de máximo o de mínimo) teniendo el de máximo solamente un límite superior de especificación y el de mínimo un límite inferior de especificación; aunque hay especificaciones donde los límites no son establecidos estadísticamente (52, 53).

Existen parámetros asociados a la especificación de calidad como son el valor nominal, el valor real, los límites superior e inferior, y para evaluar la precisión de los resultados se utiliza la desviación real que expresa la diferencia entre el valor nominal y el valor real, la desviación límite que expresa la desviación permisible respecto al valor nominal, y la tolerancia que es la máxima variación permitida con respecto al valor nominal (52, 53).

Características de las especificaciones de calidad (51-53):

- Las especificaciones de calidad se establecen durante la fase de desarrollo del producto.
- La especificación debe ser consistente con el objetivo primario del producto y garantizar la consistencia de la fabricación sin entorpecerla por ser necesariamente estricta.
- Los límites no pueden ser más estrechos que la variabilidad natural y ser lo bastante amplios como para asegurar la capacidad del proceso.
- Las especificaciones son dinámicas y están sometidas a constante revisión en dependencia de modificaciones que sufren las farmacopeas vigentes en base a los avances científicos y desarrollos tecnológicos.

Revisión Bibliográfica

- Corresponde al fabricante desarrollar un proceso productivo y aplicar métodos de control de calidad que aseguren un alto grado de confianza en la calidad del producto.

2.7 Formas farmacéuticas con productos naturales

La mayoría de los medicamentos preparados con extractos vegetales, se presentan en forma líquida. En el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba, aproximadamente el 98 % de las formas farmacéuticas descritas son líquidas, y fundamentalmente jarabes y tinturas (54).

Desde el punto de vista biofarmacéutico, las formas farmacéuticas líquidas son más biodisponibles que las formas farmacéuticas sólidas, pero su estabilidad es mucho menor, los volúmenes a consumir son generalmente grandes y los costos de fabricación y transportación son bajos. Por estas razones en los últimos años se ha observado un crecimiento en las investigaciones relacionadas con el desarrollo de formas farmacéuticas líquidas, a partir de extractos de origen natural, teniendo un papel destacado en este sentido las relacionadas con el desarrollo de jarabes (55).

2.7.1 Jarabes farmacéuticos

2.7.1.1 Definición

Los jarabes son preparaciones acuosas, límpidas y de elevada viscosidad, que contienen un azúcar, generalmente sacarosa, en concentración similar a la de saturación; por lo que son apropiados para la administración de fármacos hidrosolubles. Estos facilitan la administración oral de fármacos que tienen caracteres organolépticos desagradables, por tanto, son fácilmente aceptados por niños y ancianos, habitualmente prescritos en pediatría y geriatría. Si el agente edulcorante es la sacarosa, la densidad del jarabe es 1,313 a 15-20 °C; el punto de ebullición, 105 °C, y el contenido en sacarosa, 64-65% (p/p), que corresponde aproximadamente a 2/3 de sacarosa y 1/3 de agua (55, 56).

2.7.1.2 Características

El jarabe es presentado en forma líquida, son límpidos y translúcidos. Su sabor, el color y el olor son característicos del principio activo o sustancias adicionadas.

Revisión Bibliográfica

Presenta color café oscuro y sabor dulce, como consecuencia de la concentración de azúcar. Con los jarabes se consigue la conservación de las sustancias medicamentosas en forma cómoda y la administración fácil de sustancias acres, amargas o repugnantes (55).

2.7.1.3 Tipos de jarabe

Existen dos tipos de jarabes: los aromáticos y los medicamentosos (55).

A. Jarabes aromáticos

Los jarabes aromáticos, llamados también "no medicamentosos", son aquellos que no contienen sustancias farmacológicamente activas. Son, en realidad, soluciones saturadas de un azúcar que pueden contener sustancias aromáticas o de sabor agradable y agentes correctores del color. Dentro de este grupo de jarabes se encuentran los simples. Se utilizan para las siguientes finalidades:

- Como vehículos en preparaciones extemporáneas, ya sean soluciones o suspensiones.
- Como punto de partida para la preparación de jarabes medicamentosos.
- Como integrantes de otras formas farmacéuticas: para corregir el sabor de formas líquidas orales, como espesantes de disoluciones orales o como agentes aglutinantes en la preparación de granulados (55).

B. Jarabes medicamentosos

Son jarabes aromáticos que contienen uno o más fármacos y se emplean en terapéutica por la acción característica de los fármacos de la fórmula (55).

2.7.1.4 Principales componentes

Los componentes básicos de un jarabe son azúcares, agua purificada, conservantes antimicrobianos, codisolventes, saborizantes y otras sustancias auxiliares como espesantes, estabilizantes y colorantes (57, 58).

- Azúcares. El azúcar más frecuentemente utilizado es la sacarosa, cuya concentración de saturación es del 64-65% (p/p). Esta solución presenta

Revisión Bibliográfica

actividad reductora y evita la oxidación de fármacos fácilmente alterables por este proceso (55).

En algunas ocasiones el azúcar es sustituido, total o parcialmente, por sustancias que no son azúcares como el sorbitol, la glicerina y el propilenglicol (57-59).

- Agua. Es necesario utilizar agua purificada o destilada, desprovista de sales (fundamentalmente iones de calcio) que puedan ocasionar precipitaciones de los fármacos incorporados. Asimismo, se recomienda que esté exenta de anhídrido carbónico porque facilita el proceso de hidrólisis de la sacarosa (57-59).
- Conservantes. La cantidad adecuada para proteger un jarabe depende de la proporción de agua disponible para el crecimiento de microorganismos, de la naturaleza y actividad antimicrobiana inherente a los componentes del jarabe y de la actividad misma del conservante (57-59).

Algunos de los conservantes más habituales son el ácido benzoico (0.1-0.2%) y el benzoato de sodio (0.5 %) (57, 58).

Debido a que la capacidad conservante de la forma no disociada es superior a la forma disociada (ion benzoico), la eficacia del ácido benzoico y derivados está fuertemente condicionada por el pH del jarabe, que determina la disociación del conservante (57, 58, 60).

- Codisolventes. Con objeto de facilitar la disolución de componentes solubles en alcohol (ciertos colorantes y saborizantes). Se puede recurrir también a la glicerina, que incrementa la solubilidad de taninos y extractos vegetales en jarabes, o bien a diversos polioles (57, 58, 60).
- Saborizantes. Por su alto contenido en azúcar, los jarabes son formas de dosificación de sabor agradable (57, 58, 60).

Debido a que los jarabes son preparaciones acuosas, el saborizante debe poseer suficiente solubilidad en agua (58, 60, 61).

En la sensación gustativa propiamente dicha, se distinguen cuatro sabores fundamentales, primarios o básicos: dulce, salado, ácido y amargo (58, 60, 61).

- Colorantes. Para mejorar la apariencia del jarabe se seleccionan colorantes que concuerden con el saborizante empleado. Al igual que los saborizantes, deben ser solubles en agua (58, 61).

2.7.1.5 Ventajas y desventajas

Las formas líquidas orales suelen presentar algunas ventajas, como una mayor biodisponibilidad que las formas sólidas, un menor efecto irritante sobre la mucosa gástrica y una mayor facilidad de ingestión por parte de pacientes pediátricos y geriátricos que las formas sólidas. Entre los inconvenientes, cabe destacar el mayor riesgo de contaminación y la posible inestabilidad de los fármacos en disolución (61, 62).

2.7.1.6 Pruebas para evaluar la calidad

El objetivo del control de la calidad del producto terminado es asegurar el cumplimiento de las especificaciones establecidas para la formulación, así como la conservación de las características y composición del producto en forma constante desde un lote de producción a otro (61, 63, 64).

En el caso particular de los jarabes farmacéuticos se describen como ensayos empleados en el control de la calidad: las características organolépticas (color, olor, sabor y aspecto), pruebas físicas (viscosidad, densidad relativa, pH, índice de refracción), pruebas químicas (identificación del principio activo, valoración) y ensayos de calidad microbiológicos (61, 63, 64).

2.8 Calidad mediante diseño

En las últimas décadas, las compañías farmacéuticas han gastado enormes cantidades de recursos para garantizar la calidad, cumplir con las normas y producir medicamentos lo más rentable posible (65, 66). Por esta razón se han buscado alternativas que iguallen el peso de los atributos del producto en desarrollo (IFA, excipientes, propiedades físico químicas, estabilidad física y química, etc) y que influyan significativamente no solo en la seguridad y eficacia del producto, sino en la calidad del mismo (67, 68). La ICH (de sus siglas en inglés International Conference of Harmonization) aprobada en el 2006, resalta brevemente el enfoque para

alcanzar la calidad del producto a través de la alternativa de optimización de calidad mediante diseño (Quality by Design "QbD") (69, 70). El QbD se define como un enfoque basado en la ciencia para el diseño de formulaciones y procesos de elaboración con el fin de garantizar los objetivos de calidad del producto predefinidos. Está destinado principalmente a disminuir la variación del producto y mejorar la eficiencia del proceso, así como reducir los costos en diferentes etapas. Entre las principales herramientas de QbD se encuentra el uso de experimentos diseñados estadísticamente (71).

2.8.1 Diseños de experimento

El diseño de experimentos (DoE) es un método que determina la relación de los factores que actúan en la respuesta. Dicho resultado se puede mostrar a través del análisis de varianza (ANOVA) (65, 72).

Esta técnica resulta ser ventajosa con respecto al método tradicional de un "factor a la vez" porque reduce el número de experimentos, consumo de tiempo y costo durante el desarrollo del producto (65, 72).

2.9 Estudios de estabilidad física

El objetivo de un estudio de la estabilidad física es determinar el período de tiempo de almacenamiento en unas condiciones especificadas, en las que el producto todavía se encuentra dentro de las especificaciones establecidas. La estabilidad es un factor esencial de la calidad, seguridad y eficacia de un medicamento. Un jarabe que no tiene una estabilidad suficiente puede producir cambios en el estado físico (ph, densidad, características organolépticas, etc.); así como en las características químicas, pudiendo ocurrir la formación de sustancias de descomposición de alto riesgo para la salud (73, 74).

El estudio de estabilidad consiste en una serie de pruebas para asegurar que la calidad de un medicamento se mantiene dentro de las especificaciones, en las condiciones de envase, embalaje y almacenamiento durante un período de tiempo especificado (73, 74).

Por ejemplo, la estabilidad de un jarabe farmacéutico puede verse afectado por diversos factores, dentro de los que destacan la humedad, la temperatura, el pH,

Revisión Bibliográfica

densidad y las características organolépticas. Otras propiedades muy importantes que se alteran comúnmente, afectando la estabilidad de los jarabes son, que modifican la cantidad del principio activo y por tanto afectan la biodisponibilidad. Todas estas pruebas son herramientas que utiliza el tecnólogo farmacéutico, para el desarrollo de formas farmacéuticas líquidas como criterios de biodisponibilidad (74).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se contribuyó a la estandarización del extracto acuoso de las hojas de la especie *Capraria biflora* L., llevando a cabo 10 extracciones a las cuales se le realizaron diferentes métodos de ensayos descritos en las Normas Ramales de Salud Pública # 312 (75). Se realizó estudios fitoquímicos pertenecientes a los extractos acuosos para reconocer metabolitos presentes en la especie que ya habían sido revelados en otras investigaciones de una manera cualitativa; y se cuantificó fenoles y flavonoides con el fin de obtener la cantidad presente de estos metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora. Se llevó a cabo un diseño factorial de experimento 2³ de jarabes con el extracto acuoso de las hojas de la *Capraria biflora* L., con efecto gastroprotector y le fueron medidos los parámetros de control de la calidad correspondientes; y se realizó un estudio de estabilidad física a los 30 días de elaborados.

Se eligió para este estudio las hojas de la *Capraria biflora* L. como órgano principal, por ser aquí en donde se encuentra la mayor concentración de fenoles y flavonoides (76), los cuales son los principales responsables de la actividad gastroprotectora (15).

3.1 Equipos, reactivos y materiales empleados

Equipos

- Balanza analítica digital (Sartorius, BS-124S, Alemania)
- Balanza técnica digital, Gram Precisión, España.
- Densitómetro (Density Specific Gravity Meter, DA-130N, Kyoto, Japón)
- Equipo de reflujo (Grant Sub-14, Inglaterra)
- Estufa (Binder, USA)
- Estufa (DHG- 9146A)
- Molino de cuchillas (IKA-MF 10 Basic, Alemania)
- Plancha de calentamiento (IKA, C-MAG HP7, Alemania)
- Espectrofotómetro UV-VIS (TEG-10UV, USA)
- Refractómetro digital (ABBE, WYA-S, URSS)
- pH-metro (HANNA)
- Campana de extracción

Materiales y Métodos

- Lámpara UV, CAMAG
- Agitador eléctrico, IKA, Estados Unidos.
- Refrigerador, LG. Chino.

Reactivos

- Ácido clorhídrico concentrado (UNI-CHEM)
- Ácido gálico (SIGMA-ALDRICH)
- Carbonato de Sodio al 7 % (Panreac)
- Cloruro de aluminio (MERCK)
- Quercetina (ACROS-ORGANICS)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Felhing A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo Folin–Ciocalteu (FC) (SIGMA-ALDRICH)
- Solución amoniacal (UNI-CHEM)
- Solución de Ninhidrina al 2 %
- Cinta de magnesio metálica (Analar)
- Alcohol amílico
- Cloruro férrico (Analar)
- Acetato de sodio
- Etanol 90 % (UNI-CHEM)
- Benzoato de sodio, Grupo Empresarial LABIOFAM, Cuba

Materiales

- 1 balón de 1000 mL
- 1 probeta de 500 mL
- 1 probeta de 100 mL
- 1 embudo
- 1 erlenmeyer de 500 mL
- 3 cápsulas de porcelana pequeñas
- 1 cápsula de porcelana grande
- 1 pipeta de 1 mL

Materiales y Métodos

- Papel de filtro
- Soporte para embudo
- Beaker
- Matraces de 10 mL
- Tubos de ensayo y gradilla
- Desecadora

3.2. Preparación del material vegetal

3.2.1. Recolección del material vegetal

Las hojas de *Capraria biflora* L. fueron recolectadas entre los días 25, 26, 27 y 28 de enero del año 2019, en el poblado de Guayos perteneciente al municipio de Cabaiguán y provincia de Sancti-Spíritus. El material recolectado fue lavado con abundante agua potable y trasladado en bolsas de nylon negro al Laboratorio de Química Farmacéutica. Previo al procesamiento del material y se realizó la comprobación botánica de la especie en la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas.

3.2.2. Secado y molinado del material vegetal

Para su secado las hojas se lavaron con abundante agua potable, se esparcieron sobre secadores de malla plástica y se mantuvieron a la sombra durante 24 h. Seguidamente las hojas se extendieron en capas delgadas sobre bandejas metálicas y se sometieron a secado mediante calor artificial en la estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con aire recirculado durante tres días. Durante el secado se removieron las hojas varias veces para evitar fermentaciones o contaminaciones microbiológicas.

Después de secado, se redujo el tamaño de partícula del material vegetal en el molino de cuchillas de cinco pulgadas, utilizando un tamiz de 1 mm para homogenizar el tamaño de partículas (16). Posteriormente se envasó el material molinado en bolsas de nylon negro bien cerradas.

Hasta la realización de los estudios siguientes el material seco, molinado y envasado se conservó en desecadora protegida de la luz en un lugar fresco.

3.3. Obtención de los extractos acuosos

Se obtuvo un total de 10 extractos para su evaluación físico-química. Se pesó en la balanza analítica 20 g de la muestra vegetal seca y molinada y se transfirió a un balón de 500 mL. La droga se humectó con un volumen de 200 mL de agua destilada y se procedió a la extracción sólido-líquido (por reflujo) durante 30 minutos. Posteriormente se filtró en caliente utilizando papel de filtro, se lavó dos veces hasta completar 100 mL y se concentró mediante baño María a una temperatura de 100 °C en una plancha hasta quedar 40 mL para ajustar dosis.

3.3.1. Caracterización físico-química de los extractos para su futura estandarización

Para la caracterización de los extractos se determinó los siguientes parámetros: características organolépticas, pH, índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales y análisis capilar; según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 312; además del tamizaje fitoquímico realizado a cada uno de los extractos (75).

3.3.1.1. Características organolépticas

Determinación del olor

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de longitud, se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se dejó evaporar y se determinó su olor (75).

Determinación del color

Se tomó un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas (75).

Determinación del sabor

Se tomó una pequeña muestra de los extractos acuosos de las hojas de *Capraria biflora* L. y probó para determinar el sabor del extracto.

3.3.1.2 Determinación de pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura (75).

3.3.1.3 Determinación del índice de refracción

Se colocó sobre el prisma de medición del refractómetro una gota de agua destilada, utilizando para ello un gotero. Se ajustó el instrumento seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual. El ajuste se hizo moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. A continuación, se realizó la lectura de una gota de la muestra de ensayo (75).

3.3.1.4 Determinación de la densidad relativa

Se determinó la densidad relativa de la muestra de ensayo con el densitómetro digital, siendo anteriormente calibrado con agua destilada.

3.3.1.5 Determinación de sólidos totales

De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirió 1 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en baño de agua y se evaporó la muestra hasta que el residuo estuvo aparentemente seco; posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante tres horas. Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior las veces necesarias, hasta obtener masa constante (75). Esta determinación se le realizó a cada extracto por triplicado y posteriormente hallando el promedio se determinó el valor de los sólidos totales en % (g en 100 mL).

Expresión de los resultados: El porcentaje de los sólidos totales (S_t) se calcularon mediante la ecuación siguiente:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Materiales y Métodos

Donde:

S_t : Sólidos totales (%)

Pr: Masa de la cápsula más el residuo (g)

P: Masa de la cápsula vacía (g)

V: Volumen de la porción de ensayo (g)

100: factor matemático

3.3.1.6 Análisis capilar

Se vertió 20 mL de la muestra de ensayo en un beaker de 100 mL de aproximadamente 5 cm de diámetro y 70 cm de altura y se introdujo en la cámara protectora.

Se colocó una banda de papel de filtro de 4 cm de ancho por 15 cm de longitud verticalmente de tal manera que su banda superior quede fijado a una varilla metálica que permita la suspensión de la tira de papel y su extremo inferior esté sumergido dentro de la muestra de ensayo, pero sin tocar el fondo ni las paredes del recipiente.

Se cerró la cámara y se dejó transcurrir 2 horas garantizando una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la corrida; finalizada esta se retira el papel y se deja secar. Una vez seco se procede a su inspección visual y caracterización (75).

Examen e interpretación de la imagen. Para el análisis e interpretación de la imagen se tienen en cuenta los aspectos siguientes:

- Color
- Altura
- Descripción de las diferentes partes
- Cambios de coloración con vapores de amoníaco
- Examen bajo la luz ultravioleta

Color: En dependencia de la tonalidad que predomine, el color de la imagen en conjunto se define como:

- Vivamente coloreada
- Poco coloreada
- Muy poco coloreada

Materiales y Métodos

Altura: La altura de una imagen capilar se determina midiendo con una regla graduada en cm del borde inferior del papel hasta la franja clasificándose en:

Alta ----- de 8 cm en adelante

Normal ----- entre 5.0 y 8.0 cm

Baja ----- menos de 5.0 cm

Descripción de las diferentes partes: Se describen e informan la forma que tiene la franja y las características de la subfranja, banda y sub-banda.

Cambios de coloración con vapores de amoníaco: Se expone la imagen capilar a los vapores de amoníaco y se observan e informan los cambios de coloración. El efecto de la coloración debe desaparecer al retirar la tira de papel de los vapores amoniacales.

Examen bajo la luz ultravioleta: Después de la corrida la tira de papel bien seca se expone a la luz ultravioleta a 366 nm. Se observa e informa la fluorescencia de las diferentes zonas de la imagen.

3.4 Evaluación fitoquímica de los extractos

Con el objetivo de corroborar la composición química de los extractos y los metabolitos presentes que han sido reportados en investigaciones anteriores, se realizó la evaluación fitoquímica según los procedimientos habituales reportados en la literatura (77).

3.4.1 Tamizaje fitoquímico

Para evaluar la posible composición química de los extractos acuosos de las hojas de *Capraria biflora* L. en cuanto a metabolitos secundarios se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo la técnica descrita por Miranda y Cuéllar (36).

Se realizaron las pruebas pertenecientes al extracto acuoso las cuales se mencionan a continuación: Ensayo de espuma para la identificación de saponinas, Shinoda para flavonoides, Ninhidrina para aminoácidos libres, Fehling para azúcares reductores, el de Cloruro férrico para fenoles y/o taninos, Dragendorff para alcaloides y el ensayo de enfriamiento para la identificación de mucílagos.

Ensayo de Espuma: Si el extracto se encuentra en etanol se diluye en cinco veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente de cinco a diez minutos, y si

Materiales y Métodos

es acuoso también se diluye en cinco veces su volumen en agua. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de dos minutos. Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénicas.

Ensayo de Shinoda: A 1 mL del extracto disuelto en etanol, se le adiciona un pedacito de cinta de magnesio metálica. Se añade 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado gota a gota. Después de la reacción se espera 5 minutos hasta la aparición del color.

- Si no se observan bien los colores se añaden 2 mL de agua y se agita la mezcla con 1 mL de alcohol amílico y se observan los colores en esta fase.
- Si el extracto se encuentra en agua, se produce de igual forma hasta la adición del ácido clorhídrico concentrado y se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que las mismas se separan.

El ensayo se considera positivo cuando aparece una coloración o el alcohol amílico se colorea de diferentes colores, intensos en todos los casos. Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto vegetal.

Los colores están relacionados con la estructura del flavonoide, lo cual se puede observar en la **tabla 1**.

Tabla 1. Estructuras de los flavonoides según el color.

Flavonas	Amarillo, Naranja a rojo
Flavonoles y Flavonoles	Amarillo- carmín
Flavononas	Carmín a magenta

Ensayo de Ninhidrina: Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 2 mL de agua y se adicionan 2 mL del reactivo (solución A y B mezcladas en iguales cantidades y justo en el momento de realizar el ensayo) y se calienta en baño de agua por 10 minutos; si de lo contrario se encuentra en agua solamente se le añade los 2 mL de la solución reactiva de ninhidrina y se procede de igual forma. El ensayo se considera positivo si la solución desarrolla un color violáceo. Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general.

Materiales y Métodos

Ensayo de Fehling: Para ellos, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adiciona 2 mL del reactivo (A+B recién preparado) y se calienta en baño de agua de 5- 10 minutos. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado. Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores.

Ensayo de Cloruro Férrico: A una alícuota del extracto etanólico se le adicionan tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica. Si la alícuota es acuosa entonces se le añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de solución reactiva. El ensayo se considera positivo si desarrolla una coloración rojo-vino (compuestos fenólicos en general), verde intenso (taninos del tipo pirocatecólicos) y azul (taninos del tipo pirogalotánicos). Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos.

Ensayo de Dragendorff: Si la alícuota está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en un 1 mL de HCl (1 %). Si por el contrario el extracto es acuoso a la alícuota de ensayo se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, se calienta suavemente y se deja enfriar hasta acidez. A ambas soluciones acuosas ácidas se le añaden tres gotas del reactivo de Dragendorff. La evidencia es que se producen complejos insolubles, de tal manera que, si hay opalescencia el ensayo se considera positivo (+), si turbidez definida (++) y si precipitado (+++). Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides.

Ensayo de Mucílagos: Una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C durante 15 minutos. El ensayo es positivo si la solución toma una consistencia gelatinosa. Permite reconocer en un extracto la presencia de estas estructuras de tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae.

3.5 Procedimiento de los límites de especificaciones de calidad por el método de Bowker

Existen en la literatura consultada varios métodos de cálculo para los límites de especificaciones, pero, para este caso en estudio se usa el de Bowker. Se van a calcular los límites superior e inferior de especificación de manera preliminar, conociendo que esta especificación de calidad se clasifica en bilateral asimétrica (78).

Este método puede ser aplicado para tamaños de muestras pequeños y grandes, siendo poco laborioso. Para poderlo utilizar se necesitan al menos, los resultados experimentales de 10 lotes industriales consecutivos con 25 muestras de cada uno, ya que estadísticamente mientras mayor cantidad de muestras se tengan mejores resultados se obtienen, debido a ello, en esta investigación solo se aportan resultados para la futura estandarización del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L. Tiene como requisito previo la comprobación de la distribución normal de los datos experimentales (Media y desviación estándar), y el área bajo la curva de la distribución normal debe ser simétrica e igual a la unidad. Para este método hay que tener establecido un nivel de confianza (NC) y un porcentaje de elementos buenos (100Q) (52).

El mismo tiene en cuenta las siguientes expresiones:

$$LSE = \bar{X} + k \cdot S \qquad \qquad \qquad LIE = \bar{X} - k \cdot S$$

$$k = z_p \left(1 + \frac{z_\alpha}{\sqrt{2n}} + \frac{5z_\alpha^2 + 10}{12n} \right)$$

Donde:

\bar{X} : media aritmética.

S: desviación estándar

LSE: límite superior de especificación

LIE: límite inferior de especificación

Z_p : es el valor z de la distribución normal correspondiente a un área $Q/2$ o $0,5 - (p/2)$ siendo $Q=1-p$, donde p es la proporción de elementos no conformes tolerados en los lotes

Z_α : es el valor z de la distribución normal correspondiente a un área $0,5 - \alpha$ o $(NC/100) - 0,5$, lo que está asociado al nivel de confianza con que se desea trabajar.

Materiales y Métodos

Se considera un valor de $Q = 99 \%$ porque se sigue un procedimiento tal que el 95 % de todas las muestras posibles incluyan por lo menos el 99 % de los elementos dentro de las especificaciones. Para un intervalo de confianza del 95 % las especificaciones serán:

$$LE = \bar{X} \pm k.S$$

Para los resultados de Z_p y Z_α fue utilizada la tabla de valores de distribución normal estándar encontrada en el libro calidad en la industria farmacéutica (79).

3.6 Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales

3.6.1 Determinación del contenido de fenoles totales

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L. empleando la reacción de Folin-Ciocalteu, según el método de Pekal (2014) con algunas variaciones, utilizando ácido gálico como compuesto fenólico de referencia (80).

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico: Para la curva de calibración se preparó una solución madre pesándose 10 mg de ácido gálico, estos se disolvieron en agua destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para la obtención de una disolución madre de concentración 1 mg/mL; para un intervalo de concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/mL}$.

Se pipetearon alícuotas de 68, 136, 272, 408 y 544 μL de la disolución madre de ácido gálico. De cada una de ellas se tomaron 0,5 mL se adicionó 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 0,3 mL de etanol y 1,1 mL de agua destilada y se incubó durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1 mL de Na_2CO_3 7% y 0,4 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos en la oscuridad se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento sin la muestra.

Procedimiento de la muestra del extracto de *Capraria biflora* L.:

Se preparó una mezcla reactiva formada por 0.5 mL de extracto (500 $\mu\text{g/mL}$ en agua bidestilada), 0.3 mL de etanol, 0.1 mL del reactivo FC y 1.1 mL de H_2O , se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 $^\circ\text{C}$). Posteriormente se le adicionaron 0,4 mL de H_2O y 1 mL de Na_2CO_3 (7 %), se incubó nuevamente durante 30 minutos.

Materiales y Métodos

Se leyó la absorbancia a 765 nm contra un blanco de solución hidroalcohólica (0.3 mL etanol + 2.1 mL de H₂O).

La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del ácido gálico y se expresó como miligramos de contenido fenólico equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES).

3.6.2 Determinación del contenido de flavonoides totales

Se determinó el contenido de flavonoides totales en el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L. según la metodología descrita en la literatura (80), con algunas variaciones, utilizando como flavonoide de referencia la quercetina.

Preparación de la curva de calibración de la quercetina: Para la curva de calibración se preparó una solución madre pesándose 0.5 mg de quercetina, estos se disolvieron en etanol absoluto y se enrasó a un volumen de 10 mL para la obtención de una disolución madre de concentración 0.05 mg/mL; para un intervalo de concentraciones de 2-10 µg/mL.

Se pipetearon alícuotas de 80, 160, 240, 320 y 400 µL de la disolución madre de quercetina. De cada una de ellas se tomó 2.5 mL se adicionó 1.25 mL de AlCl₃ (2 %) y 1.25 mL de H₂O destilada, se homogenizó la mezcla y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se leyó la absorbancia a 425 nm en el espectrofotómetro utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento, pero en vez de adicionar 1 mL de quercetina se adicionó 3.75 mL de etanol absoluto y de agua 1.25 mL (es decir el mismo procedimiento sin la muestra).

Procedimiento de la muestra del extracto de *Capraria biflora* L.:

Se preparó una mezcla reactiva formada por 2.5 mL de extracto, 1.25 mL de AlCl₃ (2 %) y 1.25 mL de agua, se agitó y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 425 nm contra un blanco de AlCl₃ en mezcla hidroalcohólica. Los resultados se expresaron como µg de quercetina equivalente por mg de extracto seco (µgQE/mg).

3.7 Obtención de los extractos para la elaboración de los jarabes

Se pesaron en la balanza técnica digital 75 g de la muestra vegetal seca y molinada y se transfirieron a un balón de 1000 mL. La droga se humectó con un volumen de 750 mL de agua destilada y se procedió a la extracción por reflujo durante 30 minutos. Posteriormente se filtró en caliente utilizando papel de filtro, se lavó dos veces a completar 375 mL aproximadamente y se concentró mediante baño María a una temperatura de 100 °C en la plancha hasta quedar 150 mL (20 % del volumen inicial) (81).

3.8 Valoración de los jarabes del extracto acuoso de *Capraria biflora* L.

Se valoró la pertinencia de los componentes, sus concentraciones y el método de elaboración del jarabe, basados en la formulación y técnica de elaboración de los jarabes obtenidos a partir de extractos vegetales reportados en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos, y que se rigen por los requisitos que exigen actualmente para estos productos en la literatura científica, regulaciones y normativas actuales. Para esto se partió de considerar la composición de las formulaciones, sus especificaciones de calidad y método de elaboración establecidos en el LMV (**Tabla 2**). En base a este análisis se realizó la propuesta de cambios a la formulación y al método de elaboración.

Tabla 2. Componentes de la formulación, sus cantidades y sus funciones (100 mL)

Componente	Concentraciones		Función
Extracto acuoso de las hojas de <i>Capraria biflora</i> L.	10 %	20 %	Ingrediente activo
Benzoato de sodio	0.5 g	0.5 g	Preservo
Sacarosa	65 %	85 %	Viscosante y edulcorante
Agua destilada	c.s.p 100 mL	c.s.p 100 mL	Vehículo

Método de elaboración:

1. Preparación del jarabe simple

Se realizaron 4 jarabes simples para las 8 formulaciones y sus réplicas, para obtener un volumen de 400 mL, dos de ellas por el método en caliente (50 °C) y las otras dos a temperatura ambiente, con agitación constante a una velocidad de 500 rpm (**Tabla 3**) y durante 40 minutos (tiempo en el cual la sacarosa se disolvió completamente).

Tabla 3. Obtención de los jarabes simples.

Jarabes simples	Cantidad (g)	Método	Volumen (mL)	Velocidad de Agitación (rpm)
1	260	Temp. Ambiente	400	500
2	260	Caliente (50 °C)	400	500
3	340	Temp. Ambiente	400	500
4	340	Caliente (50 °C)	400	500

1.1 Método en caliente

- Se pesaron 260 g y 340 g por duplicado de sacarosa y se traspasaron a un beaker de 500 mL.
- Se completó con agua destilada hasta 400 mL.
- Se colocaron encima de una plancha a una temperatura de 50 °C durante 40 minutos y se agitaron de manera constante con un agitador eléctrico a una velocidad de 500 rpm, hasta que la sacarosa quedó disuelta completamente.
- Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

1.2 Método a temperatura ambiente

- Se pesaron 260 g y 340 g respectivamente de sacarosa y se traspasaron a un beaker de 500 mL.
- Se completó con agua destilada hasta 400 mL.
- Se pusieron a temperatura ambiente con agitación constante con un agitador eléctrico a una velocidad de 500 rpm, hasta que la sacarosa quedó totalmente disuelta en un tiempo de 40 minutos.

2. Preparación de las formulaciones:

Se llevó a cabo un total de 8 formulaciones y a cada una de ellas se le realizó una réplica, cuyos componentes y concentraciones de los mismos se encuentran en la **tabla 2**. Se procedió de la siguiente manera para todos:

- Se pesó 0.5 g de benzoato de sodio.
- Se pipetearon 10 mL ó 20 mL del extracto en dependencia de la formulación correspondiente.
- Se incorporó el benzoato de sodio en el extracto hasta su completa disolución.
- Se completó volumen con los jarabes simples hasta 100 mL, seleccionando el jarabe correspondiente para cada una de las formulaciones.
- Se homogenizó la formulación.
- Se filtró.
- Se envasó en frascos de color ámbar de 120 mL.
- Se conservó a temperatura ambiente y lugar fresco.

3.9 Diseño de experimentos para el desarrollo del jarabe.

Se realizó un diseño de experimentos factorial 2^3 con dos niveles y tres factores (concentración del extracto, concentración de sacarosa y temperatura) con una réplica para cada uno. Se emplearon como componentes de las formulaciones los que se describen en la **tabla 2**. Los factores (independientes) utilizados se describen en la **tabla 4** con sus dos niveles, y las 8 formulaciones que se obtienen se pueden observar en la **tabla 5**. El orden de selección de las formulaciones para su preparación fue aleatorio atendiendo al diseño experimental.

3.9.1 Control de la calidad tecnológica

Las variables respuesta (variables dependientes) consideradas fueron: densidad relativa, índice de refracción y pH, para la evaluación del control de la calidad tecnológica a tiempo cero, además de realizarle a cada uno de los jarabes el tamizaje fitoquímico para corroborar de manera cualitativa la presencia de

Materiales y Métodos

flavonoides y/o taninos, los cuales son los principales responsables de la posible actividad gastroprotectora que se les atribuye a dichos jarabes.

Tabla 4. Factores (variables independientes) empleados en el diseño factorial 2^3 para el diseño de la formulación.

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
Concentración del extracto	20 mL	10 mL
Concentración de sacarosa	85 g	65 g
Temperatura	50 °C	ambiente

En el análisis de los resultados de las variables respuestas (dependientes) se utilizó el paquete de programas estadísticos Statgraphics Centurion XV versión 15.2.14 del 2007; y se realizó un ANOVA multifactorial teniendo en cuenta los factores independientes, para detectar efectos significativos se utilizó el método de la diferencia menos significativa de Fisher utilizando los intervalos LSD (de sus siglas en inglés Least Significant Difference).

Tabla 5. Composición de las 8 formulaciones obtenidas en el diseño factorial 2^3 .

Formulación	Concentración del extracto %	Concentración de sacarosa %	Temperatura °C
1	10	65	ambiente
2	20	85	50
3	10	85	50
4	10	65	50
5	20	85	ambiente
6	20	65	ambiente
7	10	85	ambiente
8	20	65	50

3.10 Estudio de estabilidad de los jarabes

Se realizó un estudio de estabilidad física de los jarabes al cabo de 30 días de elaborados y almacenados a temperatura ambiente; con el objetivo de verificar si se

Materiales y Métodos

mantienen relativamente constantes los parámetros evaluados a tiempo cero (características organolépticas, pH, índice de refracción y la densidad relativa), o que haya ocurrido alguna modificación razonablemente pequeña de las condiciones iniciales de estos valores que no altere significativamente la acción farmacológica para lo cual está destinada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Preparación del material vegetal

4.1.1. Procesamiento del material vegetal

Teniendo en cuenta la información etnobotánica referida para la especie *Capraria biflora* L. se decidió el estudio de las hojas por ser la parte aérea más empleada en la medicina tradicional, usada popularmente para tratar la fiebre y por sus propiedades diuréticas, estimulantes y digestivas, se usa para el tratamiento de afecciones del tracto urinario y para aliviar algunos desordenes dérmicos, como escabiosis y escozor. También se refiere su uso en el tratamiento de dolor de oído, hemorroides y reumatismo. En investigaciones anteriores se comprobó que el extracto acuoso de esta parte de la planta presenta una potente actividad gastroprotectora; es por ello, que este estudio ayudará al uso más racional de la especie botánica, llegando hasta la elaboración de una forma farmacéutica líquida con efecto gastroprotector.

La recolección del material vegetal con fines farmacéuticos asegura la identidad de la droga; cuya identificación debe ser realizada por un personal experto y capacitado. En este trabajo se realizó, la identificación taxonómica del material vegetal por una especialista en la temática, como criterio seguro de su identidad botánica, observándose una total correspondencia con las características del material recogido y con la descripción botánica establecida en la literatura (8).

La recolección del material se realizó de forma manual, pues es la técnica que se aconseja, tomando las partes aéreas y dejando ramas suficientes para garantizar nuevamente el desarrollo de la planta y así un uso sostenible de este recurso. El lavado cuidadoso con agua potable garantizó la limpieza del material vegetal. El secado de la planta se realizó mediante calor artificial (40 °C por tres días) que permitió eliminar suficiente cantidad de humedad, como para favorecer la conservación de la calidad de la droga y prevenir el deterioro de la misma, ya sea por enmohecimiento, acción de enzimas y/o bacterias y posibles alteraciones químicas. Esta operación resulta ventajosa pues, facilita los procesos de trituración necesarios para obtener una forma más conveniente para su comercialización y

almacenamiento. Luego del secado y molinado de la droga, esta no varió ninguna de sus características organolépticas (color y olor).

4.2 Obtención de los extractos

Los extractos acuosos procedentes de las hojas de *Capraria biflora* L., se obtuvieron mediante reflujo por 30 minutos, se filtraron y se concentraron en baño María hasta tener un volumen de 40 mL.

4.2.1 Caracterización físico-química de los extractos

4.2.1.1 Características organolépticas

Al analizar las características organolépticas de los 10 extractos se puede plantear que ellos presentan un **color** pardo rojizo intenso, su **olor** es característico aromático de la especie y su **sabor** es característico, agradable, no reseca las mucosas y brinda una buena sensación, además se puede observar en relación a su **apariencia** que en todos los casos se muestra una transparencia definida. En ninguno de estos se evidenció la presencia de precipitados, de partículas en suspensión, ni hubo separación de capas. Todo lo anterior coincide con lo reportado en investigaciones anteriores (16, 17).

En la **tabla 6** se muestran los valores de pH, índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales para los 10 extractos procedentes de las hojas de *Capraria biflora* L.

Tabla 6. Resultados de los valores numéricos de los métodos de ensayos (media aritmética \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm s$), n = 10)

Variables analizadas	Resultados
pH	5.867 \pm 0.23
Índ. Refrac.	1.34812 \pm 0.0
Dens. Relat.	1.0376 \pm 0.0
Sól. Tot. %	3.7956 \pm 0.31

4.2.1.2 Determinación del pH

Se observa que los extractos acuosos de las hojas poseen valores similares en relación al **pH**, siendo todos ellos de valores entre 5.62 y 6.44, lo cual los hacen viables desde el punto de vista biológico y por tanto pueden ser utilizados para la obtención de los jarabes. Estos muestran un carácter de ácido débil, justificado por la presencia de compuestos resultantes de la extracción que aportan estas características, o bien debido a la combinación de las características ácidas y básicas aportadas por los diferentes grupos de familias químicas presentes en el medio, todas identificadas en el tamizaje fitoquímico. Entre los compuestos identificados que aportan características ácidas se encuentran los, flavonoides, fenoles y taninos (82). Este valor de pH obtenido puede ser óptimo para el desarrollo de formulaciones por vía oral ya que se encuentra dentro del rango reportado (83).

4.2.1.3 Determinación de sólidos totales

En relación a los **sólidos totales**, se observa que el extracto acuoso de las hojas presenta un valor de aproximadamente 3.7956 g/100 mL. Esta variable resulta de gran importancia a monitorear cuando de una planta se pretende extraer la mayor cantidad de metabolitos presentes en la misma (83). En nuestro trabajo se observan valores de sólidos totales mayores que los obtenidos en otras investigaciones realizadas con el extracto acuoso de la misma especie *Capraria biflora* L. (76), lo cual puede ser debido a condiciones ambientales a las cuales se encuentra expuesta la planta, época de recolección, tipo de suelo en la que está sembrada, la solubilidad en el disolvente empleado, las interferencias de otros componentes, el tipo de secado y la conservación de la misma; que da como resultado una variación en la cantidad de sólidos totales presentes; además en esta investigación solo se dejó reflujar por 30 minutos, sin embargo en la investigación con la cual se compara se reflujó durante 2 horas infuyendo esto también en las diferencias tan significativas de estos valores.

4.2.1.4 Determinación de la densidad relativa y del índice de refracción

La **densidad relativa** toma valores de 1.0376 (g/cm³) como promedio \pm 0.002633122 como desviación estándar; y el **índice de refracción** se encuentra entre los valores 1.34812 ± 0.002357871 . No todos estos parámetros se encuentran normados para el extracto acuoso de la *Capraria biflora* L. teniendo como método de extracción sólido-líquido mediante reflujo, por lo cual algunos no pueden ser comparados debido a que no existen reportes de estudios de este tipo para la especie, de ahí que estos resultados constituyan la base científica para el fundamento de investigaciones futuras sobre el tema; aunque se puede plantear que son adecuados tomando en consideración la correspondencia con otras drogas oficiales (75, 81).

En el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (54) se encuentran algunos extractos acuosos, que tienen propiedades curativas estomacales ya demostradas como son el extracto acuoso de *Aloe vera* utilizado como antiulceroso y el extracto acuoso de *Mangle rojo* que se usa como astringente en enfermedades diarreicas. Los resultados relacionados a los valores del pH, en estos extractos se encuentran un poco por debajo de los obtenidos en los 10 extractos acuosos de la presente investigación, es decir que presentan características relativamente más ácidas, lo cual puede ser debido a que presentan una mayor concentración de metabolitos que aportan propiedades ácidas; pero se puede evidenciar que a pesar de todo ello tienen buenas propiedades como para llegar a la elaboración de una forma farmacéutica terminada como es el jarabe. Los valores de densidad relativa e índice de refracción se encuentran en valores aproximados a los reportados en esta bibliografía. En relación a los valores de los sólidos totales ninguno de los dos coincide con los obtenidos para el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L., pues el del Mangle rojo está muy por encima del obtenido (16.499-19.50) y el del *Aloe vera* se encuentra muy por debajo (0.4-0.8 %); estos resultados son debido a que cada planta contiene diferentes metabolitos y en distintas cantidades, de ahí proviene la diversidad de cada especie y sus familias.

4.2.1.5 Análisis capilar:

Los resultados de los análisis capilares muestran que los extractos acuosos son vivamente coloreados, todos presentan una altura entre 11.4 cm y 12.7 cm teniendo

Resultados y Discusión

entre todos un promedio de 12.2 cm de alto, por lo cual se clasifica en alta (altura de 8.0 cm en adelante), presentando franjas regularmente dentadas. La subfranja es de color carmelita claro y la banda y subdanda de color carmelita un poco más oscuro, no mostrándose diferencias entre ellas. En cuanto a los cambios de coloración con vapores de amoniaco estos toman una coloración verde-amarilla clara en cada una de sus partes, y al retirar la tira de papel el color de estos vapores amoniacaes desaparece; y en cuanto a la fluorescencia, al someterlo a la luz ultravioleta se puede plantear que presenta fluorescencia amarilla para la subfranja y para la banda y sub-banda no presenta fluorescencia. Estas características pueden observarse en la **figura 1**, las cuales nos brinda una información cualitativa de cada uno de los extractos, dando en todos los casos muy semejantes características.

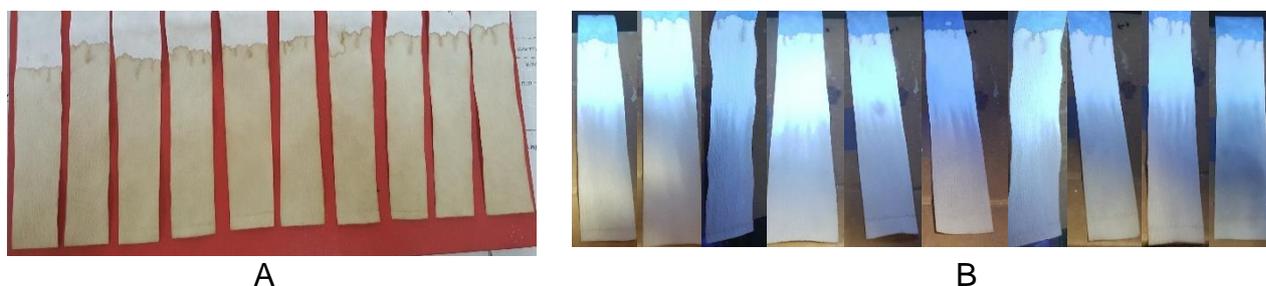


Figura 1. Resultados del análisis capilar A. Sin luz UV. B. Con luz UV.

4.3 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es ampliamente usado para evaluar la composición de las drogas vegetales, pero es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente, ya que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir la concentración de los mismos, la solubilidad en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes.

Los resultados de los ensayos para la determinación de metabolitos presentes en los 10 extractos acuosos analizados se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos procedentes de las hojas de *Capraria biflora* L.

Metabolitos	Ensayos	Extractos acuosos (1-10)
Saponinas	Espuma	+
Flavonoides	Shinoda	+
Aminoácidos libres	Ninhidrina	+
Azúcares reductores	Fehling	++
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+
Alcaloides	Dragendorff	+
Mucílagos	Mucílagos	-

El ensayo de espuma resultó ser positivo para todos los extractos en estudio, pues aparece espuma en la superficie del extracto acuoso de más de 2 mm de altura y persistió por más de 2 minutos (ver **figura 2**), evidenciando la presencia de saponinas en el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L., correspondiendo con resultados precedentes (84). Este metabolito presenta propiedades farmacológicamente activas ya comprobadas en investigaciones anteriores, como antiinflamatoria y como gastroprotectora (85).



Figura 2. Evidencia de saponinas.

El ensayo de Shinoda es positivo para todos los extractos, evidenciando la presencia de flavonoides tipo flavonas, pues el alcohol amílico tomó una coloración de naranja a rojo (ver **figura 3**), coincidiendo con investigaciones anteriores (17). La presencia de estos compuestos en las hojas de la *Capraria biflora* L. son los principales responsables de su actividad como gastroprotectora, y presentan

Resultados y Discusión

propiedades antioxidantes ya demostradas, evidenciado en estudios precedentes (86).



Figura 3. Evidencia de flavonoides.

Se observó la presencia de aminoácidos libres, dando positivo el ensayo de ninhidrina, pues se desarrolló un color violáceo para todos los casos (ver **figura 4**). Fue positivo (++) el ensayo de Fehling, mostrando la presencia de azúcares reductores, al aparecer un precipitado de color rojo (ver **figura 5**). Todo ello ya demostrado también en otras investigaciones (15-17).



Figura 4. Evidencia de aminoácidos libres.



Figura 5. Evidencia de azúcares reductores.

El ensayo del cloruro férrico fue positivo para cada uno de estos extractos, evidenciando la presencia de fenoles y/o taninos específicamente, pues se desarrolló una coloración verde intensa característica de la presencia de taninos del tipo pirocatecólicos (ver **figura 6**). En estudios anteriores se ha comprobado que los taninos presentes en el extracto acuoso de las hojas de la *Capraria biflora L.* presentan un gran porcentaje de protección gástrica (99.7 %) a dosis de 800 mg/Kg de peso (15).



Figura 6. Evidencia de fenoles y/o taninos

La presencia en el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L., de metabolitos tales como flavonoides, y otros compuestos fenólicos se comprobó en la tesis doctoral de Liliana Vicet (16) presentando un potente efecto antiinflamatorio (dosis de 200 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal y 400 mg/Kg por vía oral), presumiblemente por inhibición de la síntesis de prostaglandinas y otros mediadores de la respuesta inflamatoria. Presentan un moderado efecto analgésico (a dosis de 200 mg/Kg) probablemente como consecuencia de la acción antiinflamatoria manifestada; por lo que es recomendada para el tratamiento de dolores leves y moderados (16).

Existe la presencia de alcaloides en los 10 extractos, evidenciado por el ensayo de Dragendorff, al ser este positivo, pues se produjeron complejos insolubles mostrándose la opalescencia en el ensayo (ver **figura 7**). Esta presencia de alcaloides resulta extraña puesto que este metabolito es poco común en la familia y en particular en el género *Capraria* (16); aunque pueden encontrarse en algunas especies, particularmente los tipos quinazolina y quinolizidina; además en la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas se han llevado a cabo investigaciones con esta especie dando positivo este ensayo. Futuras investigaciones deberán realizarse para verificar a través de técnicas más específicas la presencia o ausencia de este tipo de metabolito, aunque en la presente contribución a la estandarización del extracto acuoso nos dio positivo la presencia de alcaloides en los diez extractos acuosos analizados, lo cual nos hace suponer que presentan este metabolito de forma segura.

El ensayo de enfriamiento de mucílagos fue negativo pues no se evidenció una consistencia gelatinosa, coincidiendo con lo reportado en la bibliografía consultada (16).



Figura 7. Evidencia de alcaloides.

Es importante señalar que los resultados obtenidos mediante este tamizaje ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente.

Estos resultados se encontraron en correspondencia con los informes fitoquímicos de la familia botánica, siendo similares a los obtenidos por Tejeda, 1998 (87), para drogas provenientes de otras localidades de la región central, lo cual sugiere que este factor no influye notablemente en la composición del material vegetal al menos desde el punto de vista cualitativo.

4.4 Determinación preliminar de los límites de especificación por el método de Bowker

Teniendo en cuenta los resultados disponibles se utilizó el método de Bowker para calcular de forma preliminar los valores de los límites de especificación de calidad, para cada una de las variables cuantitativas evaluadas en la caracterización físico-química de los extractos acuosos de las hojas de la especie *Capraria biflora* L., arribando a los valores que se muestran en la **tabla 8**:

Tabla 8. Resultado de los límites de especificación de calidad del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L.

Límites de especificación	Densidad relativa	Índice de Refracción	pH	Sólidos Totales %
LSE	1.048078	1.357792	6.7939	5.0449
LIE	1.027122	1.338448	4.9401	2.5463

4.5 Determinación del contenido total de fenoles y flavonoides

4.5.1 Determinación del contenido de fenoles totales

Se llevó a cabo la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos puesto que dentro de estos compuestos se encuentran los flavonoides y los taninos que son los principales metabolitos responsable de la actividad gastroprotectora.

El ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales, es una técnica que ha llegado a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles. Este método consiste básicamente en generar color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra (88, 89).

El contenido total de compuestos fenólicos se calculó empleando la curva de calibración del ácido gálico como patrón, los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco (mg EAG/g ES) **figura 8**.

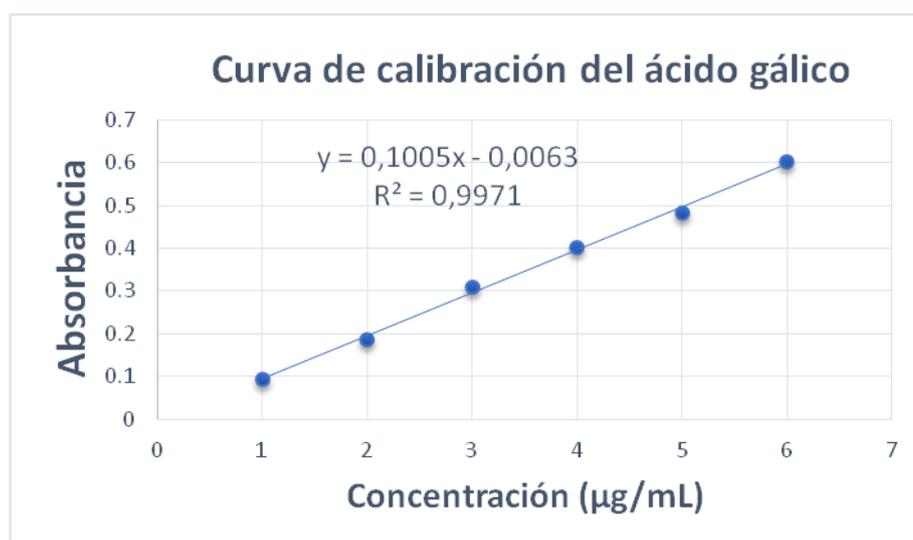


Figura 8. Curva de calibración del ácido gálico.

El contenido total de compuestos fenólicos para el extracto de *Capraria biflora* L. se muestra a continuación en la **tabla 9**.

Tabla 9. Cuantificación del contenido de fenoles totales (mg EAG/g ES)

Compuestos fenólicos	Extracto acuoso
Contenido total (mg EAG/g ES)	12.7 mg EAG/g ES

Como resultado se obtuvo que el contenido total de compuestos fenólicos obtenido para el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora L.* fue de 12.7 mg de ácido gálico equivalentes/g de extracto seco. Este resultado cuantitativo corrobora la presencia de fenoles en el extracto, la cual se había determinado en el tamizaje de una manera cualitativa, justificando entonces su actividad gastroprotectora. Este valor obtenido es específico para cada extracto, ya que toda planta responde a variaciones ambientales, como las causadas por la época del año, la fertilización y los daños ocasionados por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica, tal como los compuestos fenólicos (39, 90). Otros factores que pueden influir son el proceso de floración, lo cual demanda una alta disponibilidad de estos metabolitos para apoyar dicho proceso y la humedad la cual depende fundamentalmente del régimen de precipitaciones. El agua es la encargada de transportar los principios solubles que se encuentran en el suelo e interviene en la síntesis de metabolitos primarios que son el punto de partida en la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellos, los compuestos fenólicos (84).

Existen valores reportados en la literatura de la cuantificación de fenoles totales para esta especie en cuestión; evidenciando una no correspondencia de los valores obtenidos con los ya reportados por otras bibliografías (17); por lo que se recomienda realizar una estandarización de contenido de fenoles totales para el extracto acuoso de las hojas de la especie en cuestión.

4.5.2 Contenido de flavonoides totales

Los flavonoides son distribuidos extensamente en los productos derivados de origen natural y tienen demostrada su actividad antioxidante, antiinflamatoria y gastroprotectora. Además, muchos estudios han reportado que un incremento del contenido de flavonoides en la dieta podría reducir ciertas enfermedades.

Resultados y Discusión

El contenido total de flavonoides para el extracto acuoso se calculó empleando la curva de calibración de quercetina (**Figura 9**). Los resultados se expresaron como μg equivalentes de quercetina por mg de extracto seco (μg QE/mg) (**Tabla 10**).

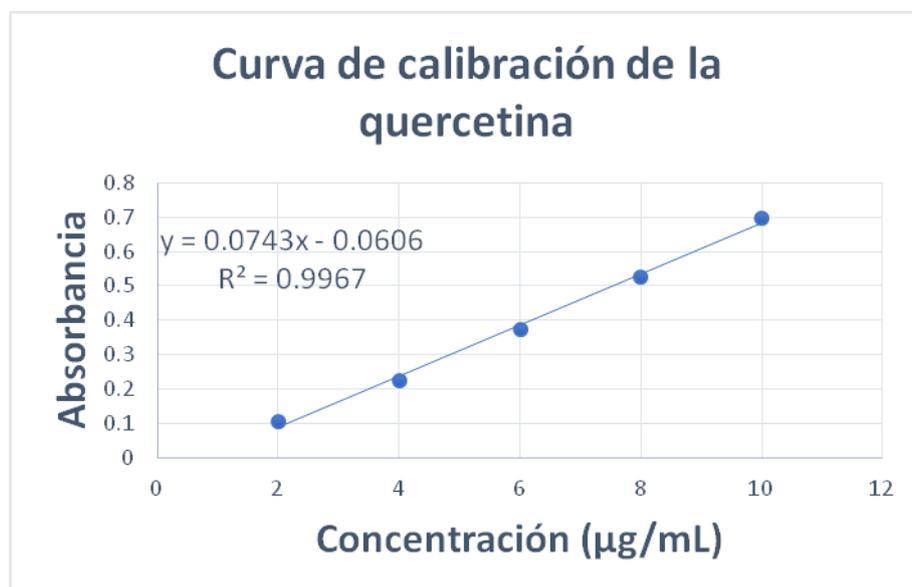


Figura 9. Curva de calibración de la quercetina

Los resultados obtenidos en esta determinación nos permiten confirmar la presencia de flavonoides en el extracto acuoso de *Capraria biflora* L., identificados previamente mediante el tamizaje fitoquímico.

Tabla 10. Contenido de flavonoides totales del extracto acuoso de *Capraria biflora* L.

Flavonoides	Extracto acuoso
Contenido total ($\mu\text{gQE/mg}$)	6.84 ($\mu\text{gQE/mg}$)

Dentro de la composición química de esta especie los flavonoides son de los compuestos fenólicos más importantes, porque se les atribuye una gran diversidad de acciones farmacológicas, por ejemplo, antiinflamatoria, analgésica y gastroprotectora (17).

Estos valores corresponden con los resultados obtenidos en el contenido fenólico e igualmente debe tener relación directa con las actividades farmacológicas demostradas de los mismos.

Resultados y Discusión

Al comparar los valores obtenidos con el contenido de flavonoides presente en otros extractos de plantas medicinales reportados en la literatura (91, 92) (ver **Tabla 11**), se observa que el valor de flavonoides obtenidos para los extractos acuosos de las hojas de *Capraria biflora* L. resultó ser bajo.

Tabla 11. Contenido total de flavonoides en el extracto de algunas plantas medicinales publicado en la literatura.

Nombre de planta	Contenido total de flavonoides publicados (mg/g)
L. coronopifolia	16,3
L. multifida	12,3
L.stoechas	10,1
Tetrastigma	72,1
V. agnus castus fruta	10,8
T. sonbolii	37.1

El valor obtenido de flavonoides totales del extracto acuoso de las hojas de la especie *Capraria biflora* L. no corresponde con el valor ya reportado en investigaciones anteriores (17), lo cual puede estar relacionado con la época y la hora del día de la recolección, el entorno de cultivo, las condiciones climatológicas, además del tipo de secado y/o conservación de la droga. También puede afectar los resultados el estado vegetativo de la planta que puede traer como consecuencia el aumento o disminución de la concentración de los metabolitos. La solubilidad en el solvente empleado y la interferencia de otros metabolitos también pueden afectar de forma significativa la composición del extracto (15). Por lo anterior se recomienda realizar una estandarización del contenido de flavonoides para el extracto acuoso de las hojas de la especie en cuestión.

4.6 Jarabes del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. y sus componentes

Las formas farmacéuticas líquidas son los productos más demandados y mejor aceptados por la población en general, específicamente los jarabes medicamentosos a base de productos naturales: manzanilla, sábila, miel de abejas y propóleo. Estos son elaborados en los laboratorios de producción local de cada provincia y muchas veces son indicados en mayor medida que las formas

Resultados y Discusión

farmacéuticas sólidas, por sus ventajas en cuanto a la no afectación de la mucosa gástrica. Casi la mayoría de estos, poseen componentes comunes y en cantidades similares, todo en base a prevenir incompatibilidades, interacciones y lograr un mayor ahorro económico con la menor cantidad de componentes posibles.

En el presente trabajo se escogió realizar un jarabe del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L. con posible acción gastroprotectora, para ello se tomó como base los jarabes que se elaboran en los laboratorios de producción local, los cuales se presentan en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (54), teniendo en cuenta los componentes principales de cada formulación y solo en las cantidades necesarias.

- **Preservo**

En las formas farmacéuticas líquidas no estériles con elevado contenido de agua se requiere de preservos, para evitar su contaminación microbiológica. El empleado en estas formulaciones es el benzoato de sodio. Estudios recientes de toxicidad, por diferentes vías de administración, hacen que sea considerado por el CIR (de sus siglas en inglés: Cosmetic Ingredients Review) como un ingrediente seguro en concentraciones de hasta el 5 %. Es muy soluble en agua (1 g se disuelve en 1.8 mL de agua), es un secuestrante de radicales hidróxidos y se emplea en concentraciones entre 0.1 % y 0.5 % en jarabes. La mayor limitante en su empleo está dada porque es efectivo en un intervalo de pH estrecho. Posee propiedades bacteriostáticas y antifúngicas y su eficacia conservante es mejor en soluciones ácidas (pH 2-5) (58). Sin embargo, los pH de formulaciones originales del laboratorio de producción local con extractos acuosos poseen un valor alrededor de 5.69, ligeramente superior al requerido para la efectividad del preservo. Estas razones justifican que se mantenga el benzoato de sodio como preservo en los jarabes medicamentosos que se elaboran.

- **Sacarosa**

El azúcar ejerce una acción conservante, edulcorante y viscosante. La alta concentración de azúcar le confiere al jarabe una elevada presión osmótica que impide el desarrollo fúngico y bacteriano. Las soluciones azucaradas sustraen de los microorganismos, por ósmosis, el agua que éstos necesitan para su desarrollo.

Resultados y Discusión

Desde el punto de vista de la conservabilidad, las preparaciones altamente concentradas son las más favorables (93).

Si el jarabe tuviera una concentración de azúcar igual a la de saturación, no necesitaría conservantes, porque estaría bien protegido frente al crecimiento de microorganismos. Sin embargo, un pequeño descenso de temperatura durante el almacenamiento podría producir en estos jarabes la separación de cierta cantidad de azúcar. Esta cantidad sería igual a la que existe en exceso con respecto a su solubilidad a la temperatura de almacenamiento. Por este motivo, la mayoría de los jarabes se formulan con una concentración de azúcar cercana, pero inferior a la de saturación, y se añaden agentes conservantes que previenen la proliferación de microorganismos y aseguran su estabilidad durante el período de almacenamiento y utilización (47).

La gran cantidad de azúcar presente en los jarabes proporciona una elevada viscosidad que hace que se mantenga el sabor dulce en la boca durante un tiempo prolongado (47).

4.7 Valoración de los jarabes del extracto acuoso de *Capraria biflora* L.

Como ya se mencionó en la revisión bibliográfica el extracto acuoso obtenido de esta planta en Cuba posee actividad analgésica, antiinflamatoria y gastroprotectora. Sin embargo, no existe una forma farmacéutica líquida que permita su administración oral. Una de las formas de dosificación más empleadas en nuestro país para la formulación de extractos líquidos, sobre todo el acuoso, son los jarabes, los cuales son muy adecuados para dosificar tanto a pacientes pediátricos como a geriátricos. Esta forma farmacéutica presenta innumerables ventajas pues al tener elevado contenido de sacarosa muy probablemente no sea necesario incluir un saborizante extra a no ser que el sabor del extracto sea muy desagradable y al tener menos componentes, existe una menor posibilidad de incompatibilidades y de interacciones y es más económico.

Hay diferentes formas de obtener jarabes, por lo general estas son formas farmacéuticas dulces y viscosas que pueden contener alcohol, no obstante, la viscosidad se puede lograr generalmente con un elevado contenido de edulcorante que generalmente es la sacarosa, aunque también puede ser con un hidrocoloide y

un edulcorante sintético que sería muy adecuado para personas que no puedan ingerir grandes cantidades de sacarosa, pero el más tradicional y económicamente favorable son los jarabes simples.

Es bien conocido que la influencia de los componentes de la formulación y el método de preparación influye en la calidad del producto final obtenido por eso en nuestro estudio, aunque se parte de una formulación básica con sacarosa, se deciden variar las concentraciones de esta y la elección de la misma es debido a que es la responsable de dos de las funciones principales (viscozante y edulcorante).

4.8 Evaluación de los jarabes de *Capraria biflora* L. obtenidas mediante diseño factorial 2³.

4.8.1. Calidad tecnológica de los jarabes

La evaluación de la calidad tecnológica de los jarabes a tiempo cero de elaborados se realizó mediante ensayos cualitativos y cuantitativos, empleados comúnmente en este tipo de forma farmacéutica.

4.8.1.1. Densidad relativa, índice de refracción, y pH

Como variables dependientes (respuesta) del diseño factorial 2³ se evaluaron la densidad relativa, el índice de refracción y el pH, por ser parámetros cuantitativos que describen la calidad tecnológica de un jarabe.

- **Densidad relativa**

La densidad relativa es una propiedad que se emplea comúnmente en el control de la calidad de preparados farmacéuticos líquidos, como son los jarabes y da una comparación de la densidad de una sustancia con la densidad de otra que se toma como referencia. Ambas densidades se expresan en las mismas unidades y en iguales condiciones de temperatura y presión. La densidad relativa es adimensional (sin unidades), ya que queda definida como el cociente de dos densidades. Se emplea frecuentemente dentro de las especificaciones de calidad de productos de este tipo (55, 63). En este caso particular, la densidad de los jarabes es elevada, lo

Resultados y Discusión

cual puede estar dado por la presencia de sacarosa en altas concentraciones. Los resultados obtenidos para esta variable respuesta se muestran en la **tabla 12**.

Tabla 12. Densidad relativa, índice de refracción y pH de las formulaciones obtenidas en el diseño factorial 2³.

Formulación	Factores independientes			Variables respuestas ($\bar{X} \pm DE$)		
	F1	F2	F3	Densidad relativa	Índice de refracción	pH
1	-	-	-	1.2134 ± 0.00	1.34805 ± 0.00	6.16 ± 0.01
2	+	+	+	1.27165 ± 0.00	1.348 ± 0.00	5.77 ± 0.04
3	-	+	+	1.31065 ± 0.00	1.3355 ± 0.00	5.65 ± 0.04
4	-	-	+	1.22995 ± 0.00	1.34615 ± 0.00	6.09 ± 0.01
5	+	+	-	1.27025 ± 0.00	1.34915 ± 0.00	5.92 ± 0.03
6	+	-	-	1.1934 ± 0.00	1.346 ± 0.00	5.96 ± 0.01
7	-	+	-	1.2963 ± 0.00	1.3395 ± 0.00	6.07 ± 0.01
8	+	-	+	1.2087 ± 0.00	1.3424 ± 0.00	5.90 ± 0.01

F1: Concentración del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L.

F2: Concentración de sacarosa

F3: Temperatura

DE: Desviación estándar

Las 8 formulaciones evaluadas muestran un valor de densidad adecuado (valores que varían entre 1.2087 y 1.31065) en comparación con los jarabes de extractos acuosos descritos en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (54) por el cual se rigen los laboratorios de producción local de nuestro país encontrándose éstos valores de densidad relativa entre 1.2300 – 1.3200. Es evidente que los jarabes con mayores valores de densidad son los que poseen mayor contenido de sacarosa (Formulaciones 2, 3, 5 y 7), lo cual se observa en la **tabla 12**. La desviación estándar, relativamente baja, que se observa en estos resultados es señal de que el método empleado para determinar la densidad es preciso, por lo cual no va a existir la influencia de mínimos errores por la manipulación del analista.

El análisis de varianza de estos resultados (**Anexo 1**), muestra que todos los factores independientes influyen de manera significativa sobre la variable respuesta densidad.

Resultados y Discusión

En las **figuras 10 y 11** se evidencia una disminución significativa de la densidad, debido fundamentalmente a la concentración de sacarosa y a la temperatura, sin depender de la concentración a la cual se encuentre el extracto. Sin embargo, los valores de este parámetro para las formulaciones en estudio (**tabla 12**) presentan pocas variaciones (entre 1.1934 y 1.31065), valores similares muestran jarabes medicinales obtenidos a partir de extractos vegetales que aparecen reportados en la literatura (54), por tanto, se consideró que esto no sea una limitación para la administración de los jarabes a los pacientes.

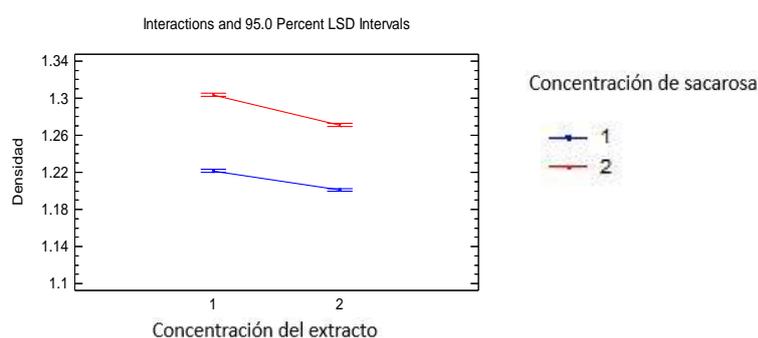


Figura 10. Interacción entre la concentración del extracto y la concentración de sacarosa con la variable densidad.

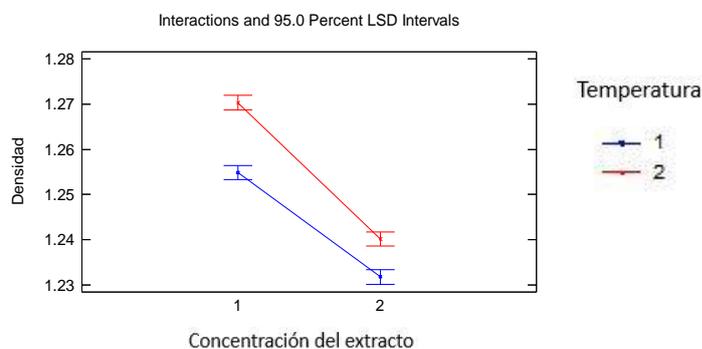


Figura 11. Interacción entre la concentración del extracto y la temperatura con la variable densidad.

- **Índice de refracción**

La refractrometría es una técnica analítica que consiste en la medida del índice de refracción de un líquido con el objeto de investigar su composición, si se trata de

Resultados y Discusión

una dilución, de su pureza o si es un compuesto único. El índice de refracción se mide en un refractómetro, en él se compara el ángulo de incidencia con el ángulo de refracción de la luz a una longitud de onda específica. La refracción de la luz es un fenómeno de desvío que experimenta el haz incidente al atravesar una solución ocasionada por la diferente naturaleza de aire y la solución sobre la que incide. La ley de Snell es una fórmula para calcular el ángulo de refracción de la luz al atravesar la superficie de separación entre dos medios de índice de refracción distinto, dice que el producto del índice de refracción por el seno del ángulo de incidencia es constante para cualquier rayo de luz incidiendo sobre la superficie de separación de dos medios. Esta relación varía dependiendo de características como concentración de las sustancias disueltas, el tipo de solventes, entre otras. Se puede calcular la concentración de una solución mediante su índice de refracción. El índice de refracción (n_r) de una sustancia o medio transparente es la relación en la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en la sustancia o medio transparente (63, 79).

El índice de refracción tiene como objetivo una herramienta cualitativa al identificar sustancias y otra cuantitativa, al determinar la concentración de sacarosa en una muestra problema. La concentración de azúcar se determina frecuentemente mediante la medición del índice de refracción, un método rápido y fiable que utiliza el efecto de la refracción mientras la luz viaja de un medio a otro. El índice de refracción guarda correlación con la concentración de azúcar y, por lo tanto, puede utilizarse fácilmente para esta medición (94).

Dentro de las variables que afectan la medición del índice de refracción se encuentra la temperatura, la cual se puede controlar experimentalmente. Cuando varía la temperatura en un medio, también varía su densidad y esto influye en el índice de refracción (55, 63, 79).

El índice de refracción es un parámetro que comúnmente se emplea en el control de la calidad tecnológica de los jarabes como forma farmacéutica. Según se puede observar en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos (54) los valores del índice de refracción de los jarabes varían desde 1.4326 - 1.44096. Sin embargo, en los resultados obtenidos para este parámetro en el presente estudio se puede evidenciar una pequeña disminución de estos valores encontrándose entre 1.335 y

Resultados y Discusión

1.3492, pero esta pequeña diferencia no significa que los valores obtenidos estén errados totalmente, sino que puede ser debido a variaciones en las cantidades de los componentes o a la temperatura de trabajo.

Los valores de este parámetro para las formulaciones en estudio (**Tabla 12**) presentan pocas variaciones, independientemente de las variaciones en las concentraciones del extracto, de sacarosa y de la temperatura de elaboración. Sin embargo, en la tabla ANOVA obtenida para esta propiedad (**Anexo 2**), se observa que todos los efectos principales presentan diferencias significativas, así como la interacción entre las concentraciones del extracto y de sacarosa.

La **figura 12** muestra la influencia de la concentración del extracto con la de sacarosa. Cuando la concentración del extracto se encuentra en un nivel bajo los valores del índice de refracción disminuyen de forma significativa al pasar la concentración de sacarosa de un nivel bajo a uno alto y cuando la concentración del extracto se encuentra en un nivel alto disminuyen los valores del índice de refracción al pasar la concentración de sacarosa de un nivel alto a uno bajo.

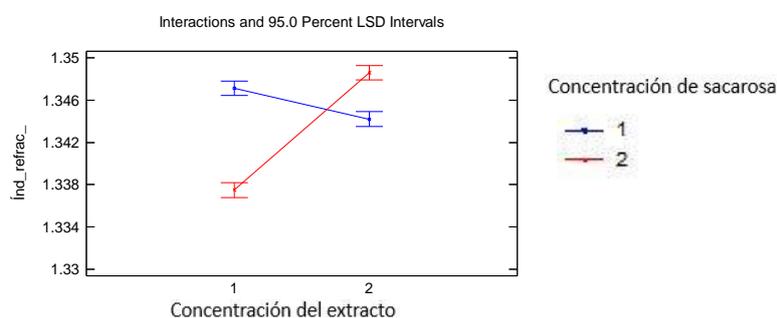


Figura 12. Interacción entre concentración del extracto y la concentración de sacarosa con la variable índice de refracción.

La **figura 13** muestra el efecto principal que tiene la temperatura en relación a los valores del índice de refracción, en este caso específicamente a medida que la temperatura pasa de un nivel bajo a uno alto los valores del índice de refracción disminuyen significativamente.

Resultados y Discusión

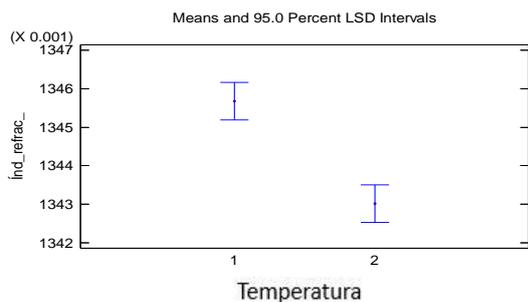


Figura 13. Efecto principal de la temperatura de la variable índice de refracción.

Todas estas variaciones expuestas anteriormente evidencian que los principales factores que influyen sobre la variable índice de refracción van a ser la temperatura y la concentración de la sacarosa, independientemente de la concentración del extracto. A pesar de estos resultados estadísticos se puede concluir que todas las formulaciones poseen valores apropiados para jarabes (54).

- **pH**

Los valores de pH de los jarabes en estudio (**Tabla 12**) toman valores entre 5.65 y 6.16, que satisfacen el intervalo propuesto para los jarabes obtenidos de plantas medicinales que son elaborados en nuestro país y que se encuentran reportados en la literatura consultada (54), encontrándose entre 5.46 y 6.0.

En la tabla ANOVA (**Anexo 3**), se observa que la interacción entre los factores concentración de sacarosa y la temperatura es significativa. La **figura 14**, muestra la influencia de esta interacción concentración de sacarosa/temperatura sobre los valores de la variable pH, mostrando una significativa disminución de los valores de pH cuando la concentración de sacarosa se encuentra en un nivel alto, a medida que la temperatura cambia de un nivel bajo a uno alto, y cuando la concentración de sacarosa se encuentra en un nivel bajo, los valores de pH disminuyen, pero no de forma significativa, manteniéndose ambos valores en un nivel alto cercanos a 6.

Resultados y Discusión

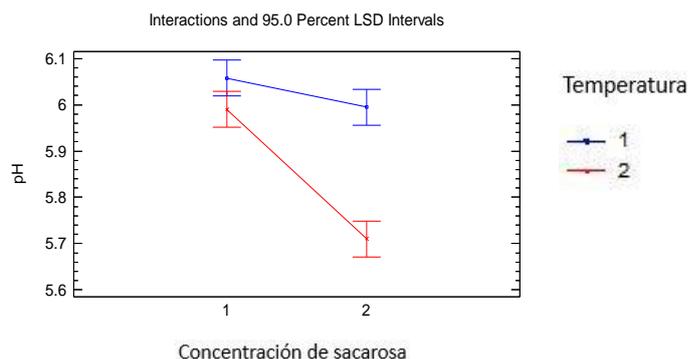


Figura 14. Interacción entre la concentración de sacarosa y la temperatura de la variable pH.

Cuando la concentración del extracto se encuentra a un nivel bajo, los niveles de pH disminuyen significativamente, a medida que la concentración de sacarosa cambia de un nivel bajo a un nivel alto, y cuando la concentración del extracto se encuentra a un nivel alto, los niveles de pH también disminuyen, pero no de forma significativa. Lo anterior se puede observar en la **figura 15**.

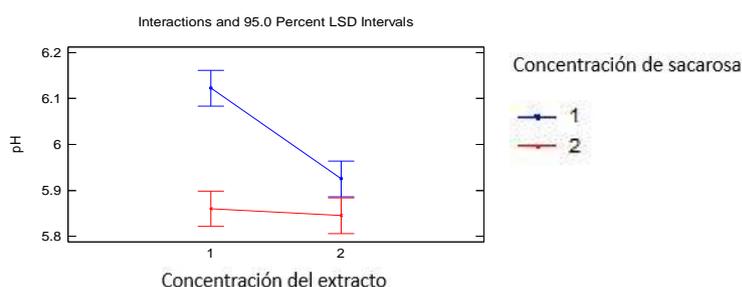


Figura 15. Interacción entre concentración del extracto y la concentración de sacarosa de la variable pH.

Los resultados de los valores de pH están influenciados sobre todo por el contenido de sacarosa que estos presentan, pues se conoce que esta tiene un pH ligeramente ácido entre 4 y 5, comportándose como un ácido débil; por lo cual tiende a bajar los niveles de pH en la formulación; es decir a mayor contenido de sacarosa más bajos son los valores del pH. Conociendo esta característica de la sacarosa, cuando se aumenta la temperatura, ocurre una ligera inversión de la misma, que da como resultado fructosa y dextrosa, las cuales aportan también pH bajos. No obstante, si se considera la eficacia del preservo, son más convenientes aquellas formulaciones que tengan pH más bajo. Por tanto, los factores fundamentales de los cuales depende la variable pH son la concentración de sacarosa y la temperatura (95).

Resultados y Discusión

En los **anexos 5, 6 y 7** se muestran las representaciones de los residuales para la densidad relativa, el índice de refracción y el pH. En las mismas no se evidencia ninguna observación anómala, lo cual es un indicador de la validez de los análisis estadísticos.

Un análisis integral de la densidad, el índice de refracción y el pH de las formulaciones nos permite afirmar que todas poseen propiedades tecnológicas satisfactorias en cuanto a estas propiedades.

De manera general, en todas las variables analizadas existen diferencias significativas; sin embargo, todos poseen valores permisibles dentro de los rangos establecidos para su administración oral.

4.8.1.2 Características organolépticas de los jarabes

Todas las formulaciones poseen **color** oscuro característico del extracto, aunque las que poseen un alto nivel de concentración del extracto son más oscuras que las que tienen un nivel bajo de esta concentración; tienen un **olor** agradable y característico también, un **sabor** dulce brindando una buena sensación al paladar, evidenciando que aquellas formulaciones que tienen un nivel alto de sacarosa presentan un mayor sabor dulce que las del nivel bajo, y una **apariencia viscosa** sin la presencia de precipitados ni de partículas en suspensión. Ver **anexo 8**.

4.8.1.3 Tamizaje fitoquímico de los jarabes

Se realizó el tamizaje fitoquímico a cada una de las formulaciones elaboradas, en base a los ensayos de Shinoda y cloruro férrico, pues estos son los que evidencian la presencia de flavonoides y de fenoles y/o taninos, los cuales serían los responsables de la actividad gastroprotectora que pudieran presentar los jarabes formulados; dando resultados positivos en todos los casos, lo cual corrobora una vez más la presencia de estos metabolitos.

4.9 Estudio de estabilidad física de los jarabes

Transcurridos 30 días, se evaluó la estabilidad física de los jarabes formulados, mediante la realización de los mismos ensayos utilizados en el control de la calidad de las formulaciones, evidenciando importantes diferencias significativas en relación

Resultados y Discusión

a los valores de pH, disminuyendo considerablemente en aquellas formulaciones donde la concentración de sacarosa se encuentra en un nivel bajo (65 %).

- **Densidad relativa e índice de refracción**

En el análisis de la tabla ANOVA de las variables densidad relativa e índice de refracción, se puede observar cómo ningún valor de los p-values, son significativos en relación a los resultados obtenidos para el control de la calidad de los jarabes a tiempo cero; es decir no difieren entre tiempo cero y a los 30 días.

- **pH**

En el análisis de la tabla ANOVA de la variable pH, se puede observar como no todos los p-values, son significativos, es decir solamente los efectos principales de la concentración de sacarosa y la temperatura son significativos (ver **anexo 4**), junto a la interacción de los mismos.

En la **figura 16** se puede observar que cuando la concentración de sacarosa se encuentra en un nivel bajo los valores de pH son significativamente menores que a tiempo cero (**figura 14**), lo cual nos permite decir que estas formulaciones no son estables desde el punto de vista físico a los 30 días de elaboradas. Teniendo en cuenta que pasado este tiempo se apreció en dichas formulaciones desprendimiento de gases y aspecto no transparente, nos hace pensar en una posible contaminación microbiana del jarabe, específicamente una posible fermentación alcohólica que, al ocurrir, según se reporta en la bibliografía, tiende a haber disminución significativa del pH (96).

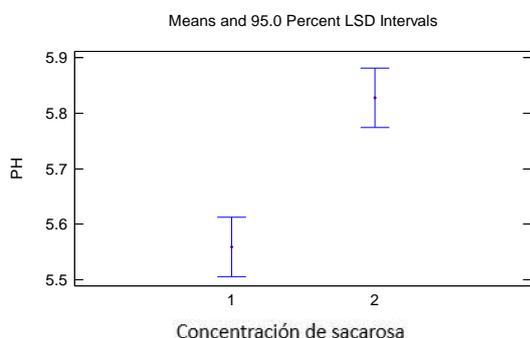


Figura 16. Efecto de la concentración de sacarosa en el pH a los 30 días de elaboradas las formulaciones.

Resultados y Discusión

En el **anexo 8** se puede observar la representación de los residuales para los valores de pH en el estudio de estabilidad. En la misma no se evidencia ninguna observación anómala, lo cual es un indicador de la validez de los análisis estadísticos.

CONCLUSIONES

- 1) La caracterización químico-física de los extractos acuosos de las hojas de *Capraria biflora* L. muestran resultados similares a los de otros extractos acuosos de administración oral reportados en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos.
- 2) Se corrobora cualitativamente la presencia de saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, fenoles y/o taninos y alcaloides en los extractos acuosos de las hojas de *Capraria biflora* L.
- 3) La concentración de fenoles totales resultó ser de 12.7 mg EAG/g ES y la de flavonoides de 6.84 (µgQE/mg), lo que justifica la actividad gastroprotectora del extracto acuoso demostrado en estudios anteriores.
- 4) Los componentes y tecnología de elaboración de los jarabes se propusieron sobre la base de formulaciones en esta forma farmacéutica reportadas en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos.
- 5) Al analizar los resultados del diseño factorial en el control de la calidad tecnológica de los jarabes, se debe destacar que a altas concentraciones de sacarosa y altas temperaturas de elaboración se observa una disminución significativa del pH, aunque el mismo se encuentra entre valores que permiten la utilización de las formulaciones por vía oral.
- 6) Las formulaciones donde se emplea la sacarosa a un nivel bajo (65 %) son inestables físicamente a los 30 días de elaboradas, lo que se evidencia por una disminución significativa del pH, posiblemente debido a una fermentación alcohólica de las mismas.
- 7) Teniendo en cuenta la calidad tecnológica y estabilidad física demostradas se propone para continuar su estudio las formulaciones 5 y 7, las cuales presentan 20 y 10 % de extracto acuoso de *Capraria biflora* L. respectivamente, 85 % de sacarosa y se elaboran a temperatura ambiente.

RECOMENDACIONES

- 1) Estandarizar la cuantificación de fenoles totales y flavonoides en el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L.
- 2) Aumentar el número de muestras del extracto acuoso (a un total de 25) a caracterizar para su estandarización definitiva.
- 3) Evaluar la calidad y estabilidad microbiológica de los jarabes propuestos.
- 4) Evaluar la actividad gastroprotectora de los jarabes propuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez Y, Vera L, Moreno K, Montilla J, Guevara C, González R. Conocimiento sobre el uso del *Plantago major* como terapia alternativa en lesiones inflamatorias bucales. *Revista Venezolana de Investigación Odontológica*,(2). 2014;2:106-15.
2. Roig y Mesa JT. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba: Ciencia y Técnica*; 1988.
3. Sánchez-González C, Debesa-García F, Yañez-Vega R, López-Romo A. Enfoque de la Autoridad Reguladora Cubana sobre la reglamentación para la Medicina Natural y Tradicional. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2014;19(3):267-79.
4. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013;1830(6):3670-95.
5. Gonzalo R. Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kunth, *L. guatemalensis* Mez y *L. neesiana* (Schauer) Hemsl.) [Tesis de Diploma]: Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala; 2013.
6. Muñoz-Schick M, Morales V. Complemento y correcciones al "Catálogo de plantas vasculares del Cono Sur", para la Flora de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*. 2013;62:167-201.
7. Iwu MM. *Handbook of African medicinal plants*: CRC press; 2014.
8. Martínez Ramos CA, Pérez Reyes AJ, Huete R, Smith D. Evaluación en vivo de la actividad analgésica y antiinflamatoria y formulación de un gel de extracto de *Capraria biflora* (perulera) en el periodo noviembre-mayo 2014 2014.
9. Mena Linares Y. Evaluación farmacognóstica, toxicológica y gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh [Tesis de Maestría]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2015.
10. Singh G. *Plant Systematics.: An Integrated Approach*. 3 ed: CRC Press; 2016.
11. Vivot EP, Sánchez C, Cacik F, Sequin C. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, docencia y tecnología*. 2012;23(45).

Referencias Bibliográficas

12. Kunle OF, Egharevba HO, Ahmadu PO. Standardization of herbal medicines-A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2012;4(3):101-12.
13. Organization WH. Standard operating procedures for coordinating public health event preparedness and response in the WHO African Region. 2014.
14. Canto Darias M. Evaluación de la toxicidad por dosis repetida del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L [Tesis de Diploma]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2013.
15. Mastrapa Rodriguez T. Actividad gastroprotectora de la fracción butanólica obtenida de hojas de *Capraria biflora* L [Tesis de Diploma]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química-Farmacología; 2017.
16. Vicet M. Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L [Tesis Doctoral]: Universidad de Ciencias Médicas de La Habana 2009.
17. Valido A. Evaluación preclínica de la actividad antiinflamatoria y gastroprotectora del extracto acuoso a partir de las hojas de *Capraria biflora* L: Tesis de Maestría, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas; 2011.
18. Espitia Palencia LP, Sarmiento Bernal DC. Caracterización de los Productos Forestales no Maderables del Bosque Seco Tropical Asociado a las Comunidades del Caribe Colombiano. 2016.
19. Guadarrama P, Salinas-Peba L, Chiappa-Carrara X, Ramos-Zapata JA. Florística, composición y estructura de las comunidades vegetales de la porción occidental de la Reserva Estatal Ciénegas y Manglares de la Costa Norte de Yucatán. *Revista mexicana de biodiversidad*. 2018;89(3):784-805.
20. Rojas LC, Uribe YH, Martínez NS, Niño DR. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia forestal*. 2009;12(1):161-70.
21. Torres LO, Pérez MET, Contreras AA. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico: Edicions Universitat Barcelona; 2005.
22. Souza LGdS, Almeida MCS, Monte FJQ, Santiago GMP, Braz-Filho R, Lemos TLG, et al. Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil. *Química Nova*. 2012;35(11):2258-62.

Referencias Bibliográficas

23. Souza VC, Giulietti AM. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisas, Botânica*. 2009;60:7-288.
24. Valdivia YC. Cuantificación de los flavonoides presentes en la *Capraria biflora* L. Estudio de micropropagación. 2010.
25. Zuloaga F, Morrone O, Belgrano M. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Versión online. 2016.
26. Williams JK. A revision of *Capraria* (Scrophulariaceae). *Lundellia*. 2004;2004(7):53-79.
27. Roig y Mesa JT. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos: Editorial Nacional de Cuba; 1965.
28. Thorne RF. Classification and geography of the flowering plants. *The botanical review*. 1992;58(3):225-327.
29. Rodriguez R, Marticorena C, Alarcón D, Baeza C, Cavieres L, Finot VL, et al. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica*. 2018;75(1):1-430.
30. Tapia B, Tacán M, Monteros A, Brito Grandes B. Estudio de la biodiversidad de plantas medicinales en la provincia de Loja y Cotopaxi. 2013.
31. Mendonça de Aquino T, Sampaio de Andrade Lima C, Albuquerque UPd, Amorim ELC. *Capraria biflora* L.(Scrophulariaceae): uma revisão. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2006;25.
32. Wisintainer GG, Simoes ER, Lemos TL, Moura S, Souza LG, Fonseca AM, et al. Biflorin: an o-naphthoquinone of clinical significance. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2014;86(4):1907-14.
33. Ideker J. *Capraria mexicana* (Scrophulariaceae), an endangered addition to the United States flora. *SIDA, Contributions to Botany*. 1996;17(2):523-6.
34. Vasconcellos MC, Bezerra DP, Fonseca AM, Pereira MRP, Lemos TLG, Pessoa ODL, et al. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(8):1416-21.
35. Morais N, Nogueira C, López M, Vasconcelos N, SA M. Inorganic analytical study of medicinal plants. *An Assoc Bras Quim*. 1995;44(4):14-9.
36. Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001;141.

Referencias Bibliográficas

37. Giergielewicz-Możajska H, Dąbrowski Ł, Namieśnik J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples—some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2001;31(3):149-65.
38. Commission BP, Council GM, Commission GBM. *British pharmacopoeia*: Her Majesty's Stationery Office; 2004.
39. Murti Y, Sharma S. Flavonoid: a pharmacologically significant scaffold. 2017.
40. David AVA, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*. 2016;10(20):84.
41. Julkunen-Tiitto R, Nenadis N, Neugart S, Robson M, Agati G, Vepsäläinen J, et al. Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. *Phytochemistry reviews*. 2015;14(2):273-97.
42. Liang X, Zhang Y, Chen W, Cai P, Zhang S, Chen X, et al. High-speed counter-current chromatography coupled online to high performance liquid chromatography–diode array detector–mass spectrometry for purification, analysis and identification of target compounds from natural products. *Journal of Chromatography A*. 2015;1385:69-76.
43. Yan M, Chen M, Zhou F, Cai D, Bai H, Wang P, et al. Separation and analysis of flavonoid chemical constituents in flowers of *Juglans regia* L. by ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2019;164:734-41.
44. Salamanca Grosso G, Correa Carvajal IL, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*. 2007;25(2):95-102.
45. Vásquez MRS. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*. 2015;6(1):33-43.
46. Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of chemistry*. 2017;10:S1409-S21.
47. Serrano AJB, Cruz NSÁ. *Tecnología farmacéutica*: Editorial Club Universitario; 2012.
48. García-Barrantes PM, Badilla B. Anti-ulcerogenic properties of *Quassia amara* L.(Simaroubaceae) standardized extracts in rodent models. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;134(3):904-10.

Referencias Bibliográficas

49. Brusse B, Wenning R. Standardization Guidelines for IST Research Projects Interfacing With ICT Standards Organizations. Retrieved; 2007.
50. Peña Núñez BdR, Morejón Rodríguez Z, García Hernández AI, Morón Rodríguez F. Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2008;13(4):0-.
51. Murphy CN, Yates J. The International Organization for Standardization (ISO): global governance through voluntary consensus: Routledge; 2009.
52. Ortiz ÓCG. Sistema de gestión de calidad: Teoría y práctica bajo la norma ISO 2015: Ecoe Ediciones; 2016.
53. Gutiérrez Pulido H, Salazar V. Control Estadístico de Calidad y Seis SIGMA. 2. McGraw-Hill Educación; 2017.
54. Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos, (2010).
55. Nevado BS, Pérez MEH. Formas farmacéuticas líquidas orales (I). *Panorama actual del medicamento*. 2016;40(394):598-602.
56. Jumbo D, Arturo A. Diseño preliminar de un jarabe con actividad antioxidante a partir de un principio activo de origen natural. 2018.
57. Periodo de validez y caducidad de formas farmacéuticas no estériles orales líquidas. Madrid2015.
58. Rowe RC, Sheskey P, Quinn M. Handbook of pharmaceutical excipients: Libros Digitales-Pharmaceutical Press; 2009.
59. Pérez MEH, Nevado BS. Formas farmacéuticas líquidas orales (II): excipientes. *Panorama actual del medicamento*. 2016;40(396):842-8.
60. Pacheco Andrade KM. Diseño de una formulación farmacéutica líquida de minoxidil de administración oral pediátrica para el tratamiento de hipertensión arterial. 2017.
61. Rengel M, Carlos J. Diseño de una forma farmacéutica líquida para administración por vía oral. 2017.
62. Sánchez Salazar LM. Elaboración de jarabe de caña fístula para curar la tos y su comercialización a nivel nacional: Quito: USFQ, 2015.; 2015.
63. Daste Ramírez CE. Control de Calidad en la Industria Farmacéutica: PUCE; 2015.
64. Vila Jato JL. Tecnología farmacéutica. 2001.

Referencias Bibliográficas

65. Elliott P, Billingham S, Bi J, Zhang H. Quality by design for biopharmaceuticals: a historical review and guide for implementation. *Pharmaceutical bioprocessing*. 2013;1(1):105-22.
66. Kumar V, Gupta NV. A Review on quality by design approach (QBD) for Pharmaceuticals. *Int J Drug Dev & Res*. 2015;7:52-60.
67. Lawrence XY, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju G, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*. 2014;16(4):771-83.
68. Weissman SA, Anderson NG. Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. *Organic Process Research & Development*. 2014;19(11):1605-33.
69. Bade PD, Kotu SP, Rathore AS. Optimization of a refolding step for a therapeutic fusion protein in the quality by design (QbD) paradigm. *Journal of separation science*. 2012;35(22):3160-9.
70. Patel SR, Dasgupta D. Quality by design approach to protein PEGylation: a review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*. 2017;5(04):085-9.
71. Patel H, Parmar S, Patel B. A comprehensive review on Quality by Design (QbD) in pharmaceuticals. *development*. 2013;4:5.
72. Rathore AS, Pathak M, Godara A. Process development in the QbD paradigm: Role of process integration in process optimization for production of biotherapeutics. *Biotechnology progress*. 2016;32(2):355-62.
73. Pulla Marca HM. Evaluación de la estabilidad fisicoquímica y microbiológica de un extracto acuoso de moringa (*Moringa oleífera* Lam), cosechada en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala: Machala: Universidad Técnica de Machala; 2014.
74. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos: Convenio Andrés Bello; 2000.
75. 312. In: MINSAP, editor. Extractos fluidos y tinturas Métodos de ensayos: Normas Ramales de Salud Pública; 1991.
76. Salmerón LG. Estudio preliminar de la cinética de acumulación de fenoles y flavonoides totales en la especie *Capraria biflora* L. [Tesis de Diploma]. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química-Farmacia 2011.

Referencias Bibliográficas

77. Osorio E. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. 2009.
78. Espinosa J. Normalización, metrología y control de la calidad. La Habana Pueblo y Educación. 1987.
79. Pérez YS. Calidad en la industria farmacéutica. Varela F, editor. La Habana 2013.
80. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 2014;7(9):1776-82.
81. Normas Ramales de Salud Pública # 309, (1992).
82. Lourdes Padró-Rodríguez; MSc. Tania López-González LDNF. Caracterización preliminar de tinturas al 10 % de Bixa orellana L. *Rev Cub Quim*. 2017;29(1).
83. Achman LH, A.; Kaing J. L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. La Habana: Editorial Félix Varela; 2008.
84. Guardado MIL. Contribución al estudio de la cinética de acumulación de fenoles y flavonoides totales en la especie *Capraria biflora* L. [Tesis de Diploma]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química-Farmacología 2012.
85. Miguel FT. Actividad gastroprotectora y toxicidad de una fracción clorofórmica obtenida del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. [Tesis de Diploma]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química-Farmacología 2018.
86. León M. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico de *Plantago lanceolata* (llantén menor) sobre la úlcera gástrica inducida en ratas: Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.; 2016.
87. Tejeda Y. Evaluación farmacognóstica y botánica preliminar de la *Capraria biflora* L [Tesis de Diploma]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 1998.
88. Almeyda Rodas WA. Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.
89. Espinosa-Leal C, Treviño-Neávez JF, Garza-Padrón RA, Verde-Star MJ, Rivas-Morales C, Morales-Rubio ME. Contenido de fenoles totales y actividad anti-radical de extractos metanólicos de la planta silvestre y cultivada in vitro de *Leucophyllum frutescens*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2015;46(3).

Referencias Bibliográficas

90. Banjarnahor SD, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*. 2015;23(4):239-44.
91. Firozy M, Talebpour Z, Sonboli A. Essential oil composition and antioxidant activities of the various extracts of *Tanacetum sonbolii* Mozaff.(Asteraceae) from Iran. *Natural product research*. 2012;26(23):2204-7.
92. Salehi P, Sonboli A, Khaligh P, Mirzajani F. Essential oil composition and antioxidant activity of different extracts of *Nepeta betonicifolia* CA Meyer and *Nepeta saccharata* Bunge. *Natural product research*. 2012;26(8):736-43.
93. Smolinske SC. *CRC handbook of food, drug, and cosmetic excipients*: Routledge; 2018.
94. Ercilla SB, Muñoz CG. *Física general*: Editorial Tébar; 2003.
95. Queneau I JS, Lewandowski B, Fitremann J. *Sucrose Chemistry and Applications of Sucrochemicals*. Elsevier Inc 2018;61:218-60.
96. Ocloo. F AG. Physical, chemical and microbiological changes in alcoholic fermentation of sugar syrup from cassava flour *African Journal of Biotechnology*. 2008;7 (2):164-8.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para densidad (tiempo cero).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:F1	0.00282492	1	0.00282492	716.93	0.0000
B:F2	0.0230129	1	0.0230129	5840.42	0.0000
C:F3	0.00056644	1	0.00056644	143.76	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.00014161	1	0.00014161	35.94	0.0002
AC	0.00005041	1	0.00005041	12.79	0.0060
BC	0.0000648025	1	0.0000648025	16.45	0.0029
RESIDUAL	0.0000354625	9	0.00000394028		
TOTAL (CORRECTED)	0.0266965	15			

Anexo 2. Análisis de varianza para el índice de refracción (tiempo cero).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:F1	0.0000668306	1	0.0000668306	89.90	0.0000
B:F2	0.0000273006	1	0.0000273006	36.72	0.0002
C:F3	0.0000283556	1	0.0000283556	38.14	0.0002
INTERACTIONS					
AB	0.000195301	1	0.000195301	262.71	0.0000
AC	3.30625E-7	1	3.30625E-7	0.44	0.5216

Anexos

BC	3.0625E-8	1	3.0625E-8	0.04	0.8437
RESIDUAL	0.00000669063	9	7.43403E-7		
TOTAL (CORRECTED)	0.000324839	15			

Anexo 3. Análisis de varianza para pH (tiempo cero).

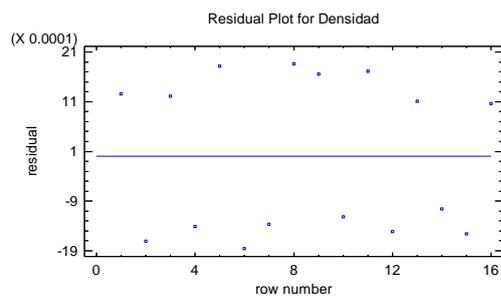
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:F1	0.0451562	1	0.0451562	19.16	0.0018
B:F2	0.117306	1	0.117306	49.79	0.0001
C:F3	0.124256	1	0.124256	52.73	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.0333063	1	0.0333063	14.14	0.0045
AC	0.0203062	1	0.0203062	8.62	0.0166
BC	0.0473063	1	0.0473063	20.08	0.0015
RESIDUAL	0.0212063	9	0.00235625		
TOTAL (CORRECTED)	0.408844	15			

Anexos

Anexo 4. Análisis de varianza para pH (30 días).

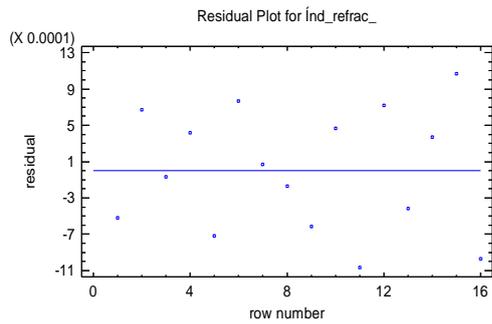
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:F1	0.0315063	1	0.0315063	3.51	0.0938
B:F2	0.288906	1	0.288906	32.18	0.0003
C:F3	0.273006	1	0.273006	30.41	0.0004
INTERACTIONS					
AB	0.00275625	1	0.00275625	0.31	0.5930
AC	0.0430562	1	0.0430562	4.80	0.0563
BC	0.0915063	1	0.0915063	10.19	0.0110
RESIDUAL	0.0808063	9	0.00897847		
TOTAL (CORRECTED)	0.811544	15			

Anexo 5. Ploteo de los residuales del ANOVA (densidad). Tiempo cero

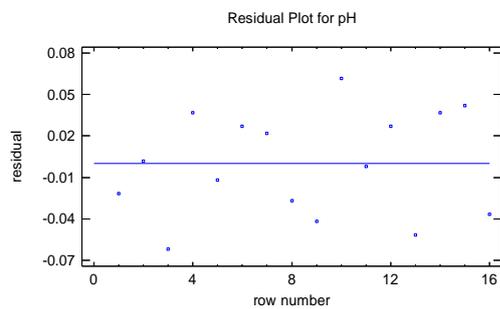


Anexos

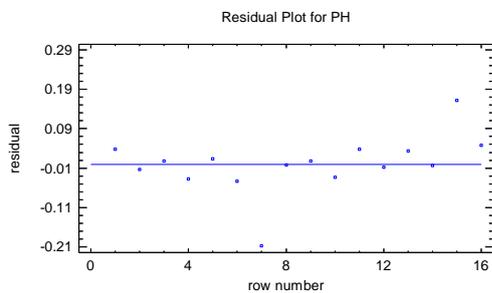
Anexo 6. Ploteo de los residuales del ANOVA (índice de refracción). Tiempo cero



Anexo 7. Ploteo de los residuales del ANOVA (pH). Tiempo cero



Anexo 8. Ploteo de los residuales del ANOVA (pH). 30 días



Anexo 9. Formulación del jarabe terminado.