

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN PARA UN
MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A
BASE DE *Turnera diffusa*.**

Por

MC. AÍDA SALOMÉ PARRA NARANJO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTORADO EN CIENCIAS con
Orientación en Química Biomédica**

Agosto, 2026

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN PARA UN
MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A
BASE DE *Turnera diffusa*.**

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Cecilia Delgado Montemayor

Director de Tesis



Dr. C. Ricardo Salazar Aranda

Co - Director de Tesis



Dra. C. Rocío Castro Ríos

Comisión de Tesis



Dra. C. Rocío Álvarez Román

Comisión de Tesis



Dr. C. Omar Jassiel Portillo Castillo

Comisión de Tesis



Dr. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN PARA UN
MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A
BASE DE *Turnera diffusa*.**

Presentado por:

M.C. Aída Salomé Parra Naranjo

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Cecilia Delgado Montemayor y la codirección del Dr. C. Ricardo Salazar Aranda.

Director



Dra. C. Cecilia Delgado Montemayor

Co-Director



Dr. C. Ricardo Salazar Aranda

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios, por permitirme vida y salud para completar este proyecto. En segundo lugar, quiero agradecer a mi familia, mis padres y mis hermanos, por apoyarme y acompañarme en las decisiones que me llevaron hasta este punto. En tercer lugar, quiero agradecer a mi compañero de vida desde hace más de diez años, Gualberto; porque empezamos este camino juntos, nos topamos con algunos retos, cambiamos el rumbo de nuestros planes, y un sinfín de cosas más. Gracias, porque me has acompañado desde siempre.

Quiero agradecer también a todas las personas que hicieron posible este proyecto de doctorado, la Dra. Noemí Waksman, quien me abrió las puertas de su laboratorio una vez más; gracias por ser ejemplo de fortaleza y resiliencia. Gracias también a mi directora de tesis, la Dra. Cecilia Delgado; a lo largo de este camino ambas fuimos aprendiendo de los errores, gracias por el apoyo, en todos los sentidos, para poder culminar este proyecto. Quiero agradecer también a cada uno de los miembros de mi comisión de tesis, Dr. Ricardo Salazar, Dra. Rocío Castro y Dra. Rocío Álvarez, por cada uno de los comentarios que contribuyeron para tener un trabajo de calidad. Agradezco especialmente también al Dr. Omar Portillo, quien además de fungir como miembro de la comisión, es también un amigo. Gracias por el apoyo a lo largo de este proyecto, aún desde antes de formar parte de la comisión.

Gracias a todo el personal del departamento de química analítica, profesores y compañeros.

Gracias a la SECIHTI por la beca de manutención.

RESUMEN

M.C. Aída Salomé Parra Naranjo

Fecha de graduación: agosto, 2026.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Desarrollo y evaluación de una formulación para un medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora a base de *Turnera diffusa*.

Número de páginas: 153

**Candidata para el grado de Doctorado
en Ciencias con orientación en Química
Biomédica**

Área de estudio: Química analítica

Propósito y método de estudio: *Turnera diffusa* es una planta nativa del noreste de México, cuya actividad hepatoprotectora ha sido demostrada en modelos *in vitro* e *in vivo*; se ha identificado al hepatodamianol (HD), un biomarcador de la planta, como el principal componente responsable de esta actividad. Con base en esto, se desarrolló un extracto estandarizado (EE) rico en HD. Estudios de estabilidad acelerada mostraron que el EE no es estable bajo las condiciones evaluadas, por lo que es necesario el desarrollo de una formulación adecuada, que permita preservar su estabilidad, y así proponer su uso como medicamento herbolario. Por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar una formulación para un medicamento herbolario a base de *Turnera diffusa* y evaluar su actividad hepatoprotectora. El proyecto constó de cinco etapas: 1) validación de un método por HPLC-DAD para cuantificar el HD, 2) desarrollo de dos formas farmacéuticas, una basada en nanopartículas (NP) y otra en cápsulas rígidas de gelatina, 3) evaluación de los parámetros de calidad de la formulación, de acuerdo con lo estipulado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 4) evaluación de la estabilidad, tanto química como biológica, de la formulación y 5) evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vivo* de la formulación, en un modelo de daño con ácido valproico en ratas Wistar.

Conclusiones y contribuciones: se validó un método por HPLC-DAD para cuantificar HD, el cual es lineal ($5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), preciso y exacto. Se obtuvieron NP poliméricas cargadas con el EE, sin embargo, el porcentaje de eficiencia de encapsulación para el HD fue muy bajo. Además, se desarrolló una formulación en cápsulas rígidas de gelatina para el EE, la cual cumplió con los parámetros de uniformidad de peso, uniformidad de contenido, tiempo de desintegración y perfil de disolución establecidos en la FEUM. La formulación presentó una estabilidad química de seis meses y una estabilidad biológica de tres meses. En el modelo *in vivo*, tanto el EE como la formulación redujeron significativamente la enzima AST presente en el suero de las ratas, y mostraron un efecto comparable al control positivo de silimarina. La información generada a través de este proyecto podría ser utilizada en un futuro para la solicitud de un registro sanitario de medicamento herbolario ante la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xviii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hígado y enfermedades crónicas asociadas.....	1
1.2 Medicina Herbolaria.	3
1.3 Formulación de medicamentos herbolarios	9
1.3.1 Formulaciones clásicas.....	10
1.3.2 Formulaciones novedosas basadas en nanotecnología.....	11
1.3.2.1 Técnicas de elaboración de nanopartículas.....	13
1.3.3 Parámetros de calidad en la elaboración de medicamentos herbolarios	14
1.4 Medicina herbolaria empleada en el tratamiento de enfermedades hepáticas.	15
1.5 <i>Turnera diffusa</i>	17
1.6 Antecedentes	19
1.7 Justificación	21
1.8 Hipótesis de trabajo	22
1.9 Objetivo general.....	22
1.10 Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 2	23

MATERIAL Y MÉTODOS	23
2.1 Material, equipos y reactivos	23
2.1.1 Material	23
2.1.2 Equipos	24
2.1.3 Reactivos	25
2.1.4 Material biológico	27
2.2 Material herbal	27
2.3 Preparación del disolvente eutéctico profundo	28
2.4 Cromatografía en capa fina (CCF).....	28
2.5 Condiciones de elución para el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	28
2.5.1 Condiciones para el monitoreo del aislamiento de hepatodamianol	29
2.5.2 Condiciones para la estimación del porcentaje de eficiencia de encapsulación ..	29
2.5.3 Condiciones para el análisis de pureza y cuantificación de hepatodamianol en el extracto estandarizado.	30
2.6 Obtención del Extracto Estandarizado.....	31
2.6.1 Obtención del extracto crudo primario.....	31
2.6.2 Eliminación de clorofilas por extracción en fase sólida (SPE)	31
2.6.3 Cromatografía de Líquidos al Vacío.	32
2.7 Aislamiento de hepatodamianol.....	32
2.7.1 Cromatografía en columna a baja presión.....	32
2.7.2 Cromatografía de exclusión molecular	34
2.7.3 Análisis de la pureza del hepatodamianol	35
2.8 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD.....	36
2.8.1 Linealidad.....	36
2.8.2 Precisión	37
2.8.3 Exactitud	37
2.8.4 Límite de detección y cuantificación	38
2.9 Cultivo celular.....	38
2.9.1 Mantenimiento de las líneas celulares.....	38
2.9.2 Conteo celular	39
2.9.3 Congelamiento de las líneas celulares.....	39
2.10 Determinación de la citotoxicidad	39

2.11	Parámetros de control de calidad del extracto estandarizado	40
2.11.1	Contenido de hepatodamianol.....	40
2.11.2	Determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH	41
2.11.3	Determinación de flavonoides totales	41
2.11.4	Actividad hepatoprotectora in vitro.....	42
2.11.5	Determinación de disolventes residuales	43
2.12	Formulación a base de nanopartículas poliméricas	45
2.12.1	Evaluación de parámetros a modificar para la obtención de las nanopartículas	46
2.12.2	Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas	47
2.13	Formulación en cápsulas rígidas de gelatina	48
2.13.1	Estudios de preformulación.....	48
2.14	Parámetros de control de calidad de la formulación en cápsulas rígidas de gelatina.....	50
2.14.1	Uniformidad de peso	51
2.14.2	Valoración y uniformidad de contenido.....	51
2.14.3	Tiempo de desintegración	52
2.14.4	Perfil de disolución.....	52
2.14.5	Límites microbianos.....	53
2.14.6	Determinación de estabilidad a largo plazo	55
2.15	Ensayo de hepatoprotección <i>in vivo</i>	55
2.16	Análisis estadístico	57
CAPÍTULO 3		58
RESULTADOS		58
3.1	Obtención del EE	58
3.2	Aislamiento de hepatodamianol.....	58
3.3	Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD.....	62
3.4	Parámetros de control de calidad del extracto estandarizado	63
3.4.1	Contenido de hepatodamianol en el EE	63
3.4.2	Actividad antioxidante por el método de DPPH	63
3.4.3	Determinación de flavonoides totales por el método de AlCl ₃	64
3.4.4	Actividad hepatoprotectora in vitro.....	65
3.4.5	Determinación de la presencia de disolventes residuales.....	67
3.5	Pruebas de Preformulación para la Elaboración de Nanopartículas	68

3.5.1 Prueba cualitativa de solubilidad del extracto estandarizado	68
3.5.2 Evaluación de parámetros a modificar para la obtención de las nanopartículas ..	69
3.5.2.1 Efecto de la concentración y tipo de polímero sobre el tamaño.....	69
3.5.2.2 Efecto de la concentración del surfactante	70
3.5.2.3 Efecto de la proporción de fase orgánica:fase acuosa	71
3.5.2.4 Efecto de la composición de la fase orgánica	72
3.5.3 Estimación del porcentaje de eficiencia de encapsulación.....	74
3.6 Pruebas de preformulación para las cápsulas rígidas de gelatina	75
3.7 Determinación de la citotoxicidad	81
3.8 Parámetros de control de calidad de la formulación en cápsulas rígidas de gelatina .	82
3.8.1 Uniformidad de peso	82
3.8.2 Valoración y uniformidad de contenido.....	83
3.8.3 Tiempo de desintegración	84
3.8.3 Perfil de disolución.....	84
3.8.4. Límites microbianos.....	86
3.8.5 Estabilidad a largo plazo	87
3.9 Actividad hepatoprotectora <i>in vivo</i>	88
CAPITULO 4	90
DISCUSIÓN.....	90
4.1 Obtención del Extracto Estandarizado.....	91
4.2 Aislamiento de hepatodamianol.....	92
4.3 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD.....	93
4.4 Parámetros de control de calidad del extracto estandarizado	97
4.5 Formulación a base de nanopartículas poliméricas	101
4.6 Formulación en cápsulas rígidas de gelatina.	104
4.6.1 Estudios de preformulación.....	104
4.7 Determinación de la citotoxicidad	107
4.8 Parámetros de calidad de la formulación en cápsulas rígidas de gelatina.	108
4.8.1 Uniformidad de peso	109
4.8.2 Valoración y uniformidad de contenido.....	109
4.8.3 Tiempo de desintegración	110

4.8.4 Perfil de disolución.....	110
4.8.5 Límites microbianos.....	115
4.8.6 Estabilidad a largo plazo	117
4.9 Actividad hepatoprotectora <i>in vivo</i>	121
CONCLUSIONES.....	122
PERSPECTIVAS	124
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXOS.....	137
Anexo I: Espectros de IR de prueba de solubilidad.....	137
Anexo II: Espectros de IR de prueba estabilidad a 30 días	141
Anexo III Espectros de masas por impacto electrónico de los disolventes analizados para la determinación de disolventes residuales	144
Anexo IV: Aspecto y montado del equipo de desintegración y reporte de análisis emitido	148
Anexo V Gráficos de mejor ajuste para los modelos de mecanismo de liberación evaluados	152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies empleadas en la elaboración de medicamentos herbolarios aprobados por la COFEPRIS de 2001 a 2024.	6
Tabla 2. Ejemplos de polímeros sintéticos biodegradables y/o biocompatibles empleados en la elaboración de nanopartículas poliméricas.	12
Tabla 3. Plantas con actividad hepatoprotectora que se han evaluado en ensayos clínicos.	16
Tabla 4. Estudios que reportan la actividad hepatoprotectora de plantas en México.	16
Tabla 5. Compuestos aislados de <i>T. diffusa</i> y actividad biológica atribuida.	18
Tabla 6. Condiciones del gradiente de elución por HPLC para el aislamiento de hepatodamianol.	29
Tabla 7. Condiciones del gradiente de elución por HPLC para la cuantificación de hepatodamianol.	30
Tabla 8. Condiciones de elución para cromatografía en columna Lobar.	33
Tabla 9. Condiciones de elución para cromatografía en columna de la Fr. 55 %.	33
Tabla 10. Intervalo de concentración de muestras probadas para determinar la CC ₅₀	40
Tabla 11. Grupos experimentales realizados en la evaluación de la actividad hepatoprotectora <i>in vitro</i>	43
Tabla 12. Concentración máxima permitida de disolventes residuales en productos farmacéuticos de acuerdo con la guía 467 de la USP.	44
Tabla 13. Masa de EE pesado y disolventes empleados para la prueba de solubilidad.	46
Tabla 14. Variables evaluadas para la preparación de nanopartículas poliméricas.	47

Tabla 15. Proporción de las mezclas de excipiente y EE para el estudio de compatibilidad.	49
Tabla 16. Condiciones para la determinación de límites microbianos.	54
Tabla 17. Grupos experimentales y dosis administradas vía orogástrica en el modelo de hepatoprotección <i>in vivo</i>	56
Tabla 18. Porcentaje de recuperación para cada etapa de obtención del extracto estandarizado.	58
Tabla 19. Resultados de los parámetros de validación para el método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD.	62
Tabla 20. Resultados de la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH.	64
Tabla 21. Solubilidad del extracto estandarizado en los disolventes evaluados.	69
Tabla 22. IPD de las nanopartículas en función de proporción de MeOH en FO.	72
Tabla 23. Propiedades de flujo de la formulación en polvo.	80
Tabla 24. Resultados de los parámetros de calidad del extracto estandarizado antes y después de incorporarlo en la formulación en polvo.	82
Tabla 25. Resultados de la prueba de uniformidad de peso.	82
Tabla 26. Resultados de la valoración de hepatodamianol y uniformidad de contenido.	83
Tabla 27. Comparación de los perfiles de disolución por el método del factor de similitud.	85
Tabla 28. Resultados de la evaluación de bondad de ajuste para los modelos evaluados.	85
Tabla 29. Parámetros del modelo de Weibull para el perfil de disolución de hepatodamianol.	86
Tabla 30. Resultados de la determinación de límites microbianos.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Progresión del daño en el hígado.	2
Figura 2. Crecimiento en el número de estados miembro de la OMS con regulación de medicamentos herbolarios, 1999-2023.....	4
Figura 3. Número de registros sanitarios para medicamentos herbolarios entregados por COFEPRIS, 2001-2024.	5
Figura 4. Esquema del proceso de nanoprecipitación.	13
Figura 5. A) Dibujo de las ramas, hojas y flores de <i>T. diffusa</i> . B) Fotografía de <i>T. diffusa</i> . 17	
Figura 6. Estructura química del hepatodamianol.	19
Figura 7. A) Cromatoplaqueta representativa de la separación del EE. B) Cromatoplaqueta representativa de la separación de la Fr. 55 %	59
Figura 8. Cromatograma de la fracción enriquecida en hepatodamianol. $\lambda = 254$ nm. Columna Hypersil – Gold C ₁₈ , flujo de 0.40 mL min ⁻¹	60
Figura 9. Cromatograma y espectro UV del hepatodamianol aislado. $\lambda = 350$ nm. Columna Hypersil – Gold C ₁₈ , flujo de 0.40 mL min ⁻¹	61
Figura 10. Espectro de ¹ H-RMN a 400 MHz del hepatodamianol aislado en CD ₃ OD.	61
Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de hepatodamianol.....	62
Figura 12. Cromatograma del EE. $\lambda = 350$ nm. Columna Hypersil – Gold C ₁₈ , flujo de 0.40 mL min ⁻¹	63
Figura 13. A) Gráfico de reducción del radical DPPH de Quercetina. B) Gráfico de reducción del radical DPPH del EE.	64

Figura 14. Espectro de absorción de rutina, EE y complejo con AlCl_3	65
Figura 15. Curva de calibración de rutina para la cuantificación de flavonoides totales.	65
Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular de células Hep G2 tras 24 h de exposición a AVP 7 mM.	66
Figura 17. Efecto hepatoprotector <i>in vitro</i> frente al daño inducido por AVP 7 mM durante 24 h en células Hep G2.....	67
Figura 18. Cromatogramas sobrepuestos de las soluciones estándar con los disolventes buscados en la máxima concentración permitida de acuerdo con la USP y muestras analizadas.....	68
Figura 19. Tamaño e IPD de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit E100.	69
Figura 20. Tamaño e IPD de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit L100-55.	70
Figura 21. Tamaño e IPD de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit RS100.	70
Figura 22. Tamaño y potencial zeta de las NP obtenidas con el polímero A) Eudragit RS100, 20 mg mL ⁻¹ . B) Eudragit RS100, 50 mg mL ⁻¹ , C) Eudragit E100, 23.33 mg mL ⁻¹	71
Figura 23. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit E100.....	71
Figura 24. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit E100.....	72
Figura 25. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit L100-55.	73
Figura 26. Nanopartículas poliméricas de Eudragit E100 cargadas con EE. A) día 2. B) día 16. C) día 22.	73
Figura 27. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de hepatodamianol en las nanopartículas elaboradas con el polímero Eudragit L100-55.	74
Figura 28. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de hepatodamianol en las nanopartículas elaboradas con el polímero Eudragit RS100.	74

Figura 29. Nanopartículas poliméricas de Eudragit L100-55 cargadas con EE. A) día 1. B) día 4 con crecimiento microbiano.	75
Figura 30. Espectro IR de (A) almidón, (B) EE y (C) la mezcla de estos.....	75
Figura 31. Espectro IR de (A) ácido benzoico, (B) EE y (C) la mezcla de estos.....	76
Figura 32. Espectro IR de (A) CaCO ₃ , (B) EE y (C) la mezcla de estos.....	76
Figura 33. Espectro IR de (A) EE, (B) CMC y (C) la mezcla de estos.	77
Figura 34. Espectro IR de (A) manitol, (B) EE y (C) la mezcla de estos.....	77
Figura 35. Espectro IR de (A) MCC, (B) EE y (C) la mezcla de estos.	78
Figura 36. Espectro IR de (A) SiO ₂ , (B) EE y (C) la mezcla de estos.	78
Figura 37. Espectro IR de (A) MCC, (B) mezcla de ácido benzoico y EE y (C) mezcla de MCC, ácido benzoico y EE.	79
Figura 38. Espectro IR de (A) SiO ₂ , (B) mezcla de ácido benzoico y EE y (C) mezcla de EE, SiO ₂ y ácido benzoico.	79
Figura 39. Espectro IR de (A) mezcla de MCC y EE y (B) formulación en polvo.....	80
Figura 40. Porcentaje de viabilidad celular tras la exposición por 48 h.	81
Figura 41. Gráfico del perfil de disolución de hepatodamianol.	84
Figura 42. Agar VRBD después de 24 h de incubación. A) <i>Escherichia coli</i> . B) <i>Staphylococcus aureus</i> . C) Producto de prueba.	87
Figura 43. Estabilidad a largo plazo de la formulación. A) Porcentaje de contenido de hepatodamianol. B) Concentración de AST. C) Porcentaje de reducción de liberación de AST	88
Figura 44. Concentración de AST en suero de ratas Wistar.....	89
Figura 45. Cromatograma del método 1.....	94
Figura 46. Cromatograma del EE analizado con el método cromatográfico 2.....	95
Figura 47. Esquema de la reacción entre el AlCl ₃ y flavonoides.	98
Figura 48. Espectro de IR de prueba con MeOH.	137

Figura 49. Espectro de IR de prueba con etanol.....	137
Figura 50. Espectro de IR de prueba con isopropanol.....	138
Figura 51. Espectro de IR de prueba con acetona.	138
Figura 52. Espectro de IR de prueba con isopropanol:acetona.	139
Figura 53. Espectro de IR de prueba con propilenglicol.	139
Figura 54. Espectro de IR de prueba con isopropilmiristato.	140
Figura 55. Espectro de IR de mezcla de EE y SiO ₂ (A) día 1, (B) día 30.....	141
Figura 56. Espectro de IR de mezcla de EE y ácido benzoico (A) día 1, (B) día 30.	141
Figura 57. Espectro de IR de mezcla de EE y MCC (A) día 1, (B) día 30.....	142
Figura 58. Espectro de IR de mezcla de EE, MCC y ácido benzoico (A) día 1, (B) día 30.	142
Figura 59. Espectro de IR de mezcla de EE, SiO ₂ y ácido benzoico (A) día 1, (B) día 30.	143
Figura 60. Espectro de IR de la formulación en polvo (A) día 1, (B) día 30.	143
Figura 61. Espectro de masas de acetato de etilo.	144
Figura 62. Espectro de masas de acetona	144
Figura 63. Espectro de masas de agua.....	145
Figura 64. Espectro de masas de cloruro de metileno	145
Figura 65. Espectro de masas de etanol.....	146
Figura 66. Espectro de masas de isopropanol.....	146
Figura 67. Espectro de masas de metanol.....	147
Figura 68. Espectro de masas de dióxido de carbono.....	147
Figura 69. Sinkers malla N.10.....	148
Figura 70. Aspecto y montaje del Desintegrador PHARMATEST PTZ Auto.	149
Figura 71. Aspecto posterior a la desintegración.	150
Figura 72. Reporte prueba de desintegración de cápsulas rígidas de gelatina.	151

Figura 73. Gráficos de mejor ajuste en solución de HCl pH 1.2.....	152
Figura 74. Gráficos de mejor ajuste en solución de buffer de acetatos pH 4.5.	152
Figura 75. Gráficos de mejor ajuste en solución de buffer de fosfatos pH 6.8.	153
Figura 76. Gráficos de mejor ajuste en agua.	153

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	porcentaje
% <i>F</i>	porcentaje de liberación
'	minutos
"	segundos
<	menor que
>	mayor que
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrómetros
¹ H RMN	resonancia magnética nuclear de protón
AIC	criterio de información de Akaike
AlCl ₃	tricloruro de aluminio
ALT	alanino aminotransferasa
ANOVA	análisis de varianza
AST	aspartato aminotransferasa
AVP	ácido valproico
C ₁₈	octadecilsilano

CaCO ₃	carbonato de calcio
CC ₅₀	concentración citotóxica 50
CCF	cromatografía en capa fina
CCl ₄	tetracloruro de carbono
CD ₃ OD	metanol deuterado
CE ₅₀	concentración efectiva 50
CG-EM	cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
Cm	centímetros
CMC	carboximetil celulosa
CO ₂	dióxido de carbono
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
DE	desviación estándar
DER	desviación estándar relativa
DES	disolvente eutéctico profundo
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EE	extracto estandarizado
eq	equivalentes
f_2	factor de similitud
FA	fase acuosa
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FO	fase orgánica
IR	espectroscopía infrarroja
G	gramos
h	horas

HPLC-DAD	cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de arreglo de diodos
HR	humedad relativa
ICH	Conferencia Internacional sobre armonización
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPD	índice de polidispersidad
kg	kilogramo
LDC	límite de cuantificación
LDD	límite de detección
LDH	lactado deshidrogenasa
MASLD	enfermedad por hígado graso esteatósico asociado a disfunción metabólica
MAyC	medicina alternativa y complementaria
mbar	milibar
MCC	celulosa microcristalina
MeOH	metanol
Mg	miligramo
MGA	método general de análisis
MHz	megahertz
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MSC	criterio de selección de modelo

MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaBr	bromuro de sodio
Nm	nanómetro
NP	nanopartícula
°	grado
°C	grado Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina
ppm	partes por millón
r^2	coeficiente de determinación
r^2_{adj}	coeficiente de determinación ajustado
R_F	factor de retardo
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SFB	suero fetal bovino
SiO ₂	dióxido de silicio coloidal
SPE	extracción en fase sólida
t_R	tiempo de retención
U/L	unidades internacionales por litro
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de América
UV	ultravioleta
VA	valor de aceptación
δ	desplazamiento químico
λ	longitud de onda

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Hígado y enfermedades crónicas asociadas.

El hígado es el órgano sólido más grande del cuerpo humano y se encuentra en la cavidad abdominal. Este órgano cumple diversas funciones, entre las que se encuentran la remoción de toxinas, regulación de los niveles de glucosa y lípidos, síntesis de algunas proteínas, entre otras.¹ El hígado es susceptible de sufrir daño crónico mediante distintos agentes, como lo son infecciones causadas por virus hepatotrópicos, sustancias tóxicas como el alcohol o algunos medicamentos, desórdenes metabólicos como la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD) y diversas enfermedades autoinmunes. Independientemente del agente etiológico, todos producen un estado de inflamación. Cuando el factor que genera el daño no es eliminado, el hígado puede evolucionar a un estado de fibrosis, cirrosis y finalmente cáncer hepatocelular (figura 1).^{2,3}

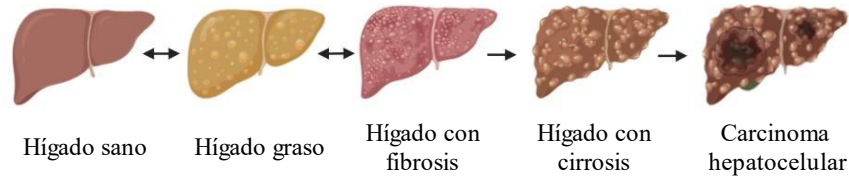


Figura 1. Progresión del daño en el hígado. Imagen creada con Biorender.com

Las enfermedades del hígado son un problema de salud importante, ya que representan la onceava causa de muerte a nivel mundial. Se estima que cada año mueren cerca de 2 millones de personas como consecuencia de enfermedades del hígado; los últimos datos publicados reportan 1.26 millones de muertes debido a la cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado, mientras que el cáncer hepático fue responsable de 830,000 muertes en 2020, y 1.3 millones de defunciones a causa de hepatitis viral.^{2,3}

En México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), las muertes a causa de enfermedades del hígado ocuparon el quinto lugar en el periodo de enero a junio de 2025.⁴ De acuerdo con un estudio de cohorte multicéntrico realizado en el centro de México, la MASLD pasó de ser la tercera causa asociada a cirrosis en el año 2000 a ocupar el primer lugar en 2019; además, se determinó que la segunda etiología más frecuentemente asociada al desarrollo de cirrosis fue la enfermedad hepática por alcohol (ALD), mientras que las infecciones por virus de la hepatitis C (HCV) pasaron del primer lugar en el año 2000 al cuarto lugar en 2019.⁵ Según datos publicados en 2023, de 1990 a 2021 las principales etiologías asociadas a muerte por cirrosis fueron el consumo de alcohol y las hepatitis virales, mientras que la enfermedad esteatósica del hígado tuvo el mayor aumento.⁶

González-Chagolla reportó en 2022 que las principales etiologías asociadas al desarrollo de cáncer hepatocelular en México son el HCV, seguido de la MASLD y en tercer lugar la ALD.⁵ En contraste, en 2026 Méndez-Sánchez y cols. reportan la MASLD como la etiología más frecuentemente asociada al desarrollo de cáncer hepatocelular, con un 40.2 % de los casos, seguido de HCV infección, con un 33 % de los casos y la ALD con un 19.1 % de los casos.⁷ Estos datos concuerdan con el incremento en la prevalencia de MASLD en México, la cual se ha ido incrementando con los años, pasando del 10 % en 2000, al 41.3 % en 2023.⁸

El tratamiento para las enfermedades asociadas al hígado, y en especial para la condición de fibrosis, se enfoca en la eliminación del agente causal del daño, y la disminución de la progresión y complicaciones de la enfermedad. Estrategias como modificaciones en el estilo de vida (ejercicio y nutrición), el uso de fármacos antiinflamatorios y moléculas antioxidantes, así como medicamentos para la pérdida de peso son algunas de las estrategias de tratamiento usadas para estas enfermedades.³ Recientemente se aprobó el uso de resmetirom y semaglutida (Wegovy) para el tratamiento de MASLD en pacientes con fibrosis en etapas F2 (fibrosis significativa) y F3 (fibrosis avanzada); a pesar de esto, persiste la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas, sobre todo aquellas que presenten un efecto anti fibrótico.^{9,10}

1.2 Medicina Herbolaria.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional (MT) es el conjunto de sistemas para el cuidado de la salud que comprende prácticas,

habilidades, conocimiento y filosofías que se originan en distintos contextos históricos y culturales, que son distintos y datan de antes de la biomedicina y que, a su vez, evoluciona con la ciencia para su uso actual.¹¹

Dentro de las prácticas de MT, la medicina herbolaria es la más ampliamente utilizada; comprende el uso de hierbas, material herbal o preparados de éste, o productos terminados de material herbal, que contienen como producto activo partes o combinaciones de plantas. Con el paso de los años los medicamentos herbolarios han cobrado cada vez mayor relevancia; evidencia de ello es el número creciente de países que han adoptado algún tipo de regulación para estos. La figura 2 muestra un gráfico comparativo donde se observa este incremento. A su vez, la importancia en la regulación de este tipo de productos se ve reflejado en el incremento en el número de países que han incorporado el uso de farmacopeas y monografías para los medicamentos herbolarios, que pasó de 110 en 2012 a 123 en 2023.¹¹

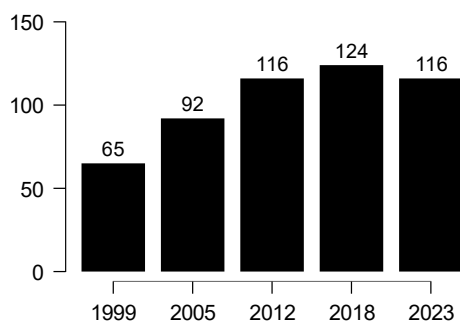


Figura 2. Crecimiento en el número de estados miembro de la OMS con regulación de medicamentos herbolarios, 1999-2023. Modificada de WHO.¹¹

En México, la Ley General de Salud reconoce tres tipos de productos herbolarios en México: medicamento herbolario, remedio herbolario y suplementos alimenticios. Lo que

distingue a cada categoría es que, a diferencia de los remedios, los medicamentos herbolarios deben tener evidencia científica de su eficacia terapéutica y seguridad; por otro lado, a diferencia de los medicamentos y remedios herbolarios, los suplementos alimenticios tienen como única finalidad incrementar, complementar o suplir algún componente de la ingesta dietética total.¹²⁻¹⁴

Para comercializar este tipo de productos, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) otorga un registro sanitario. La figura 3 muestra una gráfica de la cantidad de registros entregados por COFEPRIS para medicamentos herbolarios al 2024, de acuerdo con la información disponible en la página oficial.¹⁵

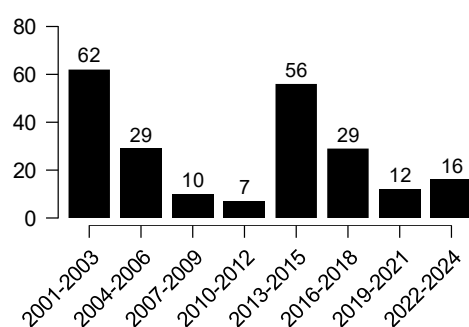


Figura 3. Número de registros sanitarios para medicamentos herbolarios entregados por COFEPRIS, 2001-2024.

La tabla 1 muestra las especies empleadas para la elaboración de los medicamentos herbolarios aprobados por la COFEPRIS, así como el número de medicamentos herbolarios registrados para cada especie, en el periodo de 2001 a 2024 (se excluyen aquellos registros que no corresponden a alguna planta o que no indica la especie empleada); esta tabla muestra también la región de origen para cada una de estas especies, de acuerdo con la página “Plantas del Mundo En Línea” (Plants of the World Online, Royal Botanic Gardens).¹⁶ Como se

aprecia en la tabla, la mayoría de éstas no son de origen mexicano, ya que, de las 89 especies reportadas, tan solo siete son nativas de México. Este hecho es de gran importancia ya que a pesar de que México cuenta con una amplia diversidad y uso de plantas medicinales, muchas de ellas nativas y endémicas a ciertas regiones,¹⁷⁻¹⁹ existe muy poca incorporación de este conocimiento hacia productos que permitan integrar a la medicina herbolaria como parte del sistema primario de salud.

Tabla 1. Especies empleadas en la elaboración de medicamentos herbolarios aprobados por la COFEPRIS de 2001 a 2024.

Especie	Región de origen	Registros
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Península de los Balcanes a Turquía.	6
<i>Agave tequilana</i>	México Oeste y Centro	1
<i>Allium sativum</i>	Asia Central al Noreste de Irán.	2
<i>Althaea officinalis</i>	Europa a Siberia Centro y Noroeste de África	1
<i>Amorphophallus konjak</i>	China.	2
<i>Arctium lappa</i>	Eurasia.	1
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Subártico al Norte, Oeste y Centro de EE. UU.	1
<i>Armoracia rusticana</i>	Sur de Ucrania y Rusia	1
<i>Astragalus membranaceus</i>	Israel al Norte de Libia.	1
<i>Bacopa monnieri</i>	Regiones de trópicos y subtrópicos (México, América del Sur, Asia).	1
<i>Camelia sinensis</i>	Este del Himalaya a Sur de China y Norte de Indochina.	3
<i>Carum carvi</i>	Eurasia.	1
<i>Cassia angustifolia</i>	Sahara y Sahel a subcontinente Indio.	9
<i>Cassia senna</i>	Sahara y Sahel a subcontinente Indio.	2
<i>Centella asiatica</i>	África, Nueva Zelanda, Pacífico Oeste.	1
<i>Cimicifuga racemosa</i>	Sureste de Canadá, Norte, Centro y Este de EE. UU.	3
<i>Citrus x aurantium</i>	Sur de China.	1

Tabla 1. (continúa).

<i>Coffea canephora</i>	Oeste tropical de África al Sur de Sudán y Norte de Angola.	2
<i>Coptis chinensis</i>	Centro Este de China.	1
<i>Cordia verbenacea</i>	México a Suramérica.	2
<i>Crataegus monogyna</i>	Europa, Norte de África, Irak.	1
<i>Curcuma longa</i>	Suroeste de India.	3
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	Pakistán al Oeste de India.	1
<i>Cynara scolymus</i>	Macaronesia, Mediterráneo	3
<i>Echinacea angustifolia</i>	Oeste de Canadá, Norte y Centro de EE. UU.	1
<i>Echinacea purpurea</i>	Centro y Este de EE. UU.	3
<i>Equisetum arvense</i>	Subártico y Hemisferio Norte.	1
<i>Eucalyptus globulus</i>	Australia.	2
<i>Fucus vesiculosus</i>	Costas Atlánticas (del Ártico al Norte de África y Canarias).	2
<i>Garcinia cambogia</i>	Oeste de India.	7
<i>Gentiana lutea</i>	Montañas europeas al Oeste de Turquía.	1
<i>Gentiana macrophylla</i>	Siberia a Centro de China.	1
<i>Ginkgo biloba</i>	China.	14
<i>Glycine max</i>	Este de Rusia a China y Este de Asia.	5
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Mediterráneo central, Mongolia y Pakistán.	2
<i>Grindelia robusta</i>	América subártica y EE. UU.	1
<i>Gymnema sylvestre</i>	África, India, Australia.	2
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Sudáfrica.	3
<i>Hedera helix</i>	Europa, Este y Norte de Turquía.	13
<i>Humulus lupulus</i>	Europa a Siberia, Norte de Irán, Marruecos.	3
<i>Hypericum perforatum</i>	Macaronesia y Mediterráneo.	1
<i>Hypericum perforatum</i>	Macaronesia, Europa, China, Noroeste de África, Sudoeste de Sudán.	5
<i>Lagerstroemia speciosa</i>	China a Asia Tropical.	1
<i>Lavandula angustifolia</i>	España a Norte y Centro de Italia.	1
<i>Lepidium latifolium</i>	Eurasia, Norte de África, Península de Arabia.	1
<i>Marrubium vulgare</i>	Macaronesia, Europa, Mediterráneo a Himalaya Central.	1
<i>Marsdenia cundurango</i>	Ecuador a Perú.	1
<i>Matricaria chamomilla</i>	Eurasia, Indochina.	5
<i>Melissa officinalis</i>	Mediterráneo, Asia Central.	6

Tabla 1. (continúa).

<i>Mentha x piperita</i>	Europa a Asia Central.	2
<i>Olea europaea</i>	África, Mediterráneo al Sur y Centro de China.	1
<i>Panax ginseng</i>	Corea.	13
<i>Panax quinquefolius</i>	SE de Canadá a Norte y Centro de EE. UU.	1
<i>Passiflora incarnata</i>	Este y Centro de EE. UU., Bermuda.	8
<i>Paullinia cupana</i>	América del Sur subtropical.	1
<i>Pelargonium sidoides</i>	Sudáfrica.	3
<i>Persea gratissima</i>	México, Centroamérica y Costa Rica.	1
<i>Petasites hybridus</i>	De Europa al Norte de Irán, Argelia.	1
<i>Peumus boldus</i>	Centro y Sur de Chile.	1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	México a Centroamérica.	1
<i>Piper methysticum</i>	Islas de Santa Cruz y Pacífico.	2
<i>Plantago ovata</i>	Sureste de España, Norte de África, India, Somalia, Suroeste y Centro EE. UU. a Norte de México.	4
<i>Plantago psyllium</i>	Europa, Siberia, Irán, Norte de África.	12
<i>Psidium guajava</i>	América del Sur.	1
<i>Pygeum africanum</i>	Ghana a Etiopía y Sudáfrica, Madagascar.	2
<i>Rhodiola rosea</i>	Subártico y Subalpino del hemisferio norte.	3
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Mediterráneo.	2
<i>Rumex crispus</i>	Macaronesia, Norte de África, Eurasia.	1
<i>Ruscus aculeatus</i>	Macaronesia al Mediterráneo, Oeste y Sur de Europa Central.	4
<i>Salix alba</i>	Europa, Norte de China, Noroeste de África.	4
<i>Serenoa repens</i>	Sureste de EE. UU.	6
<i>Silybum marianum</i>	Mediterráneo, Asia Central, Etiopía.	11
<i>Sophora japonica</i>	Centro y sur de China.	1
<i>Symphytum officinale</i>	Europa al Oeste de Siberia, Noroeste de Turquía.	1
<i>Tanacetum parthenium</i>	Sureste de Europa, Asia Central, Oeste de Himalayas.	2
<i>Thymus vulgaris</i>	Suroeste de Europa, Sureste de Italia.	3
<i>Triticum vulgare</i>	Transcaucásico a Israel y Noroeste de Irán, Sur de Pakistán a Noroeste de India.	1
<i>Tropaeolum majus</i>	Perú	1
<i>Turnera diffusa</i>	Sur de Texas a Centroamérica, México, Caribe, Este de Brasil.	1
<i>Uncaria tomentosa</i>	Centro y Sur de América Tropical a Trinidad.	1

Tabla 1. (continúa).

<i>Urtica dioica</i>	Europa a Siberia, Oeste de China, Noroeste de África.	2
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Este de Canadá a Norte, Centro y Este de EE. UU.	1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Groenlandia, Eurasia, Oeste de Canadá al Noroeste y Oeste-Centro de EE. UU.	1
<i>Valeriana officinalis</i>	Europa a Noroeste de Irán.	13
<i>Verbena officinalis</i>	África, Europa, Australia.	1
<i>Vinca minor</i>	Europa.	1
<i>Vitex agnus castus</i>	Mediterráneo a Asia Central, Pakistán.	1
<i>Vitis vinifera</i>	Sur - centro y Sureste de Europa a Asia Central.	3
<i>Withania somnifera</i>	Sur de Europa a China central, África a Myanmar.	1
<i>Zingiber officinale</i>	India, Sur y Centro de China.	2
Total		252

1.3 Formulación de medicamentos herbolarios

A pesar de que la OMS no considera en su definición de medicamento herbolario el empleo de alguna forma farmacéutica, la Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y Remedios Herbolarios indica que debe ser presentado en una forma farmacéutica.¹³

La forma farmacéutica se define como la forma física de la dosis del medicamento cuyo propósito es ser administrado o consumido, es decir, es el sistema de entrega para el medicamento. Además de servir como vehículo para la entrega del medicamento, las formas farmacéuticas también cumplen con otras funciones, como lo son proteger la integridad del principio activo (ya sea de factores externos como el oxígeno en el ambiente o la humedad, o de factores internos como el ambiente ácido del estómago) o enmascarar sabores

desagradables que pueda tener la sustancia, entre otros. Las formas farmacéuticas sólidas, en particular las cápsulas y tabletas, se encuentran entre las preferidas. Esto se debe a diversos aspectos, tanto los relacionados con sus procesos de manufactura, como por la facilidad para su administración y consecuente adherencia por parte de los pacientes.²⁰

1.3.1 Formulaciones clásicas

De forma tradicional, las plantas medicinales han sido preparadas con base en formas farmacéuticas clásicas, ya sea en forma líquida como decocciones, tinturas, infusiones, así como en formas sólidas como tabletas o cápsulas, las cuales usualmente se preparan empleando extractos secos de la planta.²¹ En una revisión reciente sobre el desarrollo de patentes con extractos estandarizados enriquecidos con flavonoides se reporta que el 29 % de estas corresponde a tabletas, constituyéndose como la forma farmacéutica mayormente empleada.²² Las cápsulas también son una opción popular para el desarrollo de medicamentos herbolarios. En la revisión previamente mencionada, el 18 % de las patentes corresponden a esta presentación, situándose como la tercera forma farmacéutica más utilizada.²²

A menudo la formulación de medicamentos herbolarios en formas farmacéuticas sólidas involucra la adición de aditivos y excipientes, tales como adsorbentes, diluyentes y conservadores. La mezcla de todos estos componentes constituye el polvo con el cual se producen las cápsulas o tabletas. Es importante que, durante el proceso de formulación en polvo, éste presente una adecuada estabilidad, con propiedades de flujo apropiadas para la manufactura a gran escala de la cápsula o tableta.²⁰

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) establece a través de los Métodos Generales de Análisis (MGA) los procedimientos para la evaluación de características de los medicamentos, tales como tiempo de desintegración, disolución, uniformidad de dosis, entre otros.²³ Fijar valores permisibles para estos parámetros permite establecer un control de calidad óptimo en el proceso de manufactura del medicamento.

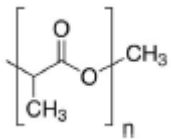
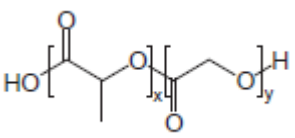
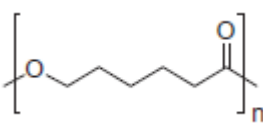
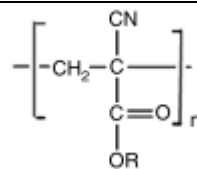
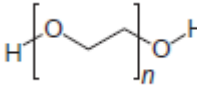
1.3.2 Formulaciones novedosas basadas en nanotecnología

La nanotecnología representa una herramienta poderosa para superar los desafíos que presenta el uso de los productos naturales como agentes terapéuticos. La falta de solubilidad en agua, falta de estabilidad, baja biodisponibilidad o propiedades farmacocinéticas inadecuadas son solo algunos de los aspectos que han limitado su desarrollo y aplicación como nuevos fármacos en un contexto clínico. Sin embargo, la nanotecnología ofrece ventajas que permiten sobrepasar estos obstáculos. Numerosos estudios han demostrado que la incorporación de productos naturales en sistemas nanoparticulados permiten mejorar la disolución, absorción y estabilidad de los productos naturales; además la modificación en la superficie de los nano acarreadores permite hacer un diseño “a medida” que favorezca la administración a un blanco específico.^{24,25}

Los sistemas nanoparticulados pueden clasificarse de diversas maneras; una de estas clasificaciones distingue a los nano acarreadores poliméricos, los cuales representan más del 25 % de las formulaciones basadas en nanotecnología. Los polímeros pueden ser de origen natural como el quitosano o el alginato, o de origen sintético, muchos de los cuales son

biodegradables o biocompatibles.²⁶ Algunos ejemplos de polímeros sintéticos biodegradables y/o biocompatibles se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de polímeros sintéticos biodegradables y/o biocompatibles empleados en la elaboración de nanopartículas poliméricas.

Nombre	Estructura
Ácido poli láctico	
Ácido poli láctico – co – glicólico	
Poli ε caprolactona	
Poli alquil cianoacrilatos	
Polietilenglicol	

Aspectos como el tamaño y la forma de las nanopartículas (NP) modulan su interacción con las distintas membranas en el organismo, y, por ende, su absorción y biodistribución. Por ejemplo, si el tamaño es muy reducido (< 20 – 30 nm), las NP son eliminadas mediante excreción renal, mientras que si son muy grandes (> 500 nm) no son bien absorbidas por el tracto gastrointestinal. La carga superficial de las NP, indicado por el potencial zeta, también tiene un efecto importante. Debido a que la capa mucosa del tracto

gastrointestinal tiene carga negativa, NP con carga positiva tienden a adherirse más fuertemente que aquellas que presentan carga negativa.²⁷ La modificación de estas características dependerá del sitio donde se busca que tenga efecto la sustancia activa.

1.3.2.1 Técnicas de elaboración de nanopartículas

Existen diversas técnicas para elaborar NP a base de polímeros, entre las que destacan la técnica de nano precipitación. Esta técnica presenta una serie de ventajas respecto al resto, como son su alta reproducibilidad y sencillez, así como su bajo costo energético. Los componentes necesarios para elaborar NP mediante esta técnica son un soluto, por ejemplo, el polímero y la sustancia activa, una fase orgánica que contiene al polímero y donde el soluto sea soluble, y una fase acuosa que puede contener emulsificantes o surfactantes. Otro requisito importante para esta técnica es que ambas fases sean totalmente miscibles entre sí. El proceso de nano precipitación se esquematiza en la figura 4; este se da por la adición de la fase acuosa a la solución con el polímero. Esto provoca que el polímero sea insoluble en la solución resultante, y la posterior formación de las NP.^{28,29}

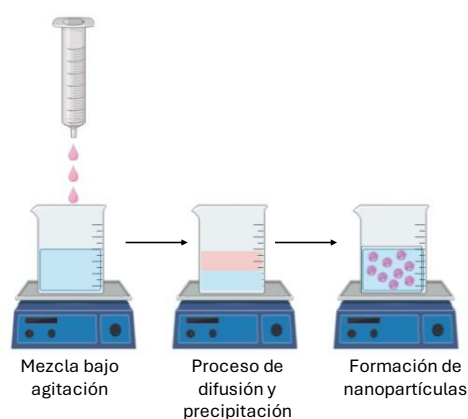


Figura 4. Esquema del proceso de nanoprecipitación. Creado con Biorender.com.

1.3.3 Parámetros de calidad en la elaboración de medicamentos herbolarios

El control de calidad en la elaboración de productos herbolarios se debe realizar a lo largo de cada una de las etapas de manufactura, desde la obtención y procesamiento del material herbal como tal, hasta los procesos de formulación y obtención de la forma farmacéutica.

Cuando se trabaja con material herbal, tres aspectos importantes deben tomarse en cuenta para establecer los parámetros de calidad: identidad, pureza y contenido. Esto es crucial para garantizar que el producto sea seguro y tenga el efecto biológico deseado. Existe una gran variedad de técnicas analíticas que pueden utilizarse para determinar estos parámetros. El establecimiento de huellas dactilares a través de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y de técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la Espectroscopía Infrarroja (IR), en conjunto con métodos quimiométricos, es una de las herramientas más comúnmente empleadas para el control de calidad de productos herbales.^{30,31}

Por otro lado, una vez que la calidad del material herbal ha sido verificada, es necesario también establecer especificaciones y características para el medicamento presentado en una forma farmacéutica. Algunos de los parámetros que deben evaluarse son análisis de contenido del activo, características fármaco-técnicas de la forma farmacéutica, análisis de pureza (disolventes residuales, límites microbianos), pruebas farmacéuticas tales como el tiempo de desintegración o el perfil de disolución, entre otros. De manera similar a los parámetros de calidad del producto herbal, establecer estos criterios asegura que el

producto es seguro, presenta homogeneidad entre lotes, y tiene el efecto biológico deseado.^{30,32}

Otro aspecto de gran importancia es la evaluación de la estabilidad a largo plazo. No es suficiente evaluar los parámetros de calidad al momento de la elaboración del producto, ya que estos son susceptibles de sufrir cambios o alteraciones con el transcurso del tiempo por factores ambientales como la temperatura, la humedad o la luz. Realizar estudios de estabilidad bajo condiciones ambientales controladas permite asegurar que el contenido y la actividad biológica deseada se mantendrá durante el tiempo de almacenamiento establecido.³³

1.4 Medicina herbolaria empleada en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

La medicina herbolaria ha tomado un papel importante en el tratamiento de las enfermedades hepáticas, ya que representa una alternativa a los tratamientos farmacológicos convencionales. Se estima que más de 700 preparaciones de plantas, ya sea de forma individual o en mezclas, son empleadas para el tratamiento de estas enfermedades, e incluso se reportan ensayos clínicos donde se ha evaluado la actividad hepatoprotectora de diversas plantas en alguna forma farmacéutica.^{34,35} La tabla 3 muestra algunas de las plantas que se han evaluado en ensayos clínicos, así como los constituyentes a los que se le atribuye la actividad hepatoprotectora.

Tabla 3. Plantas con actividad hepatoprotectora que se han evaluado en ensayos clínicos.

Información tomada de Służały y cols.³⁵

Planta / forma farmacéutica	Constituyente activo	Efecto
Alcachofa (<i>Cynara</i> spp.) en tabletas y cápsulas	Cynarin, ácido clorogénico, ácido caféico, flavonoides	Disminución en enzimas AST y ALT, mejoras en la acumulación de grasa en el hígado.
<i>Cichorium intybus</i> L.en infusión	Compuestos polifenólicos, inulina	Disminución en los niveles de enzimas AST, ALT, GGT, ALP.
<i>Curcuma longa</i> L.en tabletas y cápsulas	Curcumina	Mejora en la acumulación de grasa en el hígado, disminución de las enzimas ALT, AST, GGT
<i>Camellia sinensis</i> (L.) en tabletas y cápsulas	Flavanoles y catequinas	Disminución de los niveles de enzimas AST, ALT, ALP. Mejora en parámetros antropométricos por ultrasonografía
<i>Schisandra chinensis</i> (tabletas y cápsulas)	Lignanós (esquisandrinas)	Disminución de los niveles de enzimas ALT, AST. Mejora en los niveles de grasa en hígado medido por ultrasonografía

En México son pocos o nulos los ensayos clínicos que han evaluado la actividad hepatoprotectora de plantas,³⁶ sin embargo, hay un gran número de estudios que reportan su actividad hepatoprotectora en modelos *in vitro* e *in vivo*. La tabla 4 muestra algunos de estos.

Tabla 4. Estudios que reportan la actividad hepatoprotectora de plantas en México.

Planta	Extracto administrado	Efecto	Referencia
<i>Bouvardia ternifolia</i>	Mezcla de ácido ursólico y oleanólico aislado del extracto metanólico	Disminución en los niveles de AST y ALT. Mejora en las alteraciones histopatológicas inducidas por fármacos anti-tuberculosis.	Gutiérrez-Rebolledo, 2016. ³⁷
<i>Justicia spicigera</i>	Extracto etanólico	Disminución en los niveles séricos de distintas enzimas hepáticas.	Murillo-Villicana, 2022. ³⁸

Tabla 4. (continúa).

<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>alba</i>	Aceite esencial	Disminución en la actividad enzimática de fosfatasa alcalina y de gama glutamil transpeptidasa y de los niveles de ALT y AST	Morales-López, 2016. ³⁹
<i>Croton hypoleucus</i>	Extracto etanólico	Disminución significativa de los niveles de AST y ALT, fosfatasa alcalina, LDH	Urrutia-Hernández, 2019. ⁴⁰
<i>Turnera diffusa</i>	Extracto metanólico	Disminución de marcadores profibróticos y mitocondriales	Rodríguez-Rodríguez, 2021. ⁴¹

1.5 *Turnera diffusa*.

El género *Turnera* comprende alrededor de 130 especies de plantas, de las cuales *T. diffusa* (figura 5) es considerada entre las más importantes debido a su amplio uso etnofarmacológico alrededor del mundo. Es un arbusto de 25 a 80 cm que presenta flores amarillas. Se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica.⁴² En México esta planta se encuentra en los estados de Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, entre otros.⁴³



A)



B)

Figura 5. A) Dibujo de las ramas, hojas y flores de *T. diffusa*. B) Fotografía de *T. diffusa*.

En la medicina tradicional tiene uso como afrodisíaco, para el dolor de estómago, en el tratamiento del asma y otras enfermedades respiratorias. Se han hecho estudios donde se ha demostrado la actividad antioxidante, anti nociceptiva, neuro protectora, protección contra agentes que provocan toxicidad testicular, hepatoprotectora, entre otros; además se han realizado algunos ensayos clínicos para evaluar su actividad afrodisíaca y para la pérdida de peso.⁴⁴

Aunque muchos de los estudios que reportan alguna actividad biológica de *T. diffusa* emplean extractos crudos o semi purificados, hay otros donde ya se tiene identificada a la molécula o moléculas responsables de la actividad biológica. En la tabla 5 se muestran algunos de estos trabajos.

Tabla 5. Compuestos aislados de *T. diffusa* y actividad biológica atribuida.

Compuesto	Actividad	Referencia
Teuhetenona A.	Hipoglucemiante.	Parra-Naranjo (2017). ⁴⁵
acacetin 7-metil eter.	Inhibidor de la monoamina oxidasa B.	Chaurasiya, N.D (2019). ⁴⁶
Apigenina 7 – glucósido, Z-echinacin y pinocembrina	Actividad estrogénica.	Zhao (2008). ⁴⁷
Pinocembrina y acacetina	Inhibidor de aromatasa	Zhao (2008). ⁴⁷
Hepatodamianol	Hepatoprotector	Delgado-Montemayor (2017). ⁴⁸
Naringenina y apigenin 7-O-(4"-O-p-E-cumaroil)-glucósido	Citotóxico	Willer (2019). ⁴⁹
Arbutina	Gastroprotector	Taha (2012). ⁵⁰

1.6 Antecedentes

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se demostró la actividad hepatoprotectora de *T. diffusa* en un modelo *in vitro* e *in vivo*;⁵¹ estudios preliminares indican que el extracto metanólico de *T. diffusa* ejerce un efecto anti fibrótico mediante la disminución de marcadores pro fibróticos y mitocondriales; además, se sugiere que un probable mecanismo de acción del extracto sería a través de la inducción de apoptosis de células estelares hepáticas activadas.⁴¹ Mediante aislamiento biodirigido se identificó que uno de los compuestos responsables de la actividad hepatoprotectora de *T. diffusa* es el hepatodamianol (figura 6, luteolin 8-C-[6 desoxi-2-O-(alfa-L-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulósido]).⁴⁸

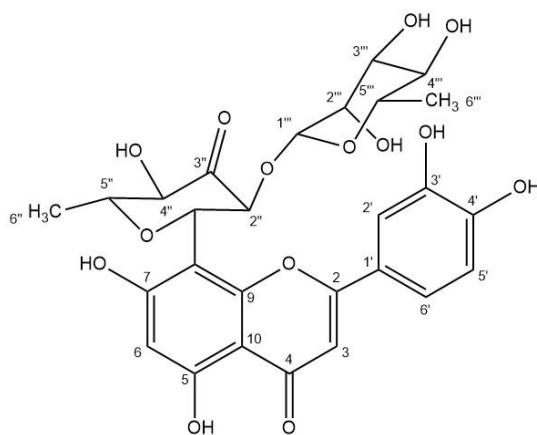


Figura 6. Estructura química del hepatodamianol.

Con base en estos resultados Delgado Montemayor desarrolló en su tesis doctoral un medicamento herbolario a base de un extracto estandarizado de *T. diffusa*; sin embargo, el extracto no fue estable bajo condiciones de estabilidad acelerada, ya que se observó una reducción en la concentración del hepatodamianol presente en la muestra del 83 % respecto

a la concentración inicial. Además, se tuvo una pérdida de la actividad hepatoprotectora *in vitro* a lo largo del tiempo, esto medido por la liberación de AST en el modelo establecido.⁵² Por este motivo resulta de importancia desarrollar una formulación para el extracto estandarizado de *T. diffusa* que permita asegurar su estabilidad y con ello su propuesta para ser usado como medicamento herbolario.

1.7 Justificación

Las enfermedades crónicas del hígado son un problema creciente de salud, tanto a nivel nacional como mundial; evidencia de ello es su alta prevalencia y mortalidad. A pesar de que se cuenta con esquemas de tratamiento para las enfermedades hepáticas, estos son limitados, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento resulta de vital importancia.

La medicina herbolaria representa una excelente fuente para la obtención de nuevos compuestos con actividad hepatoprotectora, y una oportunidad para el desarrollo de medicamentos herbolarios. Sin embargo, es necesario el desarrollo de vehículos adecuados para su administración que permitan garantizar su estabilidad y efectividad.

Turnera diffusa es una planta con demostrada actividad hepatoprotectora, e incluso se ha identificado al principal compuesto responsable de su actividad biológica, el hepatodamianol. Con base en estos resultados se desarrolló un extracto estandarizado para emplearse como medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora; sin embargo, este no es estable bajo condiciones de estabilidad acelerada. Por tal motivo en este trabajo se propone desarrollar una formulación para el extracto estandarizado de *T. diffusa* y evaluar su estabilidad y actividad hepatoprotectora.

1.8 Hipótesis de trabajo

La incorporación del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en una formulación permitirá mejorar su estabilidad manteniendo la actividad hepatoprotectora.

1.9 Objetivo general

Desarrollar una formulación para un medicamento herbolario a base de *Turnera diffusa* y evaluar su actividad hepatoprotectora.

1.10 Objetivos específicos

1. Validar el método por HPLC para la cuantificación de hepatodamianol.
2. Desarrollar una formulación para el extracto estandarizado de *T. diffusa*.
3. Evaluar los parámetros de calidad de la formulación elaborada.
4. Evaluar la estabilidad de la formulación elaborada.
5. Evaluar la citotoxicidad y la actividad hepatoprotectora *in vivo* de la formulación elaborada.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, equipos y reactivos

2.1.1 Material

- Acrodiscos de polivinilideno fluoruro 45 mm de diámetro con filtro de 0.22 μm , Millipore
- Cajas de cultivo celular T-25, T-75 y T-175, Corning
- Cajas para criotubos con capacidad de 25
- Cámara de Neubauer
- Cartucho de extracción en fase sólida (SPE) C_{18} 1g/80 mL, Alltech
- Columna HPLC C_{18} Hypersil Gold 4.6 x 150 mm, tamaño de partícula de 5 μm , Thermo Scientific
- Columna de vidrio para cromatografía, 210 mm de largo x 10 mm diámetro interno.
- Columna Lobar 310-25 LiChroprep RP 18 (40-63 μm), 310 x 25 mm, Merck
- Criotubos de 2 mL de capacidad, Nalgene
- Cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 20 x 20, Merck

- Cubas cromatográficas de 121 x 108 x 80 mm
- Embudo Hirsch tamaño de poro M (10-15) de 160 mL, Pyrex
- Jeringas estériles desechables de 1 mL y 5 mL de capacidad
- Pipetas serológicas de 5 mL, 10 mL y 25 mL estériles
- Placas de 24 pozos de fondo plano, estériles y con tapa, Corning
- Placas de 96 pozos de fondo plano, estériles y con tapa, Corning
- Tubos de RMN de borosilicato de 5 mm de diámetro, Bruker

2.1.2 Equipos

- Autoclave Market Forge Sterilmatic
- Balanza analítica OHAUS Pioneer, modelo PA214C
- Balanza granataria OHAUS Pioneer, modelo PA3102
- Campana de bioseguridad PRENDO, modelo CSB-120
- Campana de seguridad biológica Esco, Modelo LR2-6S2
- Centrífuga Spectrafuge 24D, Labnet
- Centrífuga Thermo IEC, modelo Centra CL3
- Colector de fracciones, Biorad modelo 2128
- Cromatógrafo de gases 6890N, Agilent, acoplado a espectrómetro de masas 5973
INERT
- Cromatógrafo de líquidos Alliance 2695 con detector de arreglo de diodos
(DAD), Waters
- Equipo de rotaevaporación Heidolph, modelo 517-61000-01-0

- Espectrofotómetro IR por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada, Perkin Elmer, modelo Frontier Optica
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible, Thermo Scientific, modelo Genesys 10s
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, Bruker 400 MHz Avance III
- Incubadora Quincy Lab, modelo 10140
- Lector de microplacas Thermo Scientific, modelo 357
- LiChroprep RP-18, 40-63 μm , Merck.
- Liofilizadora modelo Freeze Dry System, Freezone 4.5, Labconco
- Microscopio con objetivos 4X, 10X, 40X, 100X, Eagle modelo CM240
- Microscopio invertido OLYMPUS CORPORATION, modelo CKX41SF
- Potenciómetro Orion, Thermo Scientific, Modelo Star A211
- Shaker, Heidolph modelo Unimax 1010
- Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, modelo Nano-Zs90

2.1.3 Reactivos

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), Sigma
- Acetato de etilo grado analítico, Fermont
- Acetona grado HPLC, Tedia
- Ácido acético grado reactivo, Fermont
- Ácido benzoico, grado estándar certificado, 5.01 ± 0.01 mM, Cambridge Isotope Laboratories.
- Ácido fórmico grado reactivo, Fermont

- Ácido valproico, Sigma
- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Antibiótico Penicilina – Estreptomicina (10 000 unidades/mL – 10 000 µg/mL) 10X, Gibco
- Aspartato AminoTransferasa (AST), Instrumentation laboratory kit
- Azul tripano 0.40 % probado para cultivo celular, Sigma
- Bromuro metil tiazol tetrazolio (MTT), Sigma
- Buffer de fosfatos en solución salina (PBS), Sigma
- Cloruro de colina, ≥ 98 % Sigma.
- Cloruro de metileno grado analítico, Fermont
- Dimetil sulfóxido (DMSO) probado para cultivo celular, Sigma
- Doxorubicina hidroclicada, Sigma
- Eudragit E100, Evonik Industries
- Eudragit L100-55, Evonik Industries
- L-Glutamina 200 mM 100X, Gibco
- LiChroprep RP-18 (40-63 µm), Merck.
- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (D-MEM), Gibco
- Metanol grado analítico, Fermont
- Metanol deuterado (CD₃OD) 99.8 % D, Sigma
- Metanol grado HPLC, JT Baker
- Nitrógeno gas de alta pureza grado 5.0, AGA
- Nitrógeno líquido

- Quercetina, TCI América
- Silimarina, Sigma
- Sílica gel 60G para cromatográfica en capa fina, Merck
- Silimarina, Sigma
- Suero fetal bovino, Gibco
- Tripsina 0.25 % 1X, Gibco
- Tween 80, Sigma
- Urea, 99-100.5 %, Sigma

2.1.4 Material biológico

- Células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero, ATCC CCL-81)
- Células epiteliales de carcinoma hepatocelular (Hep G2, ATCC HB-8065)

2.2 Material herbal

La colecta del material herbal se realizó durante el mes de julio 2023 en el municipio de Cadereyta, Nuevo León. Se colectó la parte aérea de la planta. El material herbal fue autenticado por el Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (número de voucher 25603). Los especímenes colectados se secaron a temperatura ambiente y una vez secos se molieron.

2.3 Preparación del disolvente eutéctico profundo

Se preparó un disolvente eutéctico profundo (DES) compuesto por cloruro de colina y urea en una proporción molar 1:2 con el propósito de utilizarlo en el método de cuantificación de hepatodamianol. El DES se preparó de acuerdo con el método de calentamiento.⁵³ Para ello se pesó la cantidad requerida de cada uno de los reactivos en un matraz bola de fondo plano. La mezcla se agitó a 800 rpm durante 1 hora (h) en un baño de agua a 80 °C. Una vez formado, el líquido viscoso y transparente se dejó enfriar y se realizó una dilución con agua para tener una mezcla al 60 % de DES.

2.4 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron cromatoplasmas base aluminio de sílica gel 60 F₂₅₄, de tamaño 20 x 10 cm. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta (UV) a una λ de 254 nm. Se empleó un sistema de elución de acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua en proporción 25:1:1:2.

2.5 Condiciones de elución para el cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un equipo Waters Alliance 2695 equipado con degasificador, bomba cuaternaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos 2996. En todos los casos, la fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de ácido fórmico al 0.1 % y metanol (MeOH), con un flujo de 0.40 mL min⁻¹. La fase móvil se filtró

y desgasificó a través de una membrana de nylon (47 mm de diámetro, tamaño de poro 0.45 μm), previo a su uso.

2.5.1 Condiciones para el monitoreo del aislamiento de hepatodamianol

La separación cromatográfica se realizó con una columna Hypersil – Gold de fase inversa de octadecilsilano (C_{18}) (150 mm x 4.6 mm; Thermo Scientific). Las muestras se disolvieron en MeOH y se filtraron a través de una membrana de nylon (47 mm de diámetro, tamaño de poro 0.45 μm). Se inyectaron 5 μL de muestra y la detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm. Las condiciones para el sistema de elución se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones del gradiente de elución por HPLC para el aislamiento de hepatodamianol.

Tiempo (minutos)	Ácido fórmico 0.1 %	MeOH
0	70	30
20	40	60
25	30	70
30	30	70
40	70	30
45	70	30

2.5.2 Condiciones para la estimación del porcentaje de eficiencia de encapsulación

La separación se llevó a cabo en una columna AccQ Tag de fase inversa C_{18} (150 mm x 3.9 mm, tamaño de partícula de 4 μm ; Waters Corporation). Las condiciones de elución y detección fueron las condiciones descritas en el punto 2.5.1.

2.5.3 Condiciones para el análisis de pureza y cuantificación de hepatodamianol en el extracto estandarizado.

La separación cromatográfica se realizó en una columna Hypersil – Gold de fase inversa C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 4 µm; Thermo Scientific). Las muestras se disolvieron en una solución acuosa de DES al 60 % y se llevaron a un volumen de aforo de 1 mL para obtener una concentración final de 5 mg mL⁻¹ de extracto estandarizado. Posteriormente se realizó una dilución 1:2 con agua. El análisis se realizó por triplicado. Todas las muestras fueron filtradas a través de una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.22 µm.

Se inyectaron 5 µL de muestra y la detección se realizó a una longitud de onda de 350 nm. El sistema de elución se muestra en la tabla 7. Antes de la primera inyección la columna se acondicionó por 1 h con la fase móvil en las condiciones iniciales, los últimos 5 minutos (min) del sistema de elución fueron para volver a equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Tabla 7. Condiciones del gradiente de elución por HPLC para la cuantificación de hepatodamianol.

Tiempo (min)	Ácido fórmico 0.1 %	MeOH
5	70	30
25	40	60
30	30	70
35	30	70
45	70	30
50	70	30

2.6 Obtención del Extracto Estandarizado

2.6.1 Obtención del extracto crudo primario

Se realizó una extracción con acetato de etilo. Para ello por cada 50 g de planta seca y molida se emplearon 830 mL de acetato de etilo. La extracción se realizó con agitación constante a 200 rpm durante 2 h a temperatura ambiente; este procedimiento se realizó dos veces más. Posteriormente, el residuo vegetal se secó, y una vez seco, se realizó una segunda extracción bajo las mismas condiciones empleando MeOH como disolvente. Los disolventes fueron eliminados mediante evaporación a presión reducida y se continuó trabajando con el extracto metanólico.

2.6.2 Eliminación de clorofilas por extracción en fase sólida (SPE)

En un cartucho de SPE de C₁₈ se colocaron 5 mL del extracto metanólico obtenido en el punto 2.6.1 (disuelto en metanol) y se eluyó con 70 mL de una solución acuosa de MeOH al 50 %, seguido de 70 mL de una solución acuosa de MeOH al 70 % y finalmente 100 mL de MeOH al 100 %. Los disolventes se eliminaron mediante evaporación a presión reducida y los extractos fueron recuperados. Posteriormente la fracción eluída con la solución acuosa de MeOH al 50 % se liofilizó a -40 °C y una presión de 1.33×10^{-3} mbar durante 24 h para continuar trabajando con ella.

2.6.3 Cromatografía de Líquidos al Vacío.

La fracción eluída con la solución acuosa de MeOH al 50 % obtenida en el punto 2.6.2 se sometió a una Cromatografía de Líquidos al Vacío. Para ello se empacaron 40 g de sílica en un embudo Buchner con tamaño de poro de 10-15 μm empleando cloruro de metileno. A su vez, 3 g de la fracción eluída con la solución acuosa de MeOH al 50 % se mezclaron con 5 g de sílica y una vez adsorbida la fracción, la muestra se colocó en la columna previamente empacada. La columna se eluyó con 200 mL de cada uno de los siguientes disolventes: cloruro de metileno, acetato de etilo, acetato de etilo:MeOH (1:1) y MeOH. El disolvente de cada fracción se eliminó mediante evaporación a presión reducida y se recuperaron los extractos. La fracción eluída con la mezcla de acetato de etilo:MeOH (1:1) se liofilizó a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de 1.33×10^{-3} mbar durante 24 h. Esta fracción se denominó extracto estandarizado (EE).

2.7 Aislamiento de hepatodamianol

2.7.1 Cromatografía en columna a baja presión

Para realizar el aislamiento de hepatodamianol se partió de EE obtenido durante el desarrollo de la tesis de licenciatura del Q.C.B. Rolando Mata. Esta metodología coincide con la metodología descrita en el punto 2.6.⁵⁴ Se disolvieron 300 mg de EE en 300 μL de una solución acuosa de MeOH al 40 % y posteriormente se sembraron en una columna comercial de C_{18} (Lobar 310-25 LiChroprep RP 18, 310 x 25 mm, 40-63 μm , Merck) previamente acondicionada con 200 mL de una solución acuosa de MeOH al 40 %. Las condiciones de elución para la columna se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de elución para cromatografía en columna Lobar.

Fase móvil (% MeOH)	Volumen (mL)	Flujo (mL min⁻¹)	Clave de identificación
40	200	2.5	Fr. 40 %
50	200	2.5	Fr. 50 %
55	250	2.5	Fr. 55 %
100	200	2.5	Fr. 100 %

Se colectó el eluato de cada fase móvil en matraces erlenmeyer de 250 mL y posteriormente se eliminaron los disolventes con ayuda de un rotavapor. Los extractos obtenidos se recuperaron con MeOH en viales de 4 mL y se identificaron como se indica en la tabla 8. Una vez secos, los extractos se analizaron por CCF de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.4.

Una vez seco, 100 mg de la Fr. 55 % se disolvieron en 100 µL de una solución acuosa de MeOH al 40 % y se sembraron en una columna de vidrio (210 mm de largo x 10 mm diámetro interno) empacada con C₁₈ (LiChroprep RP-18, 40-63 µm), previamente acondicionada con 100 mL de una solución acuosa de MeOH al 40 %. Las condiciones de elución para la columna se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de elución para cromatografía en columna de la Fr. 55 %.

Fase móvil (% MeOH)	Tiempo (min)	Flujo (mL min⁻¹)
40	60	0.50
50	60	0.50
60	60	0.50
100	60	1.00

A partir de la fase móvil compuesta por una solución acuosa de MeOH al 50 %, se colectaron 120 fracciones de 0.5 mL cada una. Estas se analizaron por CCF de acuerdo con

lo descrito en el punto 2.4 y las fracciones que presentaron una mancha con un factor de retardo (R_F) correspondiente al hepatodamianol se prepararon para su análisis por HPLC, con las condiciones descritas en el punto 2.5.1.

Las muestras cuyos cromatogramas mostraron un pico mayoritario con tiempo de retención (t_R) igual a 23 min, correspondiente al hepatodamianol, se colectaron en un matraz bola y se eliminó el disolvente con ayuda de un rotavapor. Posteriormente el residuo se recuperó con MeOH en un vial de vidrio de 4 mL. Este residuo constituye la fracción rica en hepatodamianol.

2.7.2 Cromatografía de exclusión molecular

La fracción rica en hepatodamianol obtenida en el punto 2.7.1 se disolvió en 100 μ L de MeOH y se sembró en una columna de vidrio (190 x 5 mm) empleando como fase estacionaria Sephadex G20 y MeOH como fase móvil. Se colectaron 30 fracciones de 0.5 mL cada una y se prepararon para su análisis por HPLC, de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.5.1.

Aquellas muestras cuyo cromatograma mostró un pico mayoritario con t_R correspondiente al hepatodamianol se mezclaron. El hepatodamianol obtenido se recuperó en un vial ámbar de 4 mL, se liofilizó a -40 °C y una presión de 1.33×10^{-3} mbar durante 24 h y se guardó en congelación hasta su posterior uso.

2.7.3 Análisis de la pureza del hepatodamianol

La pureza del hepatodamianol aislado se determinó mediante análisis por HPLC, de acuerdo con las condiciones descritas en el punto 2.5.3. Se empleó el método de normalización interna, para lo cual se realizó la sumatoria del área de todas las señales presentes en el cromatograma y el porcentaje de pureza se tomó como la relación del área del pico del hepatodamianol respecto a la suma de las áreas de todas las señales presentes en el cromatograma.⁵⁵ El análisis se realizó por triplicado.

Además, también se evaluó la pureza del hepatodamianol mediante ^1H -RMN. Para ello 2 mg de hepatodamianol se disolvieron en un matraz de aforación de 1 mL y se llevó a la marca de aforo con MeOH deuterado. El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro de RMN Bruker Avance III de 400 MHz equipado con una sonda BBO SmartProbe con gradiente en el eje z. Se obtuvo un espectro de ^1H con las condiciones reportadas por Parra y cols. y la concentración de la solución en mmol L⁻¹ se determinó mediante el módulo de ERETIC 2, disponible en el software TopSpin 3.5.⁵⁶ Posteriormente, esta concentración se relacionó con el peso molecular del hepatodamianol (576.1557 g mol⁻¹) y la cantidad de hepatodamianol pesado para así obtener el porcentaje de pureza, de acuerdo con la ecuación (1).

$$\% \text{ pureza} = \left(\frac{[\text{mg mL}^{-1}]}{\text{mg hepatodamianol pesados}} \right) * 100 \quad (1)$$

Las señales empleadas para determinar la pureza fueron la del CH₃-6''' (δ = 0.70 ppm), CH₃-6'' (δ = 1.60 ppm) y CH-3 (δ = 6.64 ppm).⁵⁷ El análisis se realizó por triplicado.

2.8 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD

La validación del método de cuantificación por HPLC-DAD descrito en el punto 2.5.3 se realizó de acuerdo con los lineamientos indicados en la Guía de Validación de Procedimientos Analíticos de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH).⁵⁸ Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Se preparó una solución stock de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hepatodamianol en una solución acuosa de DES al 60 %. Para preparar las soluciones de trabajo de la curva de calibración (5 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se realizaron diluciones de la solución stock de hepatodamianol con DES al 60 % en agua, y posteriormente se realizó una segunda dilución (factor de dilución de 1:2) con agua.

2.8.1 Linealidad

Se preparó una curva de calibración por estándar externo por triplicado. Los niveles de la curva de calibración fueron de 5, 20, 40, 70 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir del área del pico de hepatodamianol se construyó un gráfico de concentración vs respuesta (área del pico). Se realizó un análisis de regresión y se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de los factores de respuesta de acuerdo con la ecuación (2).

$$\% \text{ DER} = \frac{s}{\bar{x}} (100) \quad (2)$$

Donde:

% DER = desviación estándar relativa en porcentaje

s = desviación estándar del set de datos

$\bar{X}$ = promedio del set de datos

2.8.2 Precisión

La precisión del sistema se evaluó a través del % DER de la respuesta de cada nivel de concentración, empleando la ecuación (2). La precisión del método se evaluó mediante el % DER de la respuesta de hepatodamianol adicionado a 15 y 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a una muestra de extracto metanólico crudo de raíz de *Chrysactinia mexicana*, comúnmente conocida como falsa damiana. El extracto de *C. mexicana* fue donado por el Dr. Luis Alejandro Pérez López.

2.8.3 Exactitud

La exactitud del sistema se evaluó mediante un análisis de regresión de la concentración teórica de las soluciones de la curva de calibración vs la concentración recalculada con la ecuación obtenida de la curva de calibración.

La exactitud del método se determinó a través del porcentaje de recobro. Para ello se analizó por triplicado una muestra de falsa damiana (la cual no contiene hepatodamianol) sin adicionar y adicionada con 15 y 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hepatodamianol. Este mismo procedimiento también hizo para una muestra de EE. El porcentaje de recobro se calculó con la ecuación (3).

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\text{concentración inicial} - \text{concentración final}}{\text{concentración añadida}} (100) \quad (3)$$

2.8.4 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) se calculó a partir de los datos de la curva de calibración, empleando la ecuación (4) y (5).

$$\text{Límite de detección} = \frac{3.3 \sigma}{s} \quad (4)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \sigma}{s} \quad (5)$$

Donde:

σ = desviación estándar residual de la línea de regresión

s = pendiente de la curva de calibración

2.9 Cultivo celular

2.9.1 Mantenimiento de las líneas celulares

Se descongeló una alícuota de las líneas celulares Vero y Hep G2 para propagarse en frascos de cultivo. Las células fueron cultivadas con medio D-MEM Advanced suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y glutamina y penicilina/estreptomicina al 1 % bajo condiciones estándar (37 °C, 5 % CO₂). Una vez alcanzada una confluencia del 70 – 80 % se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células dos veces con buffer de fosfatos en solución salina (PBS) y se agregó 1 mL de tripsina. Transcurridos 5 min de incubación se añadieron 6 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina. El medio se recuperó en un tubo de polipropileno de 15 mL para ser centrifugado durante 5 min a 2,000 rpm y 25 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el botón celular se recuperó para ser resuspendido en 1 mL de medio de cultivo.

2.9.2 *Conteo celular*

El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer. Para ello se preparó una dilución 1:10 de la suspensión celular de la siguiente manera: 20 μL de la suspensión celular, 170 μL de medio de cultivo y 10 μL de azul tripano. Se colocaron 10 μL de esta suspensión en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo. El número de células se calculó con base en la ecuación (6).

$$\text{células} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{\text{células contadas}}{4} * \text{Factor de dilución} * 10^4 \quad (6)$$

2.9.3 *Congelamiento de las líneas celulares*

A partir de la suspensión celular con el número de células conocido, se tomó una alícuota con 1×10^6 células. Esta se colocó en un criovial con 75 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector y SFB hasta alcanzar 1 mL. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido.

2.10 **Determinación de la citotoxicidad**

La citotoxicidad fue evaluada en células Vero y en células Hep G2 por el método de MTT.⁵⁹ Para ello se sembraron 5×10^3 células por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron durante 12 h. Posteriormente se retiró el medio y se añadieron 200 μL de la muestra a analizar. La tabla 10 indica el intervalo de concentraciones a evaluar para cada muestra. Las células se incubaron durante 48 h adicionales. Posteriormente se lavaron las células con PBS dos veces y se añadieron 200 μL de una solución de MTT 0.5 mg mL^{-1} . Las células se

incubaron durante 3 h a condiciones estándar y transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µL de DMSO. La placa se sometió a agitación durante 8 minutos a 25 rpm y posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm y 620 nm en un lector de placas. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento y como control positivo doxorubicina (88 µg mL⁻¹). El porcentaje de viabilidad celular calculado con la ecuación (7) se graficó en función de la concentración del EE; se realizó un análisis de regresión para calcular la concentración que genera un porcentaje de viabilidad celular del 50 % y así determinar la concentración citotóxica 50 (CC₅₀). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ de viabilidad celular: } \frac{(\text{absorbancia } 540 \text{ nm} - \text{absorbancia } 620) \text{ de células tratadas}}{(\text{absorbancia } 540 \text{ nm} - \text{absorbancia } 620) \text{ de células control}} (100) \quad (7)$$

Tabla 10. Intervalo de concentración de muestras probadas para determinar la CC₅₀.

Muestra	Intervalo de concentración
Extracto estandarizado libre	600 – 7.50 µg/mL
Extracto estandarizado en la formulación en polvo	Equivalente a 600 – 7.50 µg/mL del EE

2.11 Parámetros de control de calidad del extracto estandarizado

2.11.1 Contenido de hepatodamianol

Se determinó el contenido de hepatodamianol en el EE de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.5.3.

2.11.2 Determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó de acuerdo con lo reportado por Granados Guzmán.⁶⁰ Para ello se prepararon disoluciones del EE en un intervalo de concentraciones de 200 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en etanol. En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μL de cada concentración por triplicado. Posteriormente se añadieron 100 μL de una solución de DPPH, cuya absorbancia fue ajustada con etanol entre 0.70 y 0.80. La placa se incubó a temperatura ambiente bajo oscuridad durante 15 min. Transcurrido este tiempo se registró la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 540 nm.

Se utilizó como control positivo quercetina, en un intervalo de concentraciones de 30 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y como control negativo etanol. A partir de los resultados obtenidos se calculó la capacidad reductora de las muestras mediante la ecuación (8). Con los resultados de capacidad reductora se construyó un gráfico de porcentaje de reducción en función de la concentración y mediante un análisis de regresión se calculó la concentración efectiva 50 (CE_{50}), es decir, la concentración necesaria para generar un 50 % de reducción del radical DPPH.

$$\% \text{ de reducción} = \frac{\text{Absorbancia control negativo} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control negativo}} (100) \quad (8)$$

2.11.3 Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante la reacción con AlCl_3 , de acuerdo con la metodología descrita por Kumazawa con algunas modificaciones.⁶¹ En primer lugar, se realizó un barrido, tanto de rutina como del EE en metanol, así como de la solución resultante de la reacción de la rutina y el EE con el AlCl_3 .

El ensayo consistió en lo siguiente: se preparó una disolución del EE en metanol a una concentración de $400\ \mu\text{g mL}^{-1}$. En una placa de 96 pozos se colocaron $100\ \mu\text{L}$ de esta disolución por triplicado. Posteriormente se añadieron $100\ \mu\text{L}$ de una disolución de AlCl_3 al 1 % en agua. La placa se agitó durante 30 s y posteriormente se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 min. Transcurrido este tiempo se registró la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 405 nm. La cuantificación de flavonoides se hizo a partir de una curva de calibración de rutina disuelta en metanol, con un intervalo de concentración de 5 a $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ mediante la interpolación de la absorbancia de la muestra y los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina por g de muestra. Se realizó un blanco para cada nivel de concentración de rutina, así como para la muestra de EE, adicionando $100\ \mu\text{L}$ de agua en lugar del AlCl_3 .

2.11.4 Actividad hepatoprotectora *in vitro*

La evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vitro* se realizó en células Hep G2 utilizando como agente inductor de daño ácido valproico (AVP) a una concentración de 7 mM. En primer lugar, se evaluó el porcentaje de viabilidad celular de células expuestas a AVP en coadministración con el control positivo de silimarina a dosis de 10, 50, 100 y $150\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Para ello se sembraron 5×10^3 células por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron durante 12 h. A continuación, se retiró el medio y se añadieron $200\ \mu\text{L}$ de las soluciones de silimarina y se incubó durante 24 h adicionales. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS, se añadieron $200\ \mu\text{L}$ de una solución de MTT $0.5\ \text{mg mL}^{-1}$ y se incubó durante 3 h a condiciones estándar. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se añadieron $100\ \mu\text{L}$ de DMSO. La placa se sometió a agitación durante 8 min a 25 rpm y

posteriormente se midió la absorbancia a 540 y 620 nm en un lector de placas. El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la ecuación (7). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Una vez seleccionada la dosis de control positivo a evaluar, se procedió con la evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vitro* del EE. Para ello se sembraron 5×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos y se dejó incubar durante 12 h. Posteriormente se retiró el medio y se agregó el agente inductor de daño coadministrado con los tratamientos de acuerdo con la tabla 11. Transcurridas 24 h se cuantificó la actividad de la enzima AST liberada al medio mediante espectrofotometría. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 11. Grupos experimentales realizados en la evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vitro*.

Grupo	Tratamiento
1	Control sin daño
2	Control de daño (AVP 7 mM)
3	Control positivo (AVP 7 mM + silimarina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$)
4	AVP 7 mM + Extracto Estandarizado $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

2.11.5 Determinación de disolventes residuales

Se determinó la presencia de disolventes residuales mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), siguiendo los lineamientos de la guía 467 de la Farmacopea de Estados Unidos (USP).⁶² El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un detector de masas equipado con un cuadrupolo simple 5973

Inert. Se empleó una columna DB-WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) con helio como gas portador (flujo de 1 mL min^{-1}). La rampa de temperatura fue la siguiente: 40 °C por 20 min, luego 10 °C min^{-1} hasta 240 °C, y se mantuvo a 240 °C por 20 min. La temperatura del puerto de inyección fue de 140 °C, mientras que la del detector fue de 250 °C. Para el análisis se preparó una solución estándar de los disolventes empleados durante el proceso de manufactura del EE a la concentración máxima permitida de acuerdo con la guía 467 de la USP (tabla 12).

Tabla 12. Concentración máxima permitida de disolventes residuales en productos farmacéuticos de acuerdo con la guía 467 de la USP.

Disolvente	Concentración máxima permitida (ppm)
Acetato de etilo	5000
Acetona	5000
Cloruro de metileno	600
Etanol	5000
Metanol	3000

Para el análisis se prepararon soluciones acuosas de 10 mg mL^{-1} del EE y de su equivalente en la formulación en matraces de aforación de 10 mL. La totalidad de las muestras se vació en viales de *headspace* de 10 mL color ámbar; los viales se llevaron a baño de calentamiento a 80 °C durante 45 min y se tomaron 5 μL del espacio de cabeza para su inyección en el equipo. La adquisición de datos se realizó mediante barrido completo en un intervalo de 5 – 500 m/z, con una velocidad de 3.06 escaneos por segundo.

Para el análisis de resultados, se comparó el tiempo de retención de los picos cromatográficos resultantes; además, se comparó el espectro de masas de cada una de las señales cromatográficas respecto a la biblioteca NIST.

2.12 Formulación a base de nanopartículas poliméricas

Las NP poliméricas se prepararon con la técnica de nanoprecipitación, de acuerdo con la metodología desarrollada por Solis-Cruz con algunas modificaciones.⁶³ Se utilizó como formulación base una relación de 3:5 entre fase orgánica (FO) y fase acuosa (FA). Como FO se utilizó una mezcla de meOH:Acetona (1:1) y como FA agua. Se evaluó el aspecto físico de todas las formulaciones preparadas para monitorear su estabilidad a temperatura ambiente. El EE y los polímeros probados se disolvieron en la FO y una vez bien disueltos, esta solución se inyectó a la FA bajo agitación constante (60 rpm). Una vez formadas las NP los disolventes orgánicos se eliminaron mediante evaporación a presión reducida (35 °C, 120 rpm).

Como parte de los estudios de preformulación se evaluó de forma cualitativa la solubilidad del extracto en distintos disolventes. Para ello se pesó en viales de vidrio de 2 mL una cantidad determinada de EE y se añadió 1 mL de los disolventes indicados en la tabla 13. Los viales se colocaron en baño de agua sobre una placa de agitación magnética a una temperatura de 25 °C y 550 rpm durante 24 h. Aquellos casos en que transcurridas las 24 h el extracto no se encontraba completamente solubilizado, se realizó un ciclo de sonicación durante 5 min y, cuando por medio de este ciclo no se logró la solubilización del extracto, se dejó en agitación bajo las mismas condiciones durante 24 h adicionales. La prueba de solubilidad se realizó por duplicado para cada disolvente evaluado.

Tabla 13. Masa de EE pesado y disolventes empleados para la prueba de solubilidad.

Peso (mg)	Disolvente
1.03	Acetona
1.20	
1.94	Isopropanol
1.94	
4.33	Metanol
4.47	
3.42	Etanol
3.26	
3.12	Propilenglicol
2.13	
1.28	Isopropilmiristato
1.48	
2.25	Isopropanol:acetona (1:1)
2.24	

Una vez transcurrido el tiempo necesario para solubilizar el extracto, las muestras se dejaron en reposo para permitir que los componentes no solubilizados del extracto se asentaran por gravedad en el fondo del vial. Posteriormente se analizó mediante IR con transformada de Fourier el sobrenadante de cada una de las soluciones anteriormente mencionadas. Para la obtención de los espectros se realizaron 15 barridos en un intervalo de 4000 a 550 cm^{-1} . Además, se obtuvieron los espectros tanto del EE liofilizado, como de cada uno de los disolventes mencionados en la tabla 13.

2.12.1 Evaluación de parámetros a modificar para la obtención de las nanopartículas

Para obtener nanopartículas con tamaño y características fisicoquímicas adecuadas se varió el tipo y concentración de polímero, la presencia o ausencia de surfactante, la

composición de la fase orgánica, así como la proporción de fase acuosa y la cantidad de EE a incorporar. La tabla 14 muestra el intervalo de valores evaluado para cada variable.

Tabla 14. Variables evaluadas para la preparación de nanopartículas poliméricas.

Tipo de polímero	Concentración del polímero	Tipo y concentración de surfactante	Proporción de FA en la formulación	Proporción de MeOH en la fase orgánica	Composición de la FO
Eudragit E100	11.67 – 23.33 mg mL ⁻¹	Tween 80 0 – 1 %	0.57 – 0.67	0.20 – 0.67	MeOH:Acetona (1:1)
Eudragit L100 – 55	11.67 – 14.67 mg mL ⁻¹	Sin surfactante	0.63	0.50	Etanol, etanol:acetona (1:1) y MeOH:acetona (1:1)
Eudragit RS100	20 – 50 mg mL ⁻¹	Alcohol polivinílico 0 – 0.50 %	0.71	0.50	MeOH:Acetona (1:1)

2.12.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

La medición del tamaño e índice de polidispersión (IPD) de las NP elaboradas se realizó mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica empleando un ángulo de 90°; por otro lado, la determinación del potencial zeta se hizo mediante la técnica de microelectroforesis con láser Doppler. Ambas determinaciones se realizaron con un equipo Zetasizer Nano-Zs90 (Malvern Instruments), y cada determinación se realizó por triplicado.⁶⁴

La estimación de la eficiencia de encapsulación se hizo de forma indirecta, mediante comparación del área del pico cromatográfico de hepatodamianol respecto a una solución de EE de 2 mg mL⁻¹, la cual representa el 100 % del porcentaje de eficiencia de encapsulación. Para ello se centrifugó 1 mL de la dispersión acuosa de NP a 13,000 rpm durante 1 h para obtener el pellet de NP. Posteriormente, el pellet fue solubilizado en 1 mL de MeOH y se analizó por HPLC-DAD de acuerdo con las condiciones descritas en el punto 2.5.2. De esta manera, se obtuvo el área del pico cromatográfico correspondiente al hepatodamianol

incorporado en las NP. Por otro lado, se preparó una solución de 2 mg mL⁻¹ de EE en cada una de las FO indicadas en la tabla 14 para obtener el área equivalente a un 100 % de eficiencia de encapsulación. El porcentaje de eficiencia de encapsulación se estimó mediante la ecuación (9).

$$\% \text{ eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{área hepatodamianol en pellet}}{\text{área hepatodamianol en solución de 2 mg mL}^{-1}} (100) \quad (9)$$

2.13 Formulación en cápsulas rígidas de gelatina

Para elaborar la formulación en polvo, se pesó de forma individual cada uno de los componentes de la mezcla. Posteriormente los componentes se mezclaron con ayuda de un mortero y pistilo. Una vez bien homogenizada, las cápsulas fueron llenadas con la formulación en polvo utilizando una encapsuladora manual.

2.13.1 Estudios de preformulación.

Como parte de los estudios de preformulación se realizó un estudio de compatibilidad de los posibles excipientes a emplearse para la formulación en polvo a encapsular. Para ello se prepararon mezclas del EE con distintos excipientes en las proporciones que se mencionan en la tabla 15.

Tabla 15. Proporción de las mezclas de excipiente y EE para el estudio de compatibilidad.

Mezcla	Proporción
Almidón:EE	1:1
Ácido benzoico:EE	1:1
CaCO ₃ :EE	1:1
Carboximetil celulosa (CMC):EE	1:1
Manitol:EE	1:1
CMC:EE	1:1
Celulosa microcristalina (MCC):EE	1:1
SiO ₂ :EE	1:10
MCC:ácido benzoico:EE	1:1:1
SiO ₂ :ácido benzoico:EE	1:10:10
Formulación en polvo: EE:ácido benzoico:SiO ₂ :MCC	1:0.006:0.06:5

Se obtuvo el espectro de IR de las mezclas y de sus componentes individuales. Además, las mezclas se mantuvieron durante 30 días en un desecador (26.60 °C ± 0.52 °C, 16.71 % ± 0.49 % humedad relativa, HR) y se obtuvo semanalmente el espectro de IR para verificar la ausencia de cambios en el espectro. Los espectros se obtuvieron con 15 barridos en un intervalo de 4000 a 550 cm⁻¹.

Así mismo, se evaluaron las propiedades de flujo de la formulación en polvo. La densidad aparente y la densidad compactada de la formulación se evaluaron de acuerdo con el MGA 1031 de la FEUM.²³ Se pesó 1 g de la formulación en polvo y se vació en una probeta graduada de 10 mL. La densidad aparente se calculó con la ecuación (10). La densidad compactada se calculó empleando la misma muestra. La probeta fue impactada 250 veces desde una altura de 10 cm sobre una superficie plana y suave. La densidad compactada se calculó mediante la ecuación (11).

$$\text{densidad aparente (g/mL)} = \frac{\text{gramos de muestra}}{\text{volumen aparente sin asentar}} \quad (10)$$

$$\text{densidad compactada (g/mL)} = \frac{\text{gramos de muestra}}{\text{volumen final por asentamiento}} \quad (11)$$

A partir del volumen aparente sin asentar y del volumen final por asentamiento se calcularon las medidas de compresibilidad de un polvo. El índice de Carr se calculó mediante la ecuación (12), mientras que para el índice de Hausner se empleó la ecuación (13).

$$\text{Índice de Carr} = \frac{\text{Volumen aparente sin asentar} - \text{Volumen final asentado}}{\text{volumen aparente sin asentar}} (100) \quad (12)$$

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{\text{Volumen aparente sin asentar}}{\text{Volumen final asentado}} \quad (13)$$

El ángulo de reposo se determinó mediante el método de base fija.⁶⁵ Para ello se utilizó un tapón de goma con una base circular de 16 mm de diámetro. Encima de esta se colocó un embudo de plástico con una salida de diámetro de 12.30 mm. Se colocó 1 g de la formulación en polvo dentro del embudo y posteriormente se levantó el embudo lentamente y se dejó fluir la mezcla en polvo. Se midió la altura del polvo apilado sobre la base con ayuda de un vernier. El ángulo de reposo se calculó con la ecuación (14), donde h representa la altura del polvo apilado y D el diámetro de la base.

$$\text{Ángulo de reposo} = \tan^{-1} \frac{2h}{D} \quad (14)$$

2.14 Parámetros de control de calidad de la formulación en cápsulas rígidas de gelatina

Los parámetros de calidad de la formulación en polvo contenida en las cápsulas se evaluaron de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.11. Las muestras de la

formulación en polvo se prepararon de tal forma que contuvieran una concentración de EE equivalente a las indicadas en el punto 2.11. Por otra parte, los parámetros de calidad de la forma farmacéutica terminada fueron evaluados de acuerdo con lo descrito en la FEUM.²³

2.14.1 Uniformidad de peso

La evaluación de la uniformidad de peso se realizó de acuerdo con lo descrito en el MGA 0299 de la FEUM.²³ Para ello se pesó de forma individual 10 cápsulas para obtener el peso bruto de cada una de ellas. A continuación, se vació su contenido y se pesó cada unidad vacía de forma individual. Posteriormente se restó el peso de cada unidad vacía al peso bruto para obtener el peso neto individual de cada unidad. Se calculó el peso promedio y su % DER.

2.14.2 Valoración y uniformidad de contenido

La uniformidad de contenido se evaluó de acuerdo con lo establecido en el MGA 0299 de la FEUM.²³ La valoración del contenido de hepatodamianol se realizó de acuerdo con el método descrito en el punto 2.5.3. Para ello se vació el contenido individual de 10 cápsulas en un microtubo y se agitó para homogenizar la muestra. Posteriormente se pesaron 30 mg de la muestra en un microtubo y se adicionó 1 mL de la solución acuosa de DES al 60 %. La muestra se agitó con ayuda de un vórtex y posteriormente se centrifugó durante 5 min. Posteriormente se tomaron 500 µL del sobrenadante y se llevaron a un aforo de 1 mL con agua. Este procedimiento se realizó de forma individual con 10 cápsulas. Todas las

muestras fueron filtradas a través de una membrana de nylon antes de su inyección al cromatógrafo de líquidos.

Una vez analizadas las 10 muestras se calculó el valor de aceptación (VA) de acuerdo con la ecuación (15):

$$VA = \bar{X} - 101.5 + ks \quad (15)$$

Donde:

VA = valor de aceptación.

$\bar{X}$ = promedio de los contenidos individuales expresado como porcentaje.

k = constante de aceptabilidad, 2.4.

s = desviación estándar de la muestra.

2.14.3 Tiempo de desintegración

El tiempo de desintegración se evaluó de acuerdo con el MGA 0261 de la FEUM.²³ La prueba se realizó con sinker de canastilla con abertura de malla N.10 (2-3 mm); se colocó una cápsula por sinker en cada uno de los seis tubos de la canastilla del aparato de desintegración. Se utilizó como medio de inmersión agua purificada a una temperatura de 37 °C con 30 ciclos por minuto. La prueba se realizó por triplicado.

2.14.4 Perfil de disolución

El perfil de disolución se evaluó en un Aparato de disolución tipo II por triplicado. Como medio de disolución se empleó solución amortiguadora de acetatos a un pH de 4.50,

solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 6.80, una solución de HCl a un pH de 1.20 y agua. Se colocaron 500 mL del medio de disolución en los vasos del aparato y se llevó a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se colocaron las cápsulas en cada una de las canastillas y se hizo funcionar el aparato a una velocidad de 100 rpm. Se tomaron alícuotas de 5 mL a los 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min. Estas fueron filtradas a través de una membrana de nylon de 0.45 μm y se vaciaron en tubos cónicos de 15 mL. Las alícuotas de las muestras fueron liofilizadas para eliminar el agua y se sometieron al tratamiento de muestra correspondiente, de acuerdo con el método seleccionado en el punto 2.5.3.

Una vez obtenidos los datos de porcentaje de liberación (% F), los perfiles de disolución fueron comparados mediante el método del factor de similitud (f_2),⁶⁶ y se utilizó el complemento de Excel DDSolver para determinar el mecanismo de liberación del hepatodamianol de la formulación.⁶⁷ Los modelos evaluados fueron los siguientes: primer orden, Weibull, Hixson – Crowell, y Makoid – Banakar.⁶⁸ Para la selección del modelo que mejor se ajustó a los datos se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: coeficiente de determinación ajustado (r^2_{adj}), el criterio de información de Akaike (AIC), y el criterio de selección de modelo (MSC).⁶⁷

2.14.5 Límites microbianos

La evaluación de los límites microbianos se realizó de acuerdo con lo indicado en el MGA 0571 de la FEUM.²³ Para determinar la cuenta de organismos mesofílicos aerobios (OMA) y hongos filamentosos y levaduras (HL) se vació el contenido de 9 cápsulas (1 g de muestra total) en un tubo cónico de 15 mL estéril y se agregó el diluyente para obtener una

suspensión 1 a 10 de la formulación en polvo. Esta suspensión corresponde al producto de prueba. Se colocó 1 mL del producto de prueba en una placa Petri y posteriormente se vació el medio de cultivo de agar líquido; se homogenizó el contenido de la placa Petri y se dejó en reposo hasta que solidificó el medio. Finalmente, se incubó la muestra de acuerdo con las condiciones descritas en la tabla 16 y se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de producto.

En cada experimento se incluyó una prueba de aptitud, la cual consistió en una placa con el producto de prueba adicionado con un inóculo conocido del microorganismo de prueba y una placa control con el mismo inóculo sin el producto de prueba. Además, cada ensayo incluyó un control de esterilidad y un control de diluyente. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Tabla 16. Condiciones para la determinación de límites microbianos.

	Organismos mesofílicos aerobios	Hongos filamentosos y levaduras
Microorganismo de prueba	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Diluyente	Caldo soya tripticaseína	Caldo dextrosa Sabouraud
Medio de cultivo	Agar soya tripticaseína	Agar dextrosa Sabouraud
Condiciones de incubación	30-35 °C, durante 3 a 5 días	20-25 °C, durante 5 a 7 días

Para corroborar la ausencia de bacterias Gram negativas bilis tolerantes se preparó una suspensión 1:10 del producto de prueba en caldo soya tripticaseína y se incubó de 20 a 25 °C durante 3 a 5 h. Posteriormente se inoculó 1 mL de esta suspensión en 9 mL de caldo Mossel de enriquecimiento de enterobacterias y se incubó de 30 a 35 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se subcultivó en placas de agar glucosa rojo violeta bilis (VRBD) la suspensión del caldo Mossel y se dejó en incubación durante 24 h a 30 – 35 °C.

2.14.6 Determinación de estabilidad a largo plazo

La estabilidad de la formulación fue evaluada de acuerdo con las condiciones descritas en la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.⁶⁹ Las condiciones de almacenamiento fueron de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $60\% \pm 5\%$ HR.

Para generar la atmósfera con HR del $60\% \pm 5\%$ se utilizó una solución saturada de NaBr (% HR a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 57 %).⁷⁰ Se colocaron 150 mL de esta solución en un desecador de vidrio y la temperatura y % HR se verificó de manera diaria con ayuda de un termohigrómetro.

La estabilidad se evaluó tanto a nivel químico, como a nivel biológico. La estabilidad química se evaluó mediante la determinación del contenido de hepatodamianol, de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.5.3. Por otro lado, la estabilidad biológica se determinó mediante el ensayo de actividad hepatoprotectora *in vitro*, de acuerdo con lo descrito en el punto 2.11.4. Ambos análisis se realizaron por triplicado.

2.15 Ensayo de hepatoprotección *in vivo*

El modelo de hepatoprotección *in vivo* se realizó en ratas Wistar de entre 200 y 300 g de peso corporal, de acuerdo con lo reportado por Cordero y cols.⁷¹ El protocolo se registró ante la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, con la clave QA25-00002. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.⁷²

Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio ($24 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 12 h de ciclos de luz/oscuridad) y se alimentaron con croquetas comerciales estándar y acceso *ad libitum* a agua. Las ratas se dividieron en 5 grupos experimentales de acuerdo con lo indicado en la tabla 17.

Tabla 17. Grupos experimentales y dosis administradas vía orogástrica en el modelo de hepatoprotección *in vivo*.

Grupo experimental	Dosis administrada
Control sin daño	1000 μL de solución salina
Control con daño	1000 μL de solución salina
Control de hepatoprotección	70 mg kg^{-1} (en máximo 1000 μL) de silimarina
Tratamiento 1	70 mg kg^{-1} (en máximo 1000 μL) de EE
Tratamiento 2	Equivalente a 70 mg kg^{-1} (en máximo 1000 μL) de EE en la formulación en polvo contenida en las cápsulas.

El esquema de tratamiento consistió en lo siguiente: a todos los grupos experimentales, excepto el control sin daño, se les administró vía intraperitoneal una dosis de 500 mg kg^{-1} de AVP cada 24 h durante 4 días para la inducción de daño hepático. Se utilizó solución salina estéril como vehículo. De manera concomitante, se administró por vía oral, cada 24 h durante 7 días, cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 17, utilizando solución salina estéril como vehículo.

Una vez terminado el esquema de tratamiento los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con 10 mg kg^{-1} de xilacina y 100 mg kg^{-1} de ketamina y se sometieron a una laparotomía sobre mesa quirúrgica para la disección y extracción del tejido hepático y muestras de sangre de la arteria abdominal. A partir de la muestra de sangre se determinaron los niveles de la enzima AST.

2.16 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran como media $\pm$ desviación estándar (DE). La comparación de medias entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student, mientras que para comparación entre tres o más grupos se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguido de pruebas de comparación múltiple. Se tomó un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Obtención del EE

La tabla 18 muestra el porcentaje de recuperación del EE en cada etapa de su proceso de obtención.

Tabla 18. Porcentaje de recuperación para cada etapa de obtención del extracto estandarizado.

Nombre	Porcentaje de recuperación
Extracto crudo	12.48 %
Extracto sin clorofilas	65.72 %
Extracto estandarizado	45.16 %

3.2 Aislamiento de hepatodamianol

La figura 7A muestra una cromatoplaca representativa de la separación del EE, donde se indica con flechas la mancha correspondiente al hepatodamianol, identificada en la Fr. 55 %.

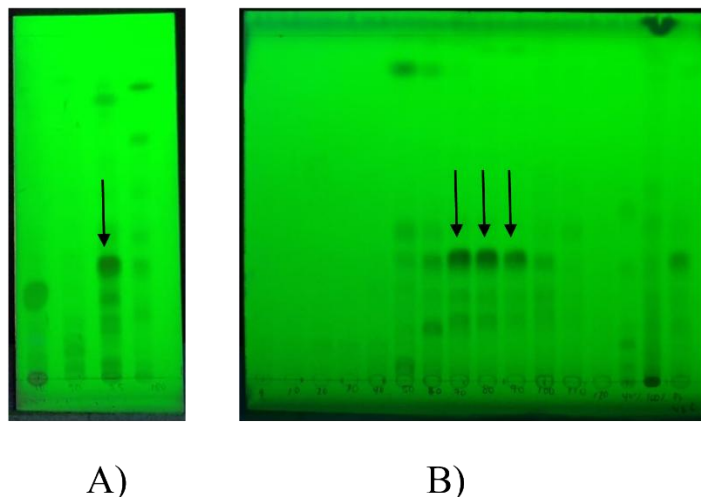


Figura 7. A) Cromatoplaqueta representativa de la separación del EE. B) Cromatoplaqueta representativa de la separación de la Fr. 55 %. Condiciones de análisis descritas en el punto 2.4.

Posteriormente la Fr. 55 % fue sometida a una segunda etapa de separación cromatográfica. La figura 7B muestra una cromatoplaqueta representativa de las fracciones obtenidas en esta etapa, donde se indica con una flecha las fracciones que contienen hepatodamianol.

Aquellas fracciones donde se identificó una mancha con R_F correspondiente al hepatodamianol se analizaron mediante HPLC-DAD y se mezclaron aquellas muestras cuyo cromatograma mostrara un pico mayoritario con t_R de 23 min, correspondiente al hepatodamianol. La figura 8 muestra el cromatograma obtenido a partir de esta etapa.

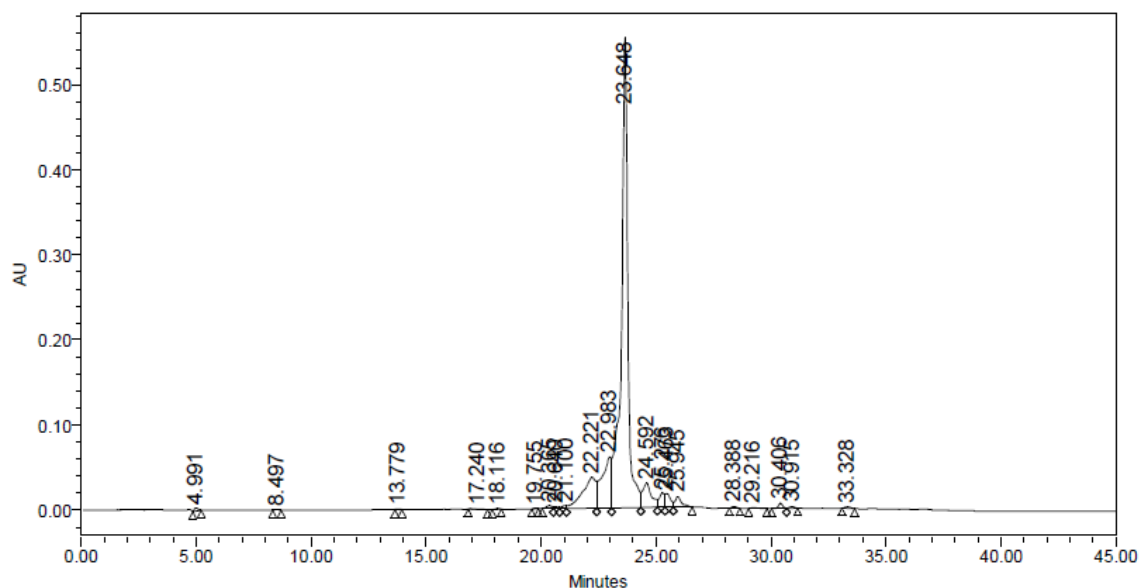


Figura 8. Cromatograma de la fracción enriquecida en hepatodamianol. $\lambda = 254$ nm. Columna Hypersil – Gold C₁₈, flujo de 0.40 mL min⁻¹. Condiciones cromatográficas descritas en la tabla 6.

Una vez seca, esta fracción se sembró en una columna de exclusión molecular de Sephadex G20 y las fracciones obtenidas se analizaron por HPLC. Aquellas fracciones cuyo cromatograma mostrara un pico mayoritario con un t_R correspondiente al hepatodamianol se mezclaron para así obtener el hepatodamianol aislado.

Las figuras 9 y 10 muestran el cromatograma y el espectro de ¹H-RMN del hepatodamianol aislado, respectivamente. Se obtuvieron 70 mg de hepatodamianol. La pureza calculada por HPLC-DAD fue de 78.08 ± 4.19 %, ($t_R = 29.95$ min), mientras que la pureza calculada por ¹H-RMN fue de 41.61 ± 0.71 %.

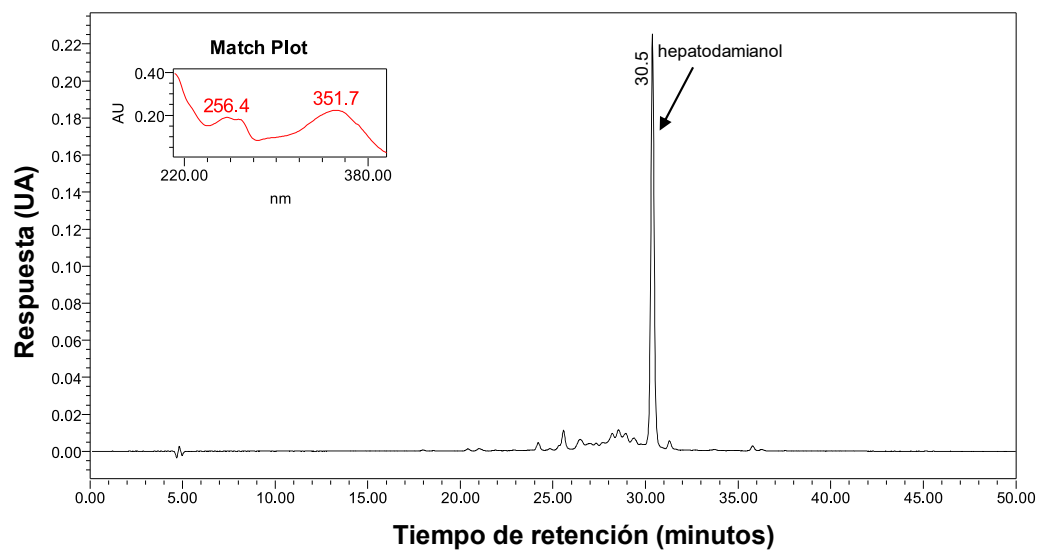


Figura 9. Cromatograma y espectro UV del hepatodamianol aislado. $\lambda = 350$ nm.
Columna Hypersil – Gold C₁₈, flujo de 0.40 mL min⁻¹. Condiciones cromatográficas
descritas en la tabla 7.

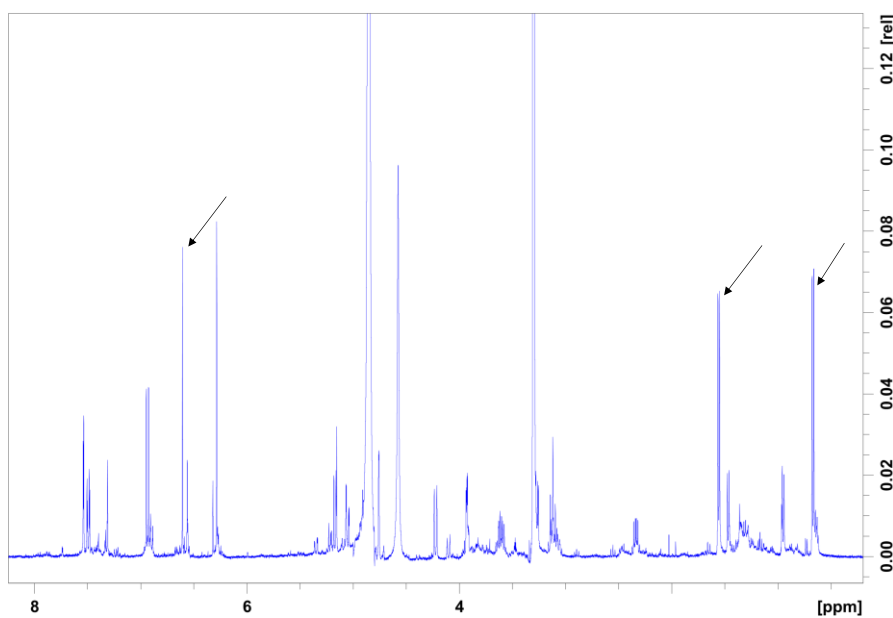


Figura 10. Espectro de ¹H-RMN a 400 MHz del hepatodamianol aislado en CD₃OD.
Las flechas indican las señales empleadas para determinar la pureza.

3.3 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD

La tabla 19 muestra los resultados para cada uno de los parámetros evaluados en la validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD descrito en el punto 2.5.3. La figura 11 muestra la curva de calibración obtenida durante la validación.

Tabla 19. Resultados de los parámetros de validación para el método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD.

Parámetro	Resultado (sistema)	Resultado (método)
Linealidad	$y = 28900.96 x - 25670.20$ $r^2 = 0.998$ % DER factores de respuesta = 5.66	-
Precisión	% DER intradía: 0.67 – 7.92 % DER interdía: 1.90 – 12.10	% DER intradía: 0.19 – 1.30 % DER interdía: 4.42 – 7.07
Exactitud	$m = 1.000$ $r^2 = 0.998$	% recobro: 97.16 – 98.78 (falsa damiana) 98.64 – 101.71 (EE)
Límite de detección	$0.87 \mu\text{g mL}^{-1}$	-
Límite de cuantificación	$4.45 \mu\text{g mL}^{-1}$	-

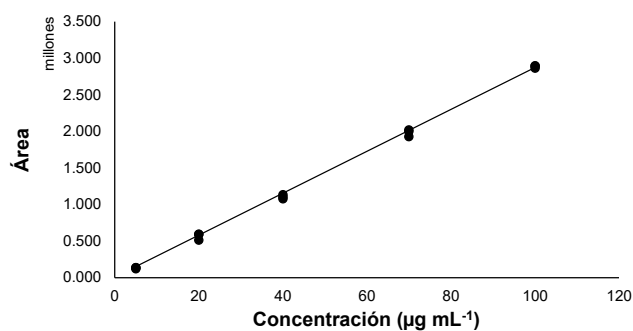


Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de hepatodamianol.

3.4 Parámetros de control de calidad del extracto estandarizado

3.4.1 Contenido de hepatodamianol en el EE

Se determinó el contenido de hepatodamianol en el EE de acuerdo con el método descrito en el punto 2.5.3. El análisis se realizó por triplicado y se encontró una concentración de 17.49 ± 0.50 mg de hepatodamianol por g de muestra. La figura 12 muestra un cromatograma representativo de la muestra analizada.

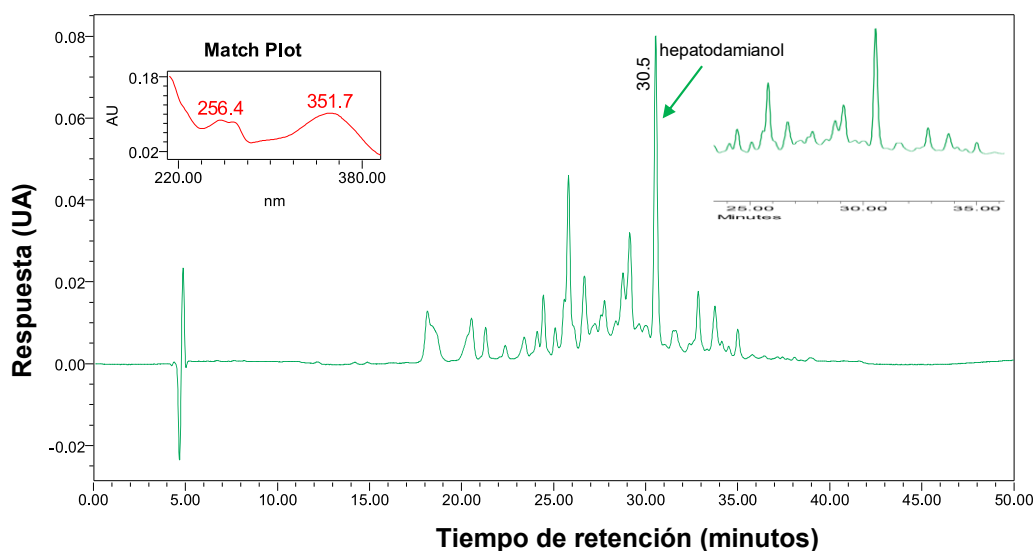


Figura 12. Cromatograma del EE. $\lambda = 350$ nm. Columna Hypersil – Gold C₁₈, flujo de 0.40 mL min^{-1} . Condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7.

3.4.2 Actividad antioxidante por el método de DPPH

La figura 13 muestra el gráfico de porcentaje de inhibición del radical DPPH en función de la concentración de Quercetina y de EE. La tabla 20 muestra los valores de CE_{50} calculados a partir del gráfico.

Tabla 20. Resultados de la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH.

Muestra	CE ₅₀
Quercetina	$6.48 \pm 0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$
EE	$53.43 \pm 1.03 \mu\text{g mL}^{-1}$

* $n = 3$. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE.

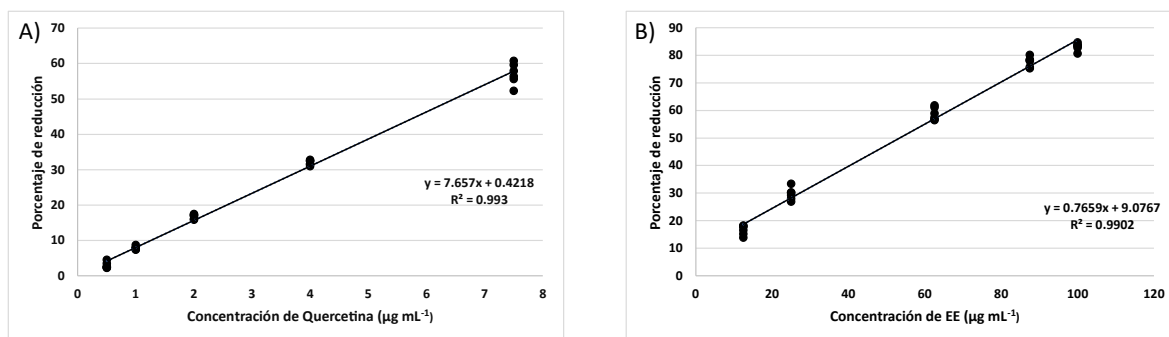


Figura 13. A) Gráfico de reducción del radical DPPH de Quercetina. B) Gráfico de reducción del radical DPPH del EE.

3.4.3 Determinación de flavonoides totales por el método de AlCl_3

En la figura 14 se observa el espectro de absorción de la rutina y del EE en la región de 300 a 580 nm, así como del complejo resultante de la reacción con AlCl_3 , mientras que la figura 15 muestra la curva de calibración de rutina empleada para la determinación de flavonoides totales en el EE. Se obtuvo una ecuación de la recta de $y=0.012x+0.045$, con un r^2 de 0.999. Al interpolar la absorbancia del EE en la curva de calibración y realizar los cálculos pertinentes, se determinó que el EE presenta una concentración de $206.23 \pm 3.39 \text{ mg}$ de flavonoides equivalentes a rutina por g de muestra.

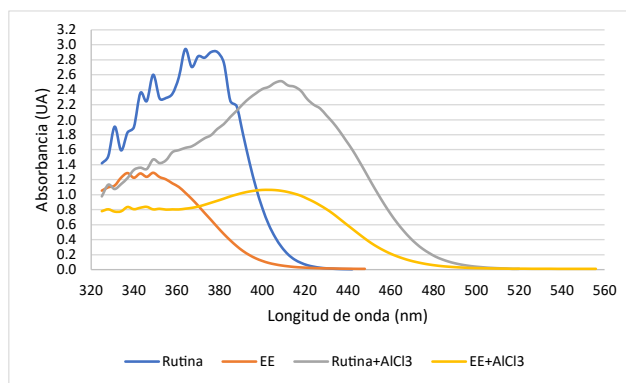


Figura 14. Espectro de absorción de rutina, EE y complejo con AlCl₃.

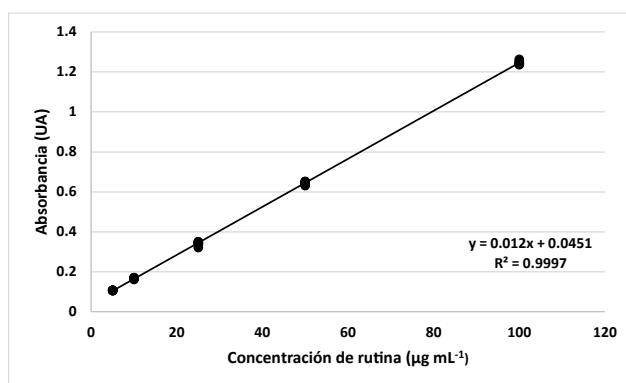


Figura 15. Curva de calibración de rutina para la cuantificación de flavonoides totales. $\lambda = 405 \text{ nm}$.

3.4.4. Actividad hepatoprotectora *in vitro*

La figura 16 muestra el porcentaje de viabilidad celular de células Hep G2 tras 24 h de exposición a AVP 7 mM coadministrado con silimarina en dosis de 10 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La prueba de ANOVA con post hoc de Tukey mostró que el grupo coadministrado con una dosis de silimarina de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($86.91 \pm 2.97 \%$ de viabilidad celular) presenta diferencia

significativa ($p < 0.001$) respecto al grupo control de daño de AVP 7 mM (69.58 ± 2.49 % de viabilidad celular).

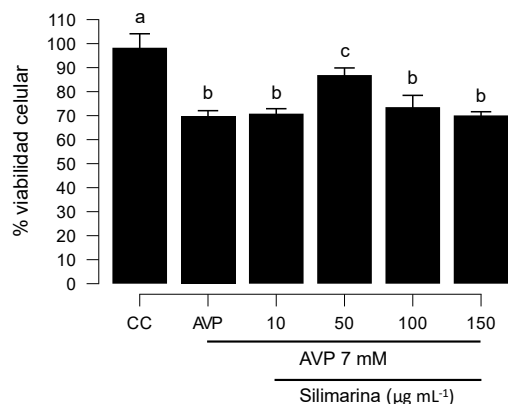


Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular de células Hep G2 tras 24 h de exposición a AVP 7 mM. $n = 3$. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE. $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Tukey. Distintas letras denotan diferencia significativa entre los grupos.

La figura 17 muestra los resultados de la evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vitro*. La prueba de ANOVA con post hoc de Tukey mostró que el EE disminuye significativamente ($p < 0.001$) la actividad de la enzima AST liberada al medio (114.30 ± 8.15 U/L) en comparación con el grupo control de daño de AVP 7 mM (253.30 ± 30.55 U/L).

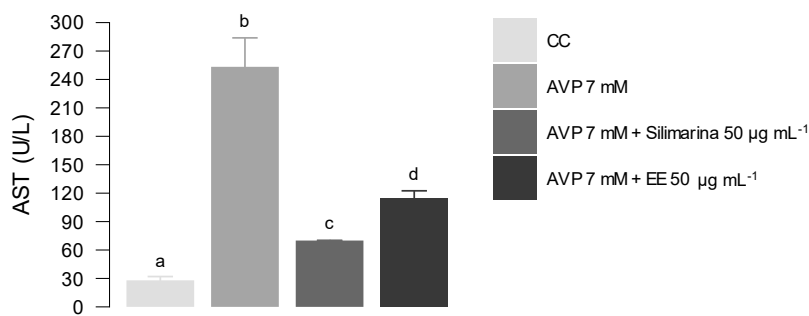


Figura 17. Efecto hepatoprotector *in vitro* frente al daño inducido por AVP 7 mM durante 24 h en células Hep G2. $n = 3$. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE. $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Tukey. Distintas letras denotan diferencia significativa entre los grupos.

3.4.5 Determinación de la presencia de disolventes residuales

La figura 18 muestra los cromatogramas sobrepuestos de la solución estándar con los disolventes buscados, así como del EE y de la formulación en polvo contenida en las cápsulas.

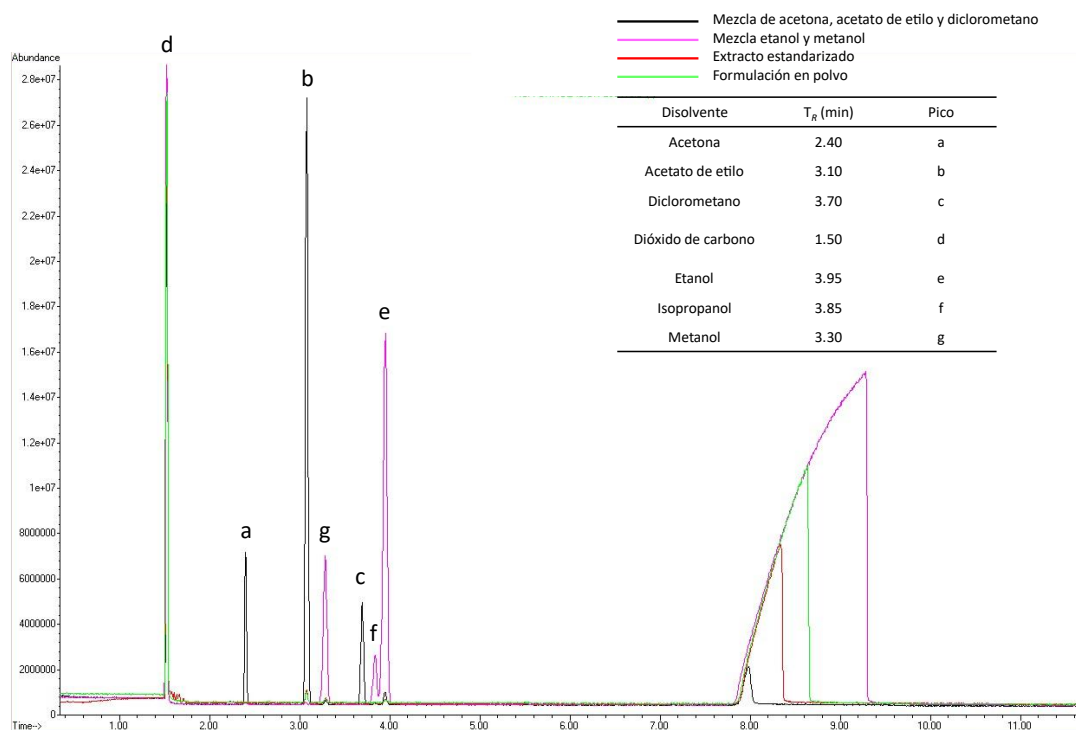


Figura 18. Cromatogramas sobrepuestos de las soluciones estándar con los disolventes buscados en la máxima concentración permitida de acuerdo con la USP y muestras analizadas.

3.5 Pruebas de Preformulación para la Elaboración de Nanopartículas

3.5.1 Prueba cualitativa de solubilidad del extracto estandarizado

Los espectros de IR del EE, así como de los disolventes y el sobrenadante de cada una de las soluciones preparadas se muestran en el anexo I. El EE se consideró como soluble cuando las señales en el espectro del sobrenadante coincidieran con las señales del espectro del EE. Con base en estos resultados, la tabla 21 muestra los resultados de solubilidad del EE en los disolventes probados.

Tabla 21. Solubilidad del extracto estandarizado en los disolventes evaluados.

Disolvente	Peso promedio de EE (mg, $n = 2$)	Presencia de precipitado	Solubilidad mg mL^{-1}
Metanol	4.40	No	> 4.40
Etanol	3.34	Sí	< 3.34
Isopropanol	1.94	Sí	< 1.94
Acetona	1.12	Sí	< 1.12
Acetona:Isopropanol (1:1)	2.25	Sí	< 2.245
Propilenglicol	2.63	No	> 2.63
Isopropilmiristato	1.38	Sí	No soluble

3.5.2 Evaluación de parámetros a modificar para la obtención de las nanopartículas

3.5.2.1 Efecto de la concentración y tipo de polímero sobre el tamaño

Las figuras 19-21 muestran el efecto de la concentración de polímero empleado sobre el tamaño y el IPD.

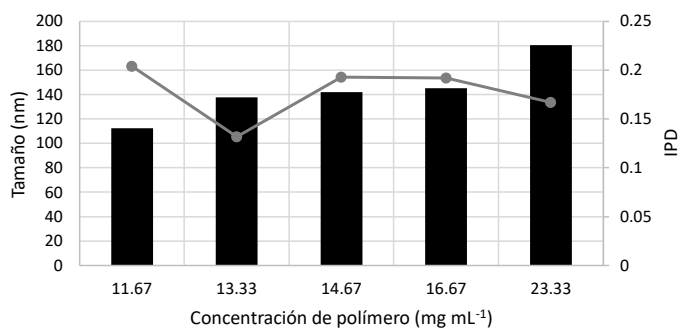


Figura 19. Tamaño e IPD de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit E100.

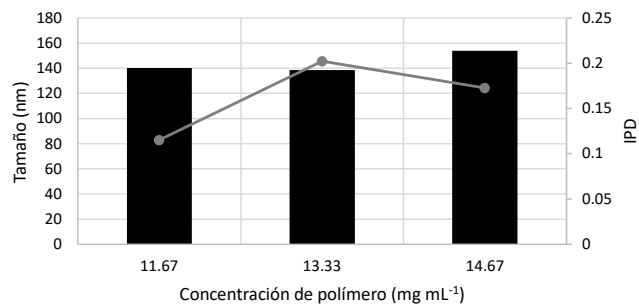


Figura 20. Tamaño e IPD de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit L100-55.

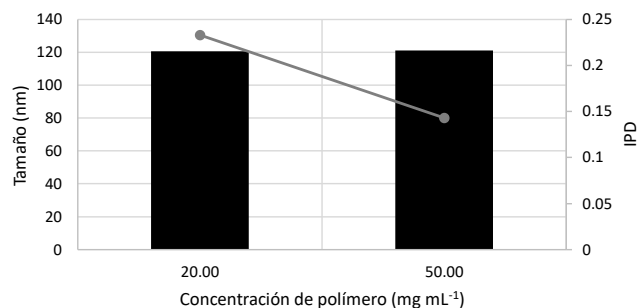


Figura 21. Tamaño e IPD de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit RS100.

3.5.2.2 Efecto de la concentración del surfactante

La figura 22 muestra el efecto de la presencia o ausencia de surfactante sobre el tamaño y potencial zeta de las NP. Todas las formulaciones elaboradas presentaron valores de IPD menores a 0.25. La concentración del polímero en la FO fue de 23.33 mg mL⁻¹ para Eudragit E100 y de 20 y 50 mg mL⁻¹ para Eudragit RS100.

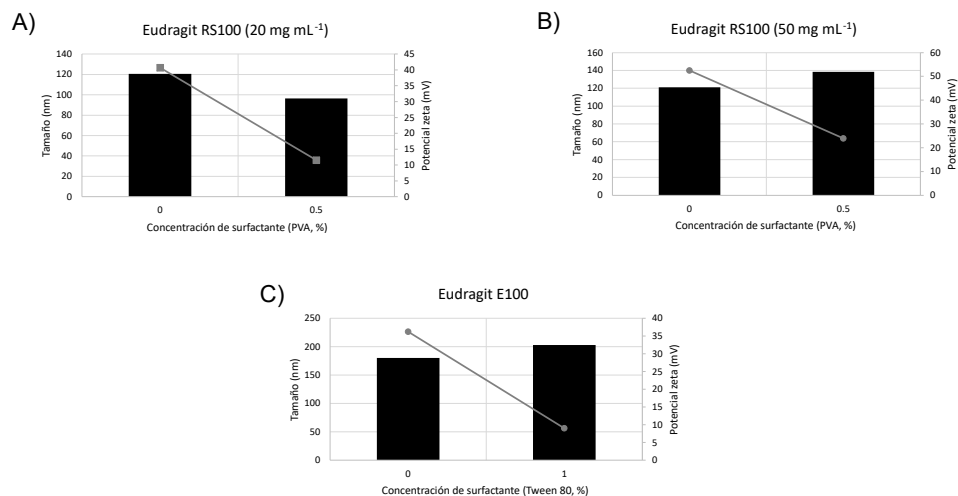


Figura 22. Tamaño y potencial zeta de las NP obtenidas con el polímero A) Eudragit RS100, 20 mg mL⁻¹. B) Eudragit RS100, 50 mg mL⁻¹, C) Eudragit E100, 23.33 mg mL⁻¹.

3.5.2.3 Efecto de la proporción de fase orgánica:fase acuosa

La figura 23 muestra el efecto de la proporción de la FA sobre el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas. Todas las formulaciones elaboradas presentaron valores de IPD menores a 0.25. Las nanopartículas se elaboraron con una concentración de surfactante Tween 80 al 1 % en la FA y una concentración de polímero de 23.33 mg mL⁻¹ en la FO.

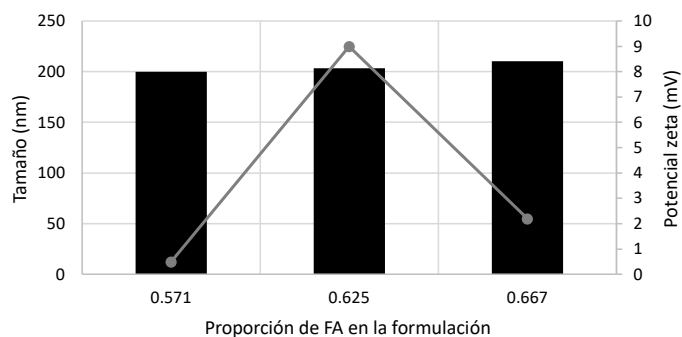


Figura 23. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit E100.

3.5.2.4 Efecto de la composición de la fase orgánica

La figura 24 muestra el efecto de la proporción de MeOH en la FO sobre el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas elaboradas con el polímero Eudragit E100. La tabla 22 muestra los resultados de IPD para estas formulaciones. Las nanopartículas de Eudragit E100 se elaboraron con una proporción de FA (Tween 1 %) de 0.67 y una concentración de polímero de 23.33 mg mL⁻¹ en la FO.

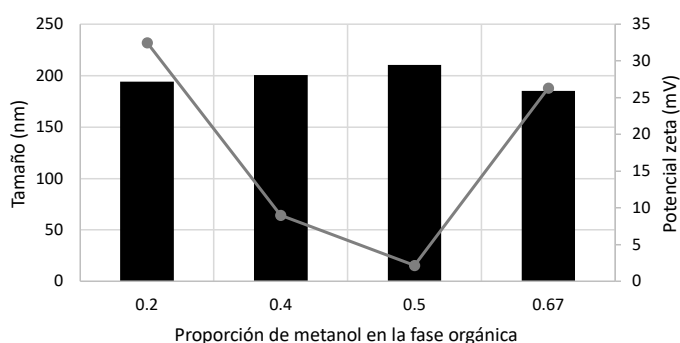


Figura 24. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit E100.

Tabla 22. IPD de las nanopartículas en función de proporción de MeOH en FO.

Polímero	Proporción de MeOH en la FO	Índice de polidispersión (IPD)
Eudragit E100	0.20	0.28
	0.40	0.16
	0.50	0.14
	0.67	0.25

Por otro lado, la figura 25 muestra el efecto de la composición de la FO sobre el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas elaboradas con el polímero Eudragit L100-55. El IPD de todas las formulaciones elaboradas fue menor a 0.25. Estas formulaciones fueron

elaboradas con una proporción de FA de 0.63, 14.67 mg mL⁻¹ de polímero y 2 mg mL⁻¹ de EE en la FO.

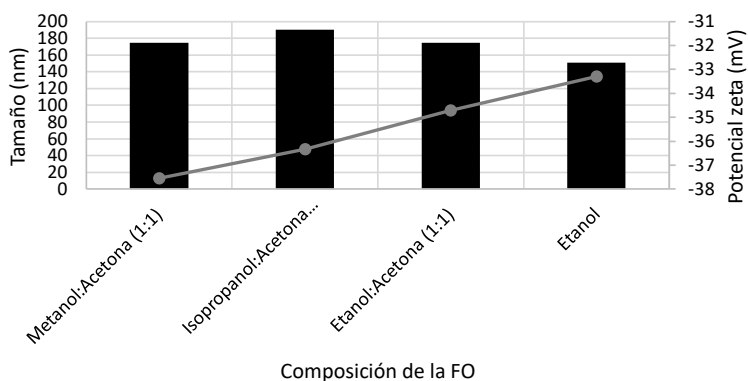


Figura 25. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas con el polímero Eudragit L100-55.

Las NP elaboradas con el polímero Eudragit E100 cargadas con EE presentaron cambios en su coloración a los pocos días, mientras que transcurridas aproximadamente tres semanas se observó una separación de fases con agregados notablemente visibles de polímero (figura 26).

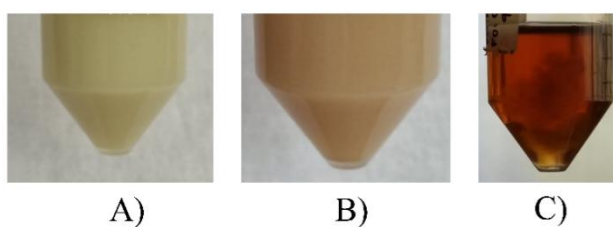


Figura 26. Nanopartículas poliméricas de Eudragit E100 cargadas con EE. A) día 2. B) día 16. C) día 22.

3.5.3 Estimación del porcentaje de eficiencia de encapsulación

Se estimó la eficiencia de encapsulación de hepatodamianol en las nanopartículas cargadas. Este análisis se realizó para las nanopartículas elaboradas con los polímeros Eudragit L100-55 (14.67 mg mL^{-1}) y Eudragit RS100 (20 y 50 mg mL^{-1}) con y sin alcohol polivinílico en la FA. Las figuras 27 y 28 muestran los resultados obtenidos.

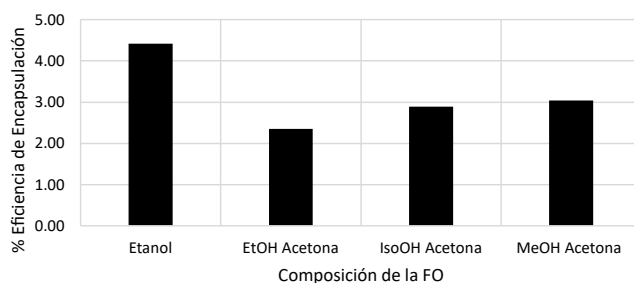


Figura 27. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de hepatodamianol en las nanopartículas elaboradas con el polímero Eudragit L100-55.

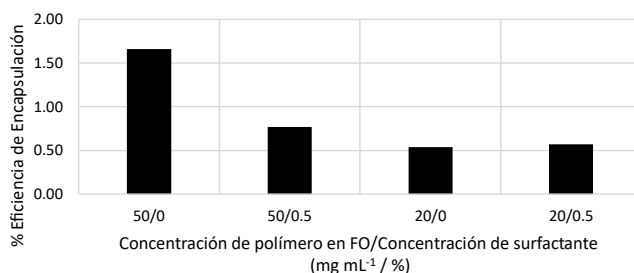


Figura 28. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de hepatodamianol en las nanopartículas elaboradas con el polímero Eudragit RS100.

Además, se observó crecimiento microbiano dentro de los frascos que contienen las NP elaboradas con el polímero Eudragit L100-55 (figura 29).

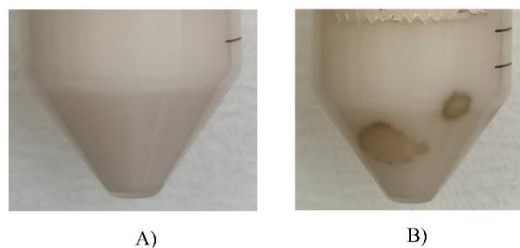


Figura 29. Nanopartículas poliméricas de Eudragit L100-55 cargadas con EE.

A) día 1. B) día 4 con crecimiento microbiano.

3.6 Pruebas de preformulación para las cápsulas rígidas de gelatina

Como parte de las pruebas de preformulación se realizaron estudios de compatibilidad entre los posibles excipientes a emplearse y el EE. Las figuras 30 – 39 muestran el espectro de IR del EE y de los excipientes, así como de sus mezclas. No se observa formación de nuevas bandas o señales en los espectros de las mezclas.

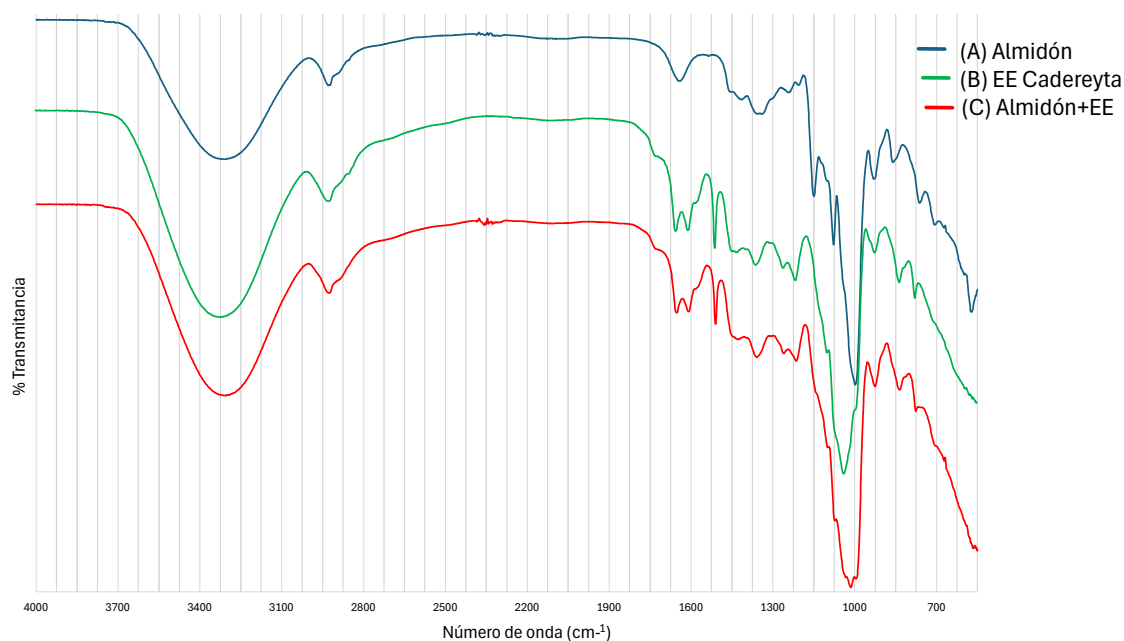


Figura 30. Espectro IR de (A) almidón, (B) EE y (C) la mezcla de estos.

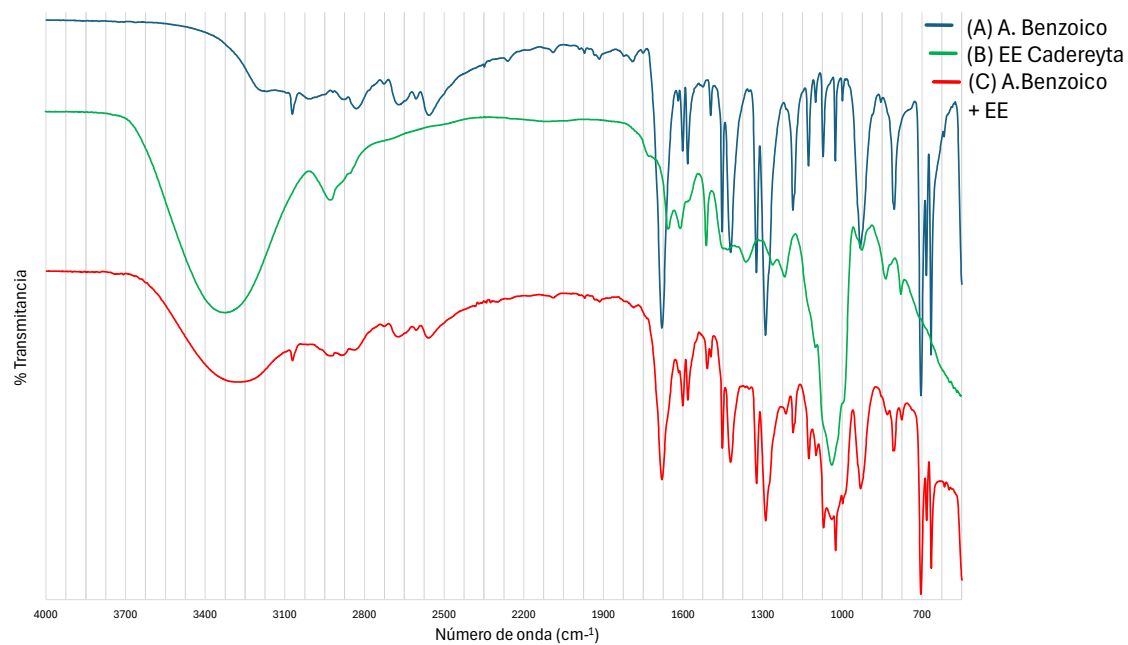


Figura 31. Espectro IR de (A) ácido benzoico, (B) EE y (C) la mezcla de estos.

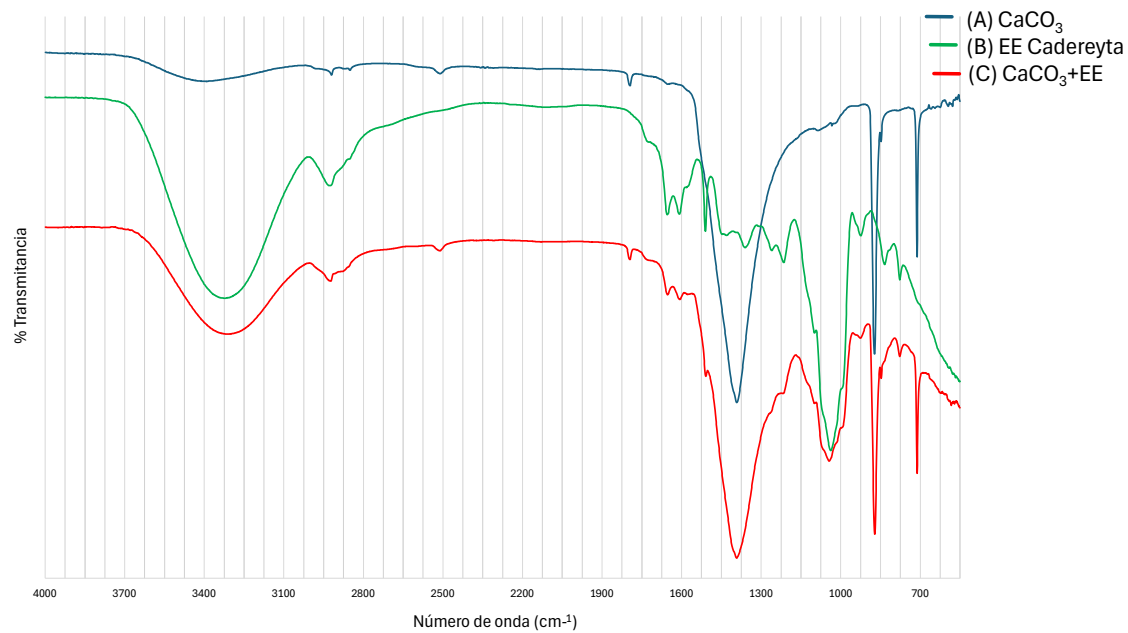


Figura 32. Espectro IR de (A) CaCO₃, (B) EE y (C) la mezcla de estos.

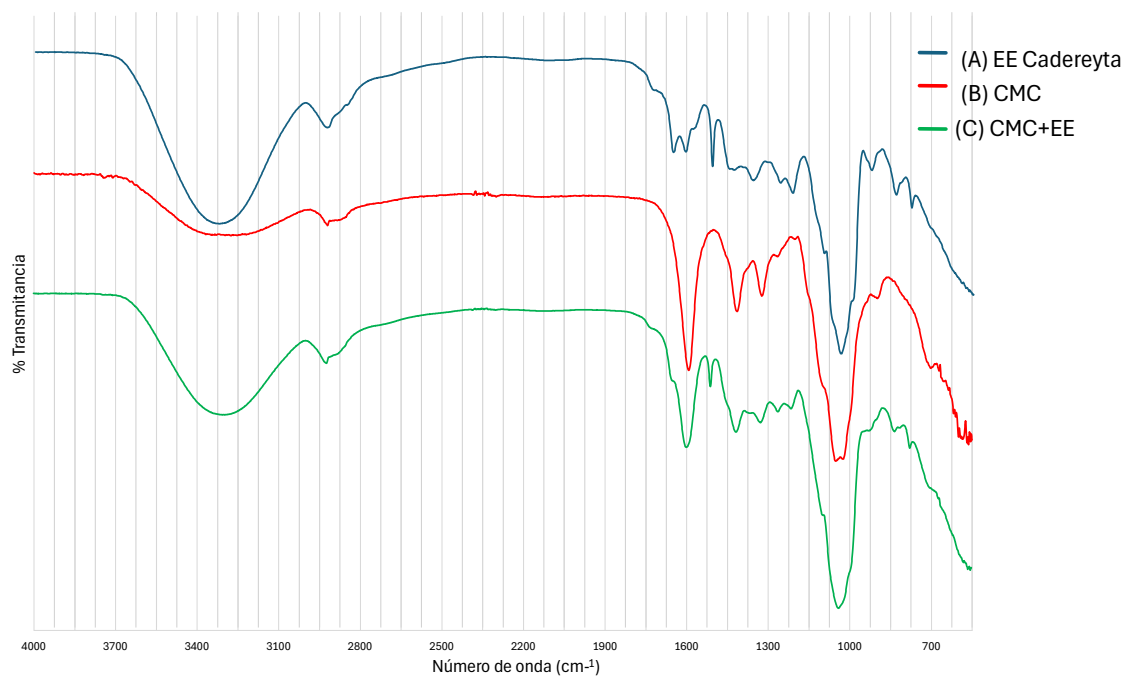


Figura 33. Espectro IR de (A) EE, (B) CMC y (C) la mezcla de estos.

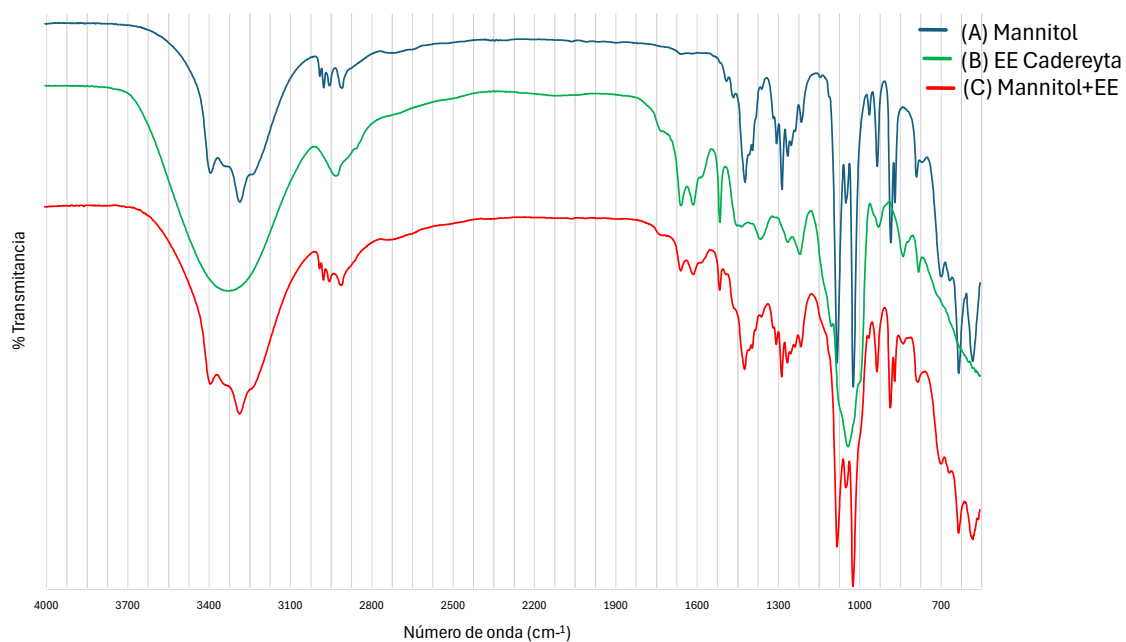


Figura 34. Espectro IR de (A) manitol, (B) EE y (C) la mezcla de estos.

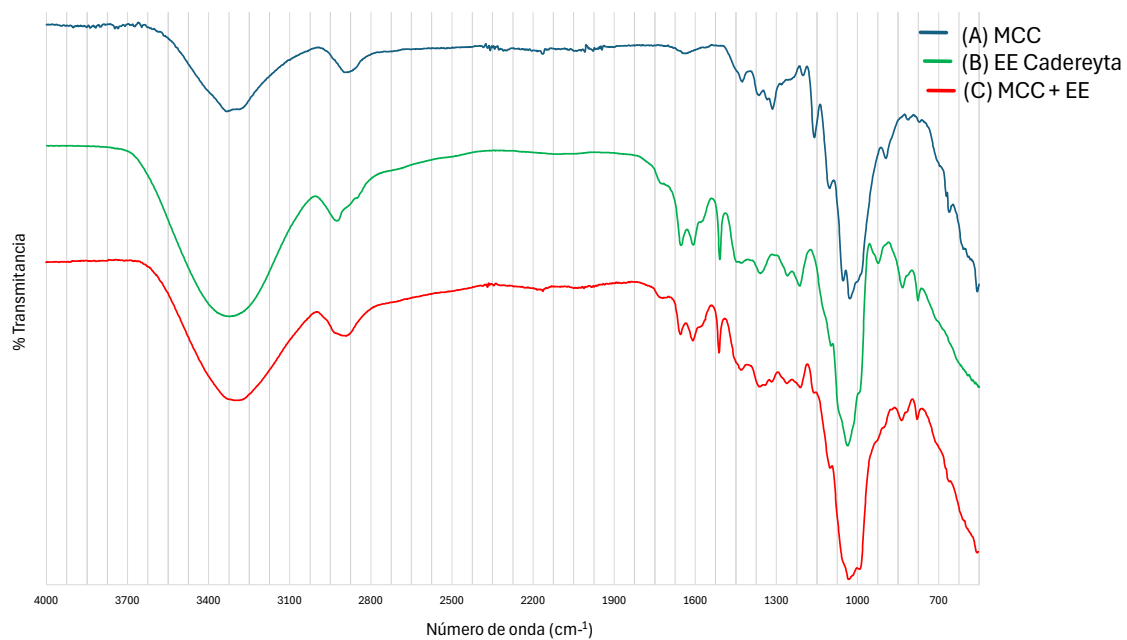


Figura 35. Espectro IR de (A) MCC, (B) EE y (C) la mezcla de estos.



Figura 36. Espectro IR de (A) SiO₂, (B) EE y (C) la mezcla de estos.

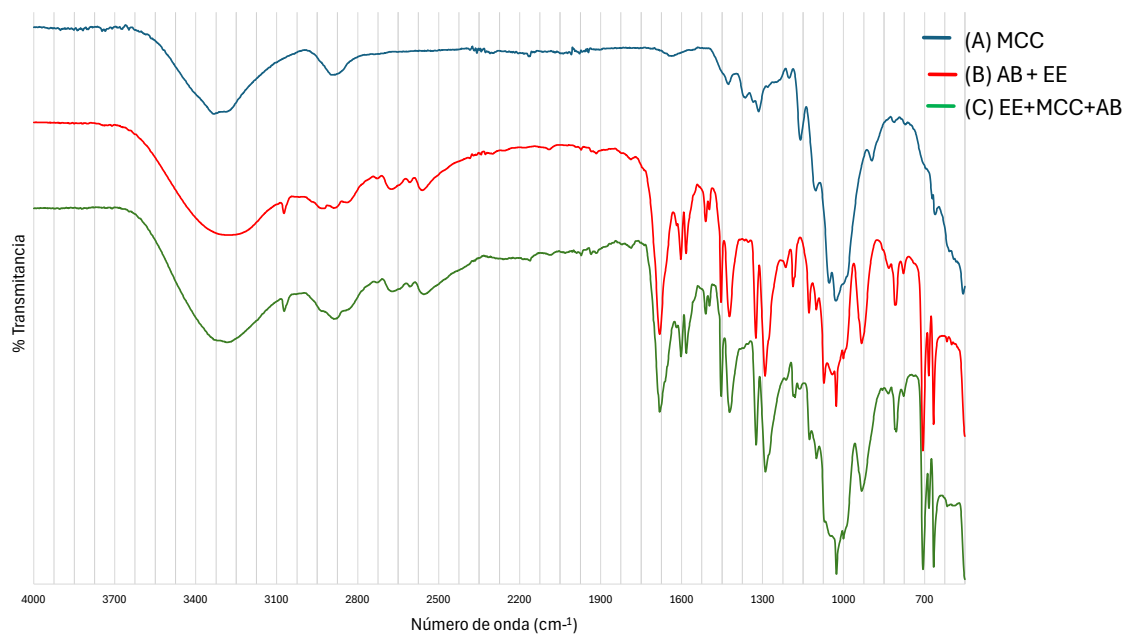


Figura 37. Espectro IR de (A) MCC, (B) mezcla de ácido benzoico y EE y (C) mezcla de MCC, ácido benzoico y EE.



Figura 38. Espectro IR de (A) SiO₂, (B) mezcla de ácido benzoico y EE y (C) mezcla de EE, SiO₂ y ácido benzoico.

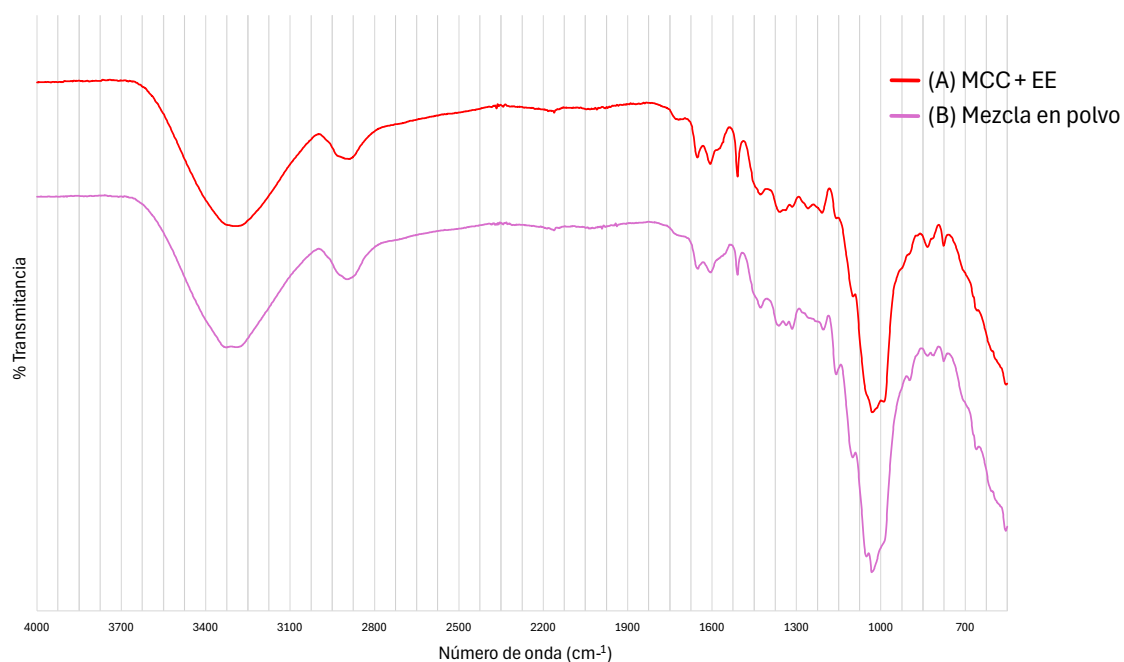


Figura 39. Espectro IR de (A) mezcla de MCC y EE y (B) formulación en polvo.

Debido a la naturaleza higroscópica del EE, se decidió utilizar como excipientes para la formulación SiO_2 al 1 % como agente antiapelmazante y MCC como adsorbente y diluyente, además de emplear ácido benzoico como conservador a una concentración del 0.10 %. La proporción de EE:MCC presente en la formulación en polvo fue de 1:5. Se determinaron las características de flujo de esta mezcla, las cuales se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Propiedades de flujo de la formulación en polvo.

Propiedad	Valor calculado
Densidad aparente	0.42 g/mL
Densidad compactada	0.50 g/mL
Índice de Carr	16.67
Índice de Hausner	1.20
Ángulo de reposo	55.65 °

3.7 Determinación de la citotoxicidad

La figura 40 muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad en las líneas celulares Hep G2 y Vero, tanto del extracto libre (figura 40 A y 40 C), como del extracto en la formulación en polvo (figura 40 B y 40 D). Debido a que ninguna de las concentraciones evaluadas, tanto para el extracto como para la formulación, provocó una disminución del porcentaje de viabilidad celular menor al 85 %, se determinó la $CC_{50} \gg 600 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas muestras, en ambas líneas celulares.

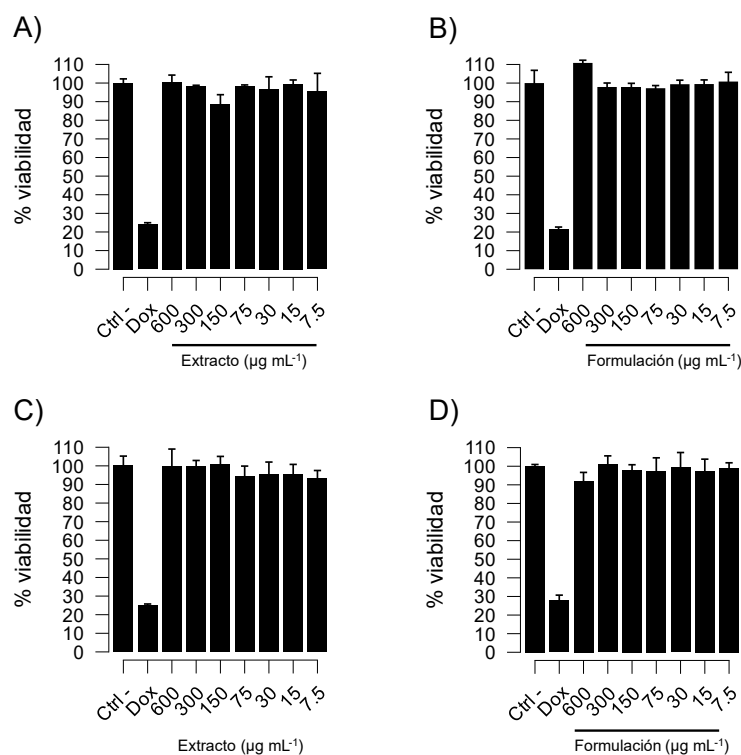


Figura 40. Porcentaje de viabilidad celular tras la exposición por 48 h. Células HepG2: A) extracto estandarizado libre. B) masa equivalente de extracto en la formulación en polvo. Células Vero: C) extracto estandarizado libre. D) masa equivalente de extracto en la formulación en polvo. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE, $n = 3$.

3.8 Parámetros de control de calidad de la formulación en cápsulas rígidas de gelatina

La tabla 24 muestra los resultados de CE_{50} , contenido de flavonoides totales y actividad hepatoprotectora *in vitro* del EE libre y su equivalente en la formulación en polvo. La prueba t de Student no mostró diferencias significativas entre el EE y la formulación en polvo para los parámetros evaluados.

Tabla 24. Resultados de los parámetros de calidad del extracto estandarizado antes y después de incorporarlo en la formulación en polvo.

Muestra	Reducción de DPPH (CE_{50})	Contenido de flavonoides totales ($mg\ g^{-1}$)	Actividad hepatoprotectora <i>in vitro</i> (AST, U/L)	Presencia de disolventes residuales
EE libre	$53.43 \pm 1.03\ \mu g\ mL^{-1}$	$206.23 \pm 3.39\ mg\ eq.\ rutina$	114.30 ± 8.15	Cumple
EE en la formulación en polvo	$57.66 \pm 1.28\ \mu g\ mL^{-1}$	$191.34 \pm 6.29\ mg\ eq.\ rutina$	116.00 ± 3.61	Cumple

* $n = 3$. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE. Prueba t de Student, $p > 0.05$.

3.8.1 Uniformidad de peso

La tabla 25 muestra los resultados de la prueba de uniformidad de peso.

Tabla 25. Resultados de la prueba de uniformidad de peso.

Número de cápsula	Peso bruto (mg)	Peso cápsula vacía (mg)	Peso neto (mg)
1	195.80	56.10	139.70
2	192.60	55.90	136.70
3	194.70	56.40	138.30
4	196.90	57.90	139.00
5	190.20	58.20	132.00
6	192.90	55.80	137.10
7	188.10	55.20	132.90

Tabla 25. (continuación).

8	197.30	56.20	141.10
9	196.50	56.10	140.40
10	195.60	57.50	138.10
Promedio	194.00	57.00	138.00
DE	0.003	0.001	0.003
% DER	1.58	1.75	2.19

3.8.2 Valoración y uniformidad de contenido

La tabla 26 muestra los resultados de la valoración de hepatodamianol en las cápsulas, así como los resultados del análisis de uniformidad de contenido.

Tabla 26. Resultados de la valoración de hepatodamianol y uniformidad de contenido.

Muestra	mg hepatodamianol/cápsula	% de la cantidad declarada
1	0.41	99.95
2	0.40	99.04
3	0.44	106.80
4	0.45	109.45
5	0.42	103.86
6	0.40	98.54
7	0.43	106.16
8	0.44	108.29
9	0.43	104.70
10	0.40	97.87
Promedio	0.42	103.47
DE	0.02	4.30
% DER	4.16	4.16
VA	-	12.29

3.8.3 Tiempo de desintegración

El tiempo promedio de desintegración de las cápsulas fue de 2'31", con un tiempo mínimo de desintegración de 2'12" y un tiempo máximo de desintegración de 2'53". El anexo IV muestra fotografías del aspecto y montaje del equipo de desintegración, así como el reporte de análisis emitido.

3.8.3 Perfil de disolución

La figura 41 muestra los gráficos del perfil de disolución de hepatodamianol en los distintos medios probados, mientras que la tabla 27 muestra los valores obtenidos de f_2 en las distintas comparaciones realizadas.

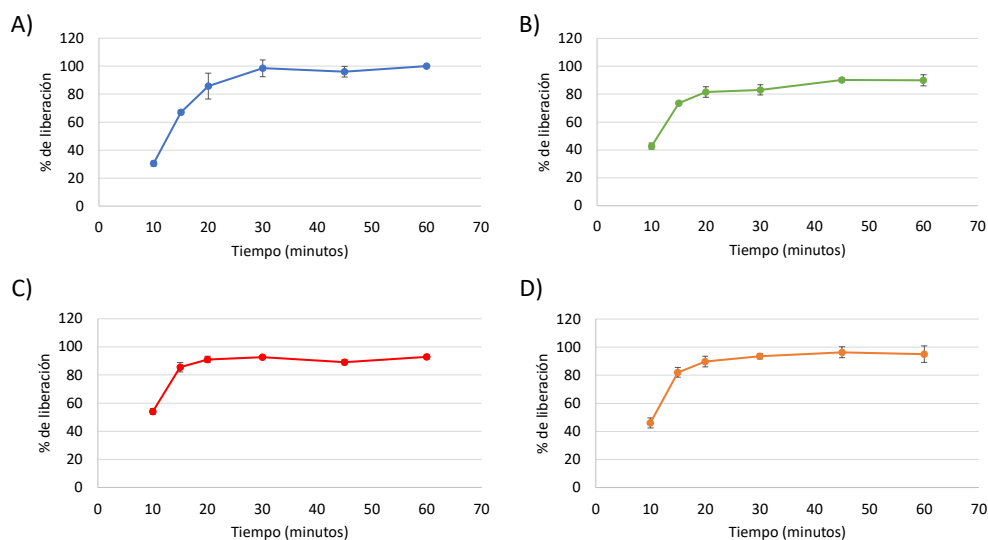


Figura 41. Gráfico del perfil de disolución de hepatodamianol. A) agua, B) HCl pH 1.2, C) buffer de acetatos pH 4.5 y D) buffer de fosfatos pH 6.8.

Tabla 27. Comparación de los perfiles de disolución por el método del factor de similitud.

Medio de referencia	Medio de Prueba	Factor f_2	Similar
Agua	HCl (pH 1.2)	53.40	si
	Buffer de acetatos (pH 4.5)	44.83	no
	Buffer de fosfatos (pH 6.8)	37.81	no
HCl (pH 1.2)	Buffer de acetatos (pH 4.5)	55.53	si
	Buffer de fosfatos (pH 6.8)	50.85	si
	Agua	50.18	si
Buffer de acetatos (pH 4.6)	Buffer de fosfatos (pH 6.8)	64.42	si
	Agua	44.83	no
	HCl (pH 1.2)	57.21	si

La tabla 28 muestra los valores arrojados por el complemento DDSolver para cada uno de los modelos evaluados. El anexo V muestra las figuras de los gráficos de mejor ajuste arrojados por el complemento DDSolver para cada uno de los modelos evaluados.

Tabla 28. Resultados de la evaluación de bondad de ajuste para los modelos evaluados.

Modelo	Parámetro	medio (pH)			
		agua	1.20	4.50	6.80
Primer orden	r^2	0.81	0.81	0.81	0.71
	r^2_{adj}	0.81	0.81	0.81	0.71
	AIC	41.10	36.31	36.99	36.65
	MSC	1.37	1.33	1.37	0.93
Hixson-Crowell	r^2	0.87	0.72	0.80	0.52
	r^2_{adj}	0.87	0.72	0.80	0.52
	AIC	39.09	38.49	37.46	39.69
	MSC	1.70	0.97	1.30	0.43
Weibull	r^2	0.99	0.98	0.97	0.98
	r^2_{adj}	0.98	0.97	0.95	0.96
	AIC	28.62	25.59	27.94	25.32
	MSC	3.45	3.12	2.88	2.82
Makoid-Banakar	r^2	0.90	0.88	0.85	0.77
	r^2_{adj}	0.84	0.79	0.76	0.62
	AIC	41.04	37.76	39.31	39.19
	MSC	1.38	1.09	0.99	0.51

La tabla 29 muestra los valores de los parámetros arrojados por el complemento DDSolver para el modelo de Weibull en los 4 medios de disolución evaluados.

Tabla 29. Parámetros del modelo de Weibull para el perfil de disolución de hepatodamianol.

Parámetro	Medio (pH)			
	agua	1.2	4.5	6.8
α	67092.71	1.12	0.93	0.58
b	2.05	0.25	0.30	0.11
T_i	2.63	9.82	9.80	10.00

3.8.4. Límites microbianos

La tabla 30 muestra los resultados obtenidos en la prueba de límites microbianos. La figura 42 muestra imágenes representativas de los resultados de la prueba de bacterias Gram negativas bilis tolerantes.

Tabla 30. Resultados de la determinación de límites microbianos.

	UFC/g	Criterio de aceptación
Organismos mesofílicos aerobios	2×10^2	10^3 UFC/g o mL
Hongos filamentosos y levaduras	4×10^1	10^2 UFC/g o mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausencia por 1 g o 1 mL de producto

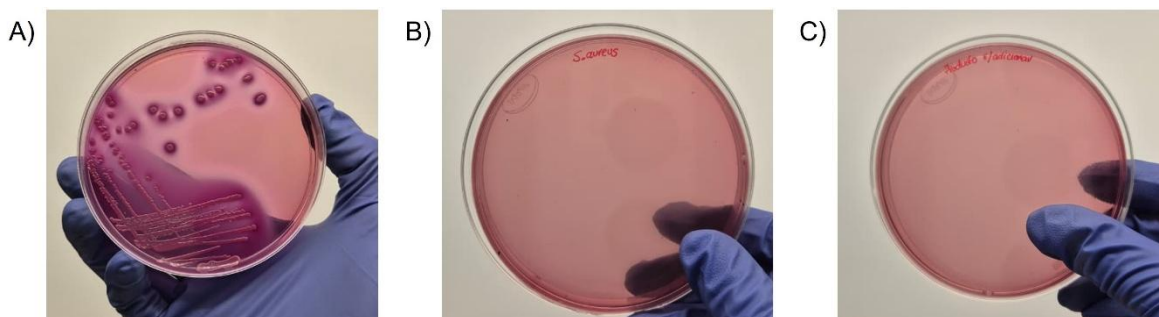


Figura 42. Agar VRBD después de 24 h de incubación. A) *Escherichia coli*. B) *Staphylococcus aureus*. C) Producto de prueba.

3.8.5 Estabilidad a largo plazo

La figura 43 A muestra los resultados de estabilidad química de la formulación elaborada. La prueba de ANOVA arrojó que no existe diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje del contenido de hepatodamianol a los seis meses de almacenamiento en comparación con la concentración inicial (94.96 ± 4.91 % de hepatodamianol al mes tres, 99.65 ± 1.90 % de hepatodamianol al mes seis); sin embargo, las muestras correspondientes a nueve y doce meses de almacenamiento presentan una disminución de poco más del 20 % del contenido de hepatodamianol respecto al mes cero (77.90 ± 4.63 % de hepatodamianol al mes nueve, 74.54 ± 2.91 % de hepatodamianol al mes doce).

Por otro lado, las figuras 43 B y 43 C muestran los resultados de estabilidad biológica de la formulación elaborada. La prueba de ANOVA con post hoc de Tukey mostró que existe diferencia estadísticamente significativa en los niveles de la enzima AST liberada al medio entre los grupos evaluados (119.67 ± 2.52 U/L mes cero, 137.33 ± 5.13 U/L mes tres, 173.00 ± 15.72 U/L mes seis, 183.81 ± 9.91 U/L mes nueve, 224.90 ± 14.98 U/L mes doce, 300.00

± 30.00 U/L ácido valproico, 78.000 ± 5.20 U/L), así como en el porcentaje de reducción en la liberación de la enzima AST respecto al control de daño ($60.11. \pm 0.84$ % mes cero, 54.22 ± 1.71 % mes tres, 42.33 ± 5.24 % mes seis, 38.73 ± 3.30 % mes nueve, 25.03 ± 5.00 % mes doce, 74.00 ± 1.73 % silimarina).

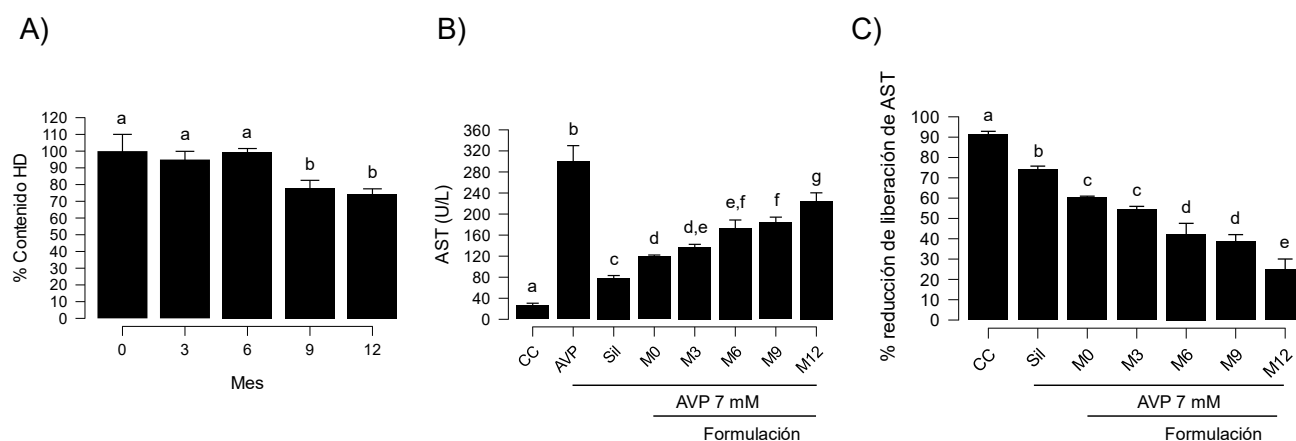


Figura 43. Estabilidad a largo plazo de la formulación. A) Porcentaje de contenido de hepatodamianol. B) Concentración de AST. C) Porcentaje de reducción de liberación de AST. $n = 3$. Los resultados se muestran como media $\pm$ DE. $p < 0.05$. ANOVA con post hoc de Tukey. Distintas letras denotan diferencia significativa entre los grupos.

3.9 Actividad hepatoprotectora *in vivo*

La figura 44 muestra los niveles de enzima AST en suero de los animales de experimentación para la evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vivo*.

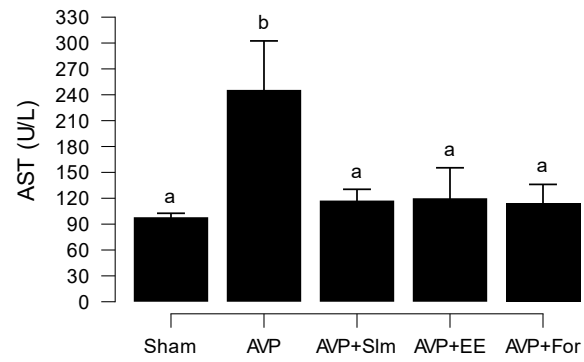


Figura 44. Concentración de AST en suero de ratas Wistar. $n = 3$. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE. $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Tukey. Distintas letras denotan diferencia significativa entre los grupos.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Las enfermedades crónicas del hígado son una de las principales causas de muerte a nivel mundial, ocupando el lugar número once. En México, el panorama no es distinto, ya que en los últimos años han permanecido dentro de las primeras 5 causas de muerte. Si bien las tendencias respecto a los agentes etiológicos causantes de enfermedades crónicas del hígado han cambiado, con una reducción en la mortalidad asociada a cirrosis por agentes virales, también se ve un alarmante incremento en la morbilidad y mortalidad asociado a otras etiologías como lo es MASLD.

Si bien en la actualidad hay algunas opciones de tratamiento para las enfermedades crónicas del hígado, como lo son el acceso a vacunas contra el virus B de la hepatitis y agentes antivirales, sigue siendo necesario buscar nuevas formas de tratamiento, sobre todo aquellas que puedan detener o revertir el proceso de fibrosis, condición común en la mayoría de las etiologías de enfermedades crónicas del hígado. En ese sentido, los productos naturales son una fuente importante de nuevas moléculas con potencial terapéutico.

T. diffusa es una planta ampliamente estudiada por nuestro grupo de trabajo. Su actividad hepatoprotectora ha sido demostrada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, y se

ha identificado al hepatodamianol como uno de los principales componentes responsables de esta actividad.^{48,51}

Con miras al desarrollo de un medicamento herbolario, Delgado-Montemayor elaboró un extracto estandarizado de *T. diffusa*. Este extracto mostró una actividad hepatoprotectora comparable a la silimarina en un modelo *in vivo*;⁵¹ mediante ensayos *in vitro* se encontró que el extracto disminuye la expresión de marcadores de fibrosis como mRNA-*COL1 α 1*, α -SMA y TIMP1, por lo que podría tener un probable efecto antifibrótico.⁴¹

Sin embargo, cuando el extracto se sometió a condiciones de estabilidad acelerada, hubo una disminución en el nivel de hepatodamianol respecto a la concentración inicial, además de una pérdida de la actividad hepatoprotectora *in vitro* en el modelo evaluado. Por lo tanto, el siguiente paso en el desarrollo del medicamento herbolario sería el desarrollo de una formulación que ayude a proteger los componentes presentes en el extracto, principalmente el hepatodamianol, y con ello conservar la actividad hepatoprotectora.

4.1 Obtención del Extracto Estandarizado

La metodología desarrollada por Delgado Montemayor para la obtención del EE de *T. diffusa* consiste en una extracción de la parte aérea de la planta por maceración utilizando MeOH, seguido de un paso de eliminación de clorofilas por extracción en fase sólida y finalmente una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos al vacío.⁵¹ Con el propósito de eficientizar el uso del material vegetal para la obtención de otros metabolitos secundarios distintos al hepatodamianol, Mata-Huerta realizó una modificación a este procedimiento. Esta modificación consistió en un paso adicional al inicio de la metodología,

donde se realizó una primera maceración con acetato de etilo, y posteriormente, una vez seca la planta, se sometió al resto del proceso.⁵⁴ En el presente trabajo se siguió la metodología modificada por Mata-Huerta; se obtuvo un porcentaje de recuperación de 45 %.

4.2 Aislamiento de hepatodamianol

Con el propósito de obtener hepatodamianol para ser utilizado como estándar en la validación del método de cuantificación por HPLC-DAD fue necesario realizar el aislamiento del compuesto. Inicialmente se realizó una cromatografía en columna a baja presión con el EE, de acuerdo con las condiciones descritas en la tabla 8. Se identificó la mancha correspondiente al hepatodamianol en la Fr. 55 % (figura 7 A). Posteriormente, esta fracción se sometió a una segunda cromatografía a baja presión, y se detectó la mancha correspondiente al hepatodamianol en diversas fracciones (figura 7 B). Estas fracciones se mezclaron y se analizaron por HPLC; a pesar de las etapas de separación previa, el cromatograma de esta fracción enriquecida con hepatodamianol (figura 8) aún mostraba una gran cantidad de señales cromatográficas. Por tal motivo, se realizó una última etapa de separación que consistió en una cromatografía de exclusión molecular.

La figura 9 muestra el cromatograma, así como el espectro de UV del hepatodamianol aislado. El espectro UV con dos máximos de absorción, a 256.40 y 351.70 nm, coincide con el espectro previamente reportado para el hepatodamianol.⁷³ Además, también se corroboró la identidad del compuesto aislado mediante análisis por ¹H RMN (figura 10).

Una vez aislado el compuesto, fue necesario establecer su pureza. Si bien, la pureza determinada por HPLC-DAD mediante el método de normalización interna fue de cerca del

80 %, la pureza determinada mediante ^1H -RMN fue significativamente menor, de cerca de 41 %. Esta discrepancia puede ser explicada por la posible presencia de componentes que no presentan el mismo factor de respuesta o que incluso pueden no ser detectados por UV. En ese sentido, la Resonancia Magnética Nuclear es una herramienta poderosa para establecer la pureza de un material, ya que es un método primario de análisis y no requiere de estándares de naturaleza química idéntica al analito. La RMN cuantitativa ha sido adoptada de manera cada vez más frecuente como un método para establecer la pureza de materiales de referencia, en ocasiones arrojando porcentajes de pureza menores a las determinadas mediante otras técnicas.⁷⁴⁻⁷⁶

4.3 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD

A pesar de que en el grupo de trabajo se contaba con dos métodos cromatográficos previamente validados, estos no permitían la resolución completa del hepatodamianol de otros componentes de identidad desconocida presentes en el extracto. Si bien uno de estos métodos (método 1) presenta un tiempo de análisis más corto (< 40 min), así como límites de detección y cuantificación más bajos (0.56 y $0.76 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente), requiere de un tratamiento matemático complejo de los datos ya que la cuantificación se realiza a partir de la primera derivada del cromatograma (figura 45).⁷⁷

Por otro lado, durante el desarrollo de la tesis doctoral de Delgado-Montemayor, se desarrolló y validó un segundo método por HPLC-DAD (método 2), en el cual, a pesar de no emplear un tratamiento de datos complejo, persistía el problema de falta de resolución del

pico de hepatodamianol respecto al resto de los componentes del extracto, como se aprecia en la figura 46.⁵²

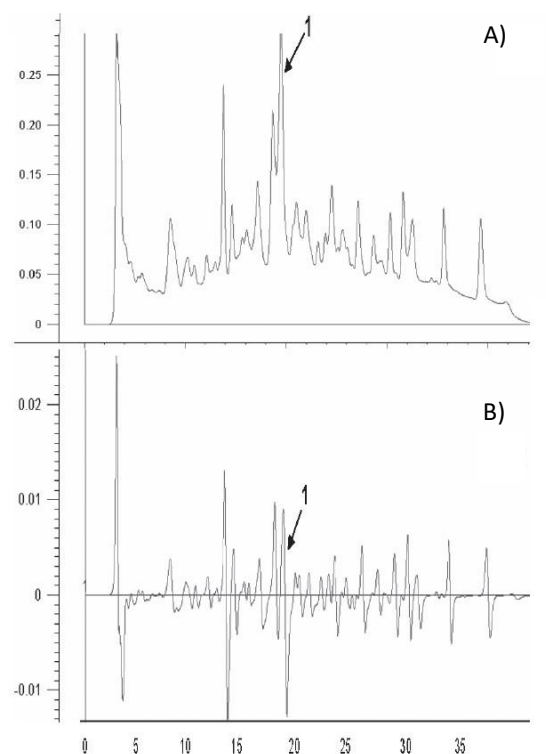


Figura 45. Cromatograma del método 1. A) Cromatograma del extracto metanólico de *T. diffusa*. B) Primera derivada del cromatograma del extracto metanólico de *T. diffusa*. Las flechas indican el pico correspondiente al hepatodamianol. $\lambda = 350$ nm. Modificado de Pérez-Meseguer.⁷⁷

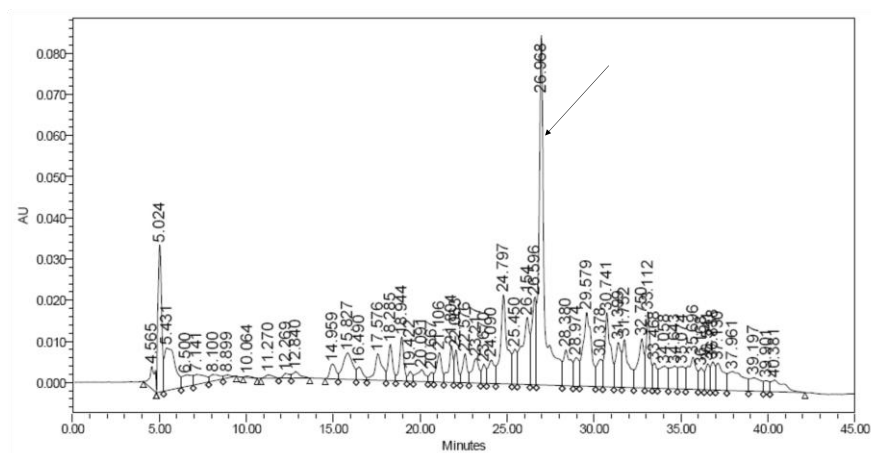


Figura 46. Cromatograma del EE analizado con el método cromatográfico 2. La flecha indica el pico correspondiente al hepatodamianol. $\lambda = 254$ nm. Modificado de Delgado-Montemayor.⁵²

Con estas limitaciones en mente, Parra-Naranjo desarrolló y validó un método por ^1H -RMN para la cuantificación de hepatodamianol en EE de *T. diffusa*.⁵⁶ Sin embargo, a pesar de los buenos resultados del método en términos de linealidad, precisión y exactitud, los límites de detección y cuantificación de este método (72 y $144 \mu\text{g mL}^{-1}$) se encuentran muy por arriba de los obtenidos mediante los métodos cromatográficos. Aunque estos valores son lo suficientemente altos para cuantificar el hepatodamianol en el EE, y tal vez en las formulaciones propuestas, es poco probable que pueda cuantificar el hepatodamianol en la prueba del perfil de liberación. En ese sentido, emplear el método de cuantificación por RMN resultaba poco factible.

Por tal motivo nuestro grupo de investigación trabajó en el desarrollo de un nuevo método de cuantificación de hepatodamianol por HPLC-DAD, que presenta la sensibilidad suficiente y además permite la resolución completa del pico de hepatodamianol del resto de

los componentes del extracto (figura 12). Este nuevo método fue validado en el presente trabajo.

La curva de calibración por estándar externo (figura 11) del hepatodamianol mostró una buena relación lineal entre las áreas de los picos cromatográficos del hepatodamianol y la concentración correspondiente en el intervalo evaluado, con un coeficiente de determinación > 0.99 ; además, el % DER de los factores de respuesta fue < 6 %.

La exactitud del sistema se evaluó mediante un análisis de regresión de la concentración nominal de las soluciones de la curva de calibración y la concentración calculada mediante la ecuación de la curva de calibración. Con base en los resultados, el sistema presentó una exactitud adecuada, ya que en el análisis de regresión se obtuvo un valor de pendiente de 1 y un r^2 de 0.998.

Por otro lado, la exactitud del método se evaluó a través del cálculo del porcentaje de recobro. Para ello se adicionó hepatodamianol a 15 y 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a una muestra de *C. mexicana* y a una muestra de EE. La tabla 19 muestra los resultados obtenidos, donde se aprecia que, para ambas muestras, a las dos concentraciones adicionadas, se obtuvieron porcentajes de recobro cercanos al 100 %. Estos resultados son similares a los obtenidos con el método cromatográfico previamente validado.⁷⁷

La precisión, tanto del sistema como del método, se evaluó mediante el cálculo del % DER, tanto de las soluciones de trabajo para la curva de calibración, como de las muestras de *C. mexicana* adicionadas con hepatodamianol. Los valores de % DER fueron < 13 % en ambos casos (tabla 19).

Además, los LDD y LDC fueron de 0.87 y 4.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, por lo que la sensibilidad del método propuesto en este trabajo es suficiente para la cuantificación del hepatodamianol en extractos de *T. diffusa* y permite cuantificar hepatodamianol en concentraciones hasta 30 veces menores que el método por RMN.

4.4 Parámetros de control de calidad del extracto estandarizado

Se determinó una concentración de 17.49 ± 0.50 mg de hepatodamianol por g de EE. Esta concentración es similar a la previamente reportada por Delgado-Montemayor para extractos correspondientes a colectas de distintos años, que va desde 8 hasta 25 mg por g de muestra.

Para determinar la actividad antioxidante del EE se evaluó el porcentaje de reducción del radical DPPH. Se verificó que tanto el control positivo (quercetina) como el EE presentaran una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones trabajado (figura 13). Se determinó una CE_{50} de 53.43 ± 1.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el EE, valor que corresponde con lo reportado previamente para muestras con concentraciones similares de hepatodamianol.⁵¹

Para la cuantificación de flavonoides totales se empleó el ensayo de reacción con AlCl_3 . Este ensayo se basa en la reacción de complejación del AlCl_3 con el grupo ceto C4 y el hidroxilo C3 o C5 de las flavonas y flavonoles, de acuerdo con el esquema de la figura 49.⁷⁸ Dicho complejo produce un color amarillo, cuya intensidad es proporcional a su concentración.

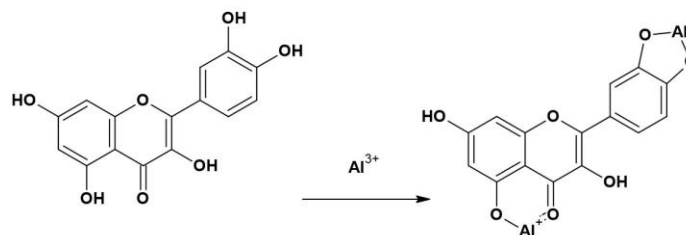


Figura 47. Esquema de la reacción entre el AlCl_3 y flavonoides.

Este ensayo ha sido ampliamente reportado para la cuantificación de flavonoides totales, aunque existen numerosas discrepancias respecto a las condiciones a las que se realiza el ensayo; una de estas es la longitud de onda a la que se realiza la determinación. Las longitudes de onda de análisis reportadas se encuentran entre 415 y 440 nm, así como de 510 a 520 nm.⁷⁸ Por tal motivo se decidió primero obtener un barrido de rutina y EE con y sin adición del AlCl_3 , con el propósito de verificar la longitud de onda de máxima absorción del complejo resultante con el AlCl_3 , y de corroborar la ausencia de absorción de los compuestos en la longitud de onda seleccionada para hacer la medición.

Como se aprecia en la figura 14, la rutina y el EE mostraron máximos de absorción a una longitud de onda de cerca de 360 y 340 nm, respectivamente. Por otro lado, al reaccionar con AlCl_3 , ambos máximos de absorción sufren un desplazamiento batocrómico cerca de 410 nm. Por tal motivo, se seleccionó el filtro de 405 nm para el análisis. Se construyó una curva de calibración para determinar la concentración de flavonoides equivalentes a rutina presentes en el extracto (figura 15). Bajo las condiciones de análisis se determinó que el EE contiene 206.14 ± 0.39 mg de flavonoides equivalentes a rutina por g de muestra. A pesar de las diferencias en las condiciones que reporta Delgado-Montemayor para este ensayo respecto a las empleadas en este trabajo, la cantidad de flavonoides totales equivalentes a

rutina presentes en el EE coincide con las previamente reportadas para extractos con concentraciones similares de hepatodamianol (153 a 186 mg equivalentes de rutina por g de EE).⁵¹

Otro de los parámetros de control de calidad evaluados para el EE fue el efecto hepatoprotector *in vitro*. Esta bioactividad ya ha sido demostrada previamente por el grupo de trabajo, utilizando un modelo de daño en células Hep G2 con tetracloruro de carbono (CCl₄). Este modelo mostró que al administrar el EE a una dosis de 100 µg mL⁻¹ previo a la exposición de las células al CCl₄, la cantidad de enzima liberada al medio se redujo de 111.33 U/L (células no tratadas) a 33-45 U/L (células tratadas), demostrando así el efecto hepatoprotector del extracto.⁵¹

A pesar de los buenos resultados obtenidos con este modelo, debido a las dificultades técnicas asociadas al uso de CCl₄ como inductor de daño (falta de solubilidad en el medio, alta variabilidad de los resultados, alta toxicidad) se consideró necesario buscar un modelo de daño alternativo. A este respecto, se ha reportado el uso de AVP como agente hepatotóxico, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.^{71,79}

Antes de evaluar la actividad hepatoprotectora del EE con este nuevo modelo, fue necesario establecer la dosis de control positivo de silimarina a utilizarse en el ensayo. Esto se hizo con el propósito de evaluar la actividad hepatoprotectora del EE a la misma concentración que la silimarina y obtener así resultados comparables.

La figura 16 muestra el porcentaje de viabilidad celular de células Hep G2 tratadas con AVP 7 mM en coadministración con distintas dosis de silimarina; se observa una clara tendencia donde el porcentaje de viabilidad celular, indicativo de la actividad

hepatoprotectora de la silimarina, incrementa significativamente con la dosis de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, y posteriormente vuelve a disminuir con las dosis de 100 y $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta disminución en la viabilidad celular puede ser explicada por el efecto citotóxico de la silimarina sobre esta línea celular, para la cual se reporta una CC_{50} de $99.66 \pm 3.62 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁸⁰ Con base en estos resultados se seleccionó la dosis de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la evaluación de la actividad hepatoprotectora del EE.

La figura 17 muestra los resultados de la actividad hepatoprotectora *in vitro* del EE, así como de la silimarina. Si bien el EE no logró reducir los niveles de AST en la misma magnitud que el control positivo de silimarina ($70 \pm 0.00 \text{ U/L}$), sí muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de daño, reduciendo en poco más de la mitad la actividad de la AST ($253.30 \pm 30.55 \text{ U/L}$ vs $114.30 \pm 8.15 \text{ U/L}$).

Finalmente, como parte de los parámetros de calidad con los que debe cumplir el EE se evaluó la presencia de disolventes residuales; este análisis obedece a la necesidad de garantizar la pureza del producto farmacéutico, ya que los disolventes residuales son considerados impurezas y deben permanecer debajo de los límites máximos permisibles para garantizar la seguridad del producto.⁸¹ Para este análisis, se verificó la presencia de los disolventes orgánicos utilizados en el proceso de manufactura del EE. El cromatograma de la muestra se comparó con el cromatograma de una solución acuosa que contiene a los disolventes evaluados a la concentración máxima permitida por la USP.⁶² La figura 18 muestra ambos cromatogramas; se aprecia que la muestra de EE (línea roja) no contiene los disolventes analizados en niveles superiores a los permitidos por la USP, por lo que se cumple con este parámetro de calidad.

4.5 Formulación a base de nanopartículas poliméricas

En la prueba cualitativa de solubilidad se determinó que el EE es parcialmente soluble en etanol, isopropanol y acetona, mientras que en metanol y propilenglicol es completamente soluble. De acuerdo con estos resultados, se decidió utilizar como FO una mezcla de metanol y acetona.

Existen diversos factores experimentales que impactan en las características (tamaño, índice de polidispersidad, potencial zeta) de las NP. A su vez, estas características influyen en la interacción entre los nanoacarreadores y el sistema biológico donde se encuentran. Se ha reportado que NP con diámetros de entre 100 y 300 nm son acumuladas en el hígado a través del direccionamiento pasivo.⁸²⁻⁸⁴ Además, algunos estudios donde se prepararon NP cargadas con activos con actividad hepatoprotectora reportan tamaños de aproximadamente 250 nm, por lo que se buscó obtener NP con este tamaño.⁸⁵⁻⁸⁸

En primer lugar, se evaluó el efecto de la concentración y el tipo de polímero sobre el tamaño de las NP obtenidas. Se observó que una mayor concentración del polímero en la FO provocó un incremento en el tamaño de las NP (figuras 19 a 21), lo cual coincide con lo reportado en la literatura para la técnica de nanoprecipitación.^{89,90} Estos resultados se explican, por un lado, por el mayor número de cadenas de polímero presentes en la FO que difunden a la FA, y por consecuencia, forman agregados más grandes. Por otro lado, la viscosidad también tiene un papel relevante, ya que se ve incrementada a medida que la FO tiene una mayor concentración de polímero. Esto provoca una mayor resistencia en la difusión de la FO hacia la FA, y, por lo tanto, se obtienen NP de mayor tamaño.⁹¹ Sin embargo, bajo las condiciones probadas, no se logró obtener NP con el tamaño deseado, por

lo que se decidió evaluar si la adición de surfactante a la FA permitía obtener NP de mayor tamaño.

En una primera instancia se continuó trabajando únicamente con las NP elaboradas con el polímero Eudragit E100, ya que presentó el tamaño de partícula más grande. La adición de un surfactante a la FA también provocó un incremento en el tamaño de partícula (figura 22), principalmente debido al incremento en la viscosidad de la FA, provocando un efecto similar al discutido para la concentración de polímero.^{89,90,92} Sin embargo, este incremento en el tamaño se vio acompañado por una disminución importante en el potencial zeta. Estos resultados podrían explicarse por la adsorción de moléculas de surfactante sobre la superficie de las NP.^{90,93} Eudragit E100 es un polímero de naturaleza catiónica, mientras que el surfactante empleado es de tipo no iónico. Al adherirse, el surfactante neutraliza o enmascara las cargas en la superficie de las NP. Si bien el tamaño de las NP preparadas se incrementó respecto a los experimentos previos, aún no se lograba el tamaño deseado, ya que apenas se encontraban por encima de los 200 nm. Por tal motivo, se decidió explorar el efecto de la proporción de FO:FA: en la formulación sobre el tamaño de las NP.

A este respecto, hay resultados contrastantes en la literatura; mientras algunos estudios reportan que una mayor proporción de FA respecto a la FO provoca una disminución en el tamaño de las NP,⁹⁰ otros indican que el incremento en la proporción de FO resultó en una disminución en el tamaño de las NP,⁸⁹ o bien, que no tuvo ningún efecto sobre el tamaño.⁹³ En nuestro caso, se observó una tendencia hacia un mayor tamaño con una mayor proporción de FA en la formulación. Sin embargo, estos cambios no fueron importantes y el tamaño de las NP obtenidas seguía estando por debajo del objetivo (figura 23). Se decidió seguir explorando estrategias para incrementar el tamaño de las NP, en esta ocasión

modificando la proporción de metanol en la FO (figura 24), así como el disolvente que la compone (figura 25).

A pesar de estas modificaciones, no se logró incrementar de forma importante el tamaño de las NP, por lo que se decidió trabajar con las condiciones con las que se obtuvo el mayor tamaño de partícula para preparar las NP cargadas con EE, es decir, una concentración de 23.33 mg mL^{-1} de polímero Eudragit E100, con una FO (proporción de 0.33) compuesta por una mezcla de metanol (0.40) y acetona (0.60) y una FA (proporción de 0.67) compuesta por surfactante al 1 %. Sin embargo, a los pocos días de haber preparado las NP, estas presentaron cambios en su coloración, y la formación de agregados de polímero (figura 26), posiblemente debido a la inestabilidad de las NP. Por este motivo, se decidió explorar una nueva formulación con un polímero distinto.

Se decidió utilizar el polímero Eudragit L100-55 debido a la experiencia previa del grupo de trabajo, ya que se han obtenido NP de este polímero cargadas con un extracto herbal, las cuales han mostrado ser estables durante por lo menos 11 meses.⁶³ Para este punto era importante comenzar a evaluar si el hepatodamianol, es decir, el marcador de seguimiento, tanto de estabilidad como de actividad en el EE, estaba siendo incorporado de forma efectiva en las NP, por lo que a la par de la elaboración de las NP se estimó el porcentaje de eficiencia de encapsulación del hepatodamianol.

Mediante la comparación del área del hepatodamianol presente en el pellet de NP con el área correspondiente al 100 % de porcentaje de eficiencia de encapsulación del EE, se identificó que solo un 3 % del hepatodamianol estaba siendo incorporado en las NP. En la búsqueda de una estrategia para incrementar este porcentaje se decidió probar sistemas

distintos de FO, sin embargo, el porcentaje de eficiencia de encapsulación no mejoró de forma importante con los sistemas evaluados (figura 27).

Finalmente, se decidió probar un tercer polímero, Eudragit RS100, con el propósito de explorar su efecto sobre el porcentaje de eficiencia de encapsulación. Se sabe que este parámetro se ve influenciado por la interacción entre el activo y el polímero. Cuando esta interacción es fuerte, se tiene una mayor incorporación del activo en el sistema.⁹⁴ Sin embargo, el porcentaje de eficiencia de encapsulación no mejoró (figura 28).

Aunado a los bajos porcentajes de eficiencia de encapsulación obtenidos, se notó crecimiento microbiano en los tubos que contenían las NP preparadas (figura 29), por lo que, para continuar con el desarrollo de la formulación en NP, se tendría que evaluar también la adición de algún tipo de conservador en la formulación. Debido a los problemas de estabilidad y contaminación presentados en la formulación de nanopartículas, así como a la baja eficiencia de encapsulación observada en las formulaciones analizadas, se decidió detener el desarrollo de una formulación a base de nanopartículas.

4.6 Formulación en cápsulas rígidas de gelatina.

4.6.1 Estudios de preformulación

La etapa de preformulación en el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico es de vital importancia, ya que permite caracterizar las propiedades fisicoquímicas del activo, así como su interacción con los posibles excipientes que se usen en la formulación. En particular, el estudio de la compatibilidad entre excipientes y activo es relevante ya que podría haber interacciones entre estos, lo cual puede impactar en la estabilidad. Identificar estas

potenciales interacciones en esta etapa permite hacer una adecuada selección de los excipientes para la formulación.⁹⁵ En el presente trabajo el estudio de la compatibilidad entre el EE y los posibles excipientes a usarse se realizó mediante análisis por IR, donde lo que se busca es la ausencia de formación de nuevas señales que indiquen la formación de nuevos enlaces químicos.

La figura 30 A corresponde al espectro de IR del almidón, donde se observa la señal amplia del estiramiento O-H en 3307 cm^{-1} y la señal de estiramiento C-H alifático en 2922 cm^{-1} ; además, también se identifica la señal intensa del estiramiento C-O en 998 cm^{-1} .^{96,97}

Por otro lado, en la figura 30 B se aprecia el espectro del EE, el cual muestra las señales características de flavonoides: señales intensas de estiramiento -OH y C-H en 3319 y 2926 cm^{-1} , respectivamente. Además, también se identifican las señales de estiramiento C=O del anillo C del flavonoide (1655 cm^{-1}), estiramientos C=C aromáticos en 1608 y 1510 cm^{-1} , y la señal intensa de estiramiento C-O-C del anillo central en 1038 cm^{-1} .⁹⁸

El espectro de IR del ácido benzoico se muestra en la figura 31 A, donde se identifica la banda ancha característica del estiramiento O-H en 3175 cm^{-1} . Además, se identifica la señal de estiramiento C-H aromático en 3074 cm^{-1} . Se identifica la señal intensa del estiramiento C=O en 1678 cm^{-1} y las señales entre 1600 y 1300 cm^{-1} que corresponden al estiramiento C=C del anillo aromático. Además, las señales alrededor de 1000 y 1100 cm^{-1} corresponden a la flexión en el plano del enlace C-H, mientras que las señales entre 700 y 668 cm^{-1} pertenecen a la flexión fuera del plano del enlace C-H del núcleo aromático.

El espectro de IR del carbonato de calcio (figura 32 A) muestra tres señales intensas, características del carbonato: En 1390 cm^{-1} se identifica la señal correspondiente al estiramiento asimétrico (ν_3), en 873 cm^{-1} la señal de flexión fuera del plano (ν_2) y en 712 cm^{-1} la señal de flexión en el plano (ν_4) del CO_3^{-2} .^{99,100}

En el espectro de la carboximetil celulosa (figura 33 B) se identifica la señal amplia del estiramiento O-H, con centro alrededor de 3300 cm^{-1} . Además, también se aprecia la señal intensa característica del estiramiento C=O en 1592 cm^{-1} , así como la señal de estiramiento C-O en 1025 cm^{-1} . Además, las señales entre 1300 y 1400 cm^{-1} corresponden a la flexión en el plano del O-H y C-H.^{101,102}

La figura 34 A muestra el espectro de IR del manitol, donde se identifica la señal de estiramiento O-H entre 3300 y 3400 cm^{-1} . Además, se aprecian las señales alrededor de 2900 y 2980 cm^{-1} que corresponden al estiramiento C-H alifático. En 1417 cm^{-1} se aprecia la señal de flexión tipo tijera del CH_2 ; mientras que las señales de 1078 y 1018 cm^{-1} corresponden al estiramiento C-O.¹⁰³

Por otro lado, en la figura 35 A se observa el espectro de IR de la MCC, con una señal fuerte alrededor de 3300 cm^{-1} , característica del estiramiento -OH, así como otra señal fuerte en 2883 cm^{-1} que corresponde al estiramiento C-H alifático. Además, también se observan señales que corresponden al estiramiento C-O-C en 1160 y 1029 cm^{-1} , característicos del enlace 1-4 glucosídico de la celulosa.^{104,105}

Finalmente, en la figura 36 A vemos el espectro de IR del dióxido de silicio coloidal, el cual es relativamente sencillo y muestra pocas señales. La señal intensa en 1084 cm^{-1}

corresponde al estiramiento Si-O, mientras que la señal en 810 cm^{-1} corresponde a la flexión del enlace Si-O.¹⁰⁶

Todos los espectros que corresponden a las mezcla entre el EE y excipientes (figuras 30 – 38), así como el espectro de la formulación en polvo (figura 39) muestran una combinación de las señales de cada uno de los componentes individuales de las mezclas, donde algunas de las señales se solapan. Cabe destacar que no se identificó la formación de nuevas bandas indicativas de formación de nuevos enlaces, además de que tampoco se observan diferencias entre los espectros obtenidos en el día 1 y el día 30 de estabilidad (Anexo II), por lo que se puede deducir que no existe una incompatibilidad química entre el EE y los excipientes evaluados.

Otro aspecto importante que evaluar durante la etapa de preformulación son las propiedades de flujo del polvo. Estas características son importantes ya que tienen un efecto directo sobre la uniformidad de peso al momento de llenar las cápsulas, sobre todo cuando se utiliza un proceso automatizado para ello.¹⁰⁷ Existen distintas metodologías para evaluar las propiedades de flujo de un polvo; entre las más reportadas se encuentran el ángulo de reposo, el índice de compresibilidad de Carr y el índice de Hausner. De acuerdo con la FEUM, y con base en los resultados obtenidos para estos dos índices (tabla 23), las propiedades de flujo de la formulación en polvo son consideradas de buenas a aceptables.²³

4.7 Determinación de la citotoxicidad

Antes de evaluar el efecto hepatoprotector *in vitro* de cualquier agente, es necesario verificar que este no afecte la viabilidad celular. Debido a que el modelo *in vitro* de

evaluación de la actividad hepatoprotectora se realizaría en células Hep G2, se decidió evaluar la citotoxicidad en esta línea celular, tanto del EE como de la formulación en polvo. Además, también se evaluó la citotoxicidad de ambas muestras en la línea celular Vero, como un control de células no cancerosas. Como se muestra en la figura 40, ninguna de las concentraciones evaluadas disminuyó el porcentaje de viabilidad celular por debajo del 85 %, por lo que se determinó que la CC_{50} , tanto del EE, como del EE incorporado en la formulación en polvo, es mucho mayor a $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ en ambas líneas celulares. De acuerdo con la Guía ISO 10993-5 (2009), una reducción de más del 30 % en la viabilidad celular es suficiente para considerar un efecto citotóxico,¹⁰⁸ por lo que, de acuerdo con los resultados obtenidos, tanto el EE libre, como el EE incorporado en la formulación en polvo carecen de efecto citotóxico bajo las condiciones evaluadas. Esto concuerda con los resultados previos del grupo de trabajo, ya que previamente se determinó que el EE tiene una $CC_{50} > 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre la línea celular HepG2.⁴⁸

4.8 Parámetros de calidad de la formulación en cápsulas rígidas de gelatina.

Para verificar que la mezcla del EE con los excipientes, así como su incorporación en las cápsulas rígidas de gelatina, no provocara cambios significativos en los parámetros de calidad del extracto, se determinó la CE_{50} para DPPH, el contenido de flavonoides totales, la actividad hepatoprotectora de la formulación en polvo, así como el análisis de disolventes residuales. Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 24. Se compararon los resultados obtenidos del EE para estas pruebas (excepto disolventes residuales) con los de la formulación en polvo mediante una prueba t de Student. Como resultado se obtuvo un valor $p > 0.05$, por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos muestras.

Estos resultados indican que la incorporación del extracto en la formulación no altera sus parámetros de calidad en términos de actividad antioxidante, contenido de flavonoides totales y actividad hepatoprotectora; además, la incorporación del EE en la formulación tampoco modificó los resultados de disolventes residuales.

4.8.1 Uniformidad de peso

La prueba de uniformidad de peso se realiza con el propósito de evaluar el contenido de la formulación, ya que diferencias en el peso del contenido de las cápsulas podrían llevar a alteraciones en la dosis que se ingiere. Si bien la FEUM no establece un valor de aceptación para este parámetro respecto a los medicamentos herbolarios, sí lo indica para cápsulas de vitamínicos, por lo que se tomó este criterio para evaluar si la formulación cumple o no cumple con la prueba. El criterio establece que se cumple con los requisitos si cada peso individual está entre los 90 y 110 % de la masa del promedio.²³ Con base en los resultados obtenidos (tabla 25) la formulación cumple con los requisitos para pasar la prueba.

4.8.2 Valoración y uniformidad de contenido

Otro parámetro importante para determinar la homogeneidad de la dosis en la formulación es la uniformidad de contenido. En esta prueba, a partir de los datos de valoración del principio activo, en este caso el hepatodamianol, se determina qué porcentaje de la dosis indicada está realmente presente en la unidad de prueba. A través de la ecuación 15 es posible calcular un VA para determinar si la formulación cumple o no cumple con los requisitos. De acuerdo con el MGA 0299 de la FEUM se cumplen los requisitos de

uniformidad de contenido si el VA de las primeras 10 unidades de dosificación no es mayor que el límite $L1 = 15$. En el presente trabajo se calculó un VA de 12.29, por lo que pasa la prueba.²³

4.8.3 Tiempo de desintegración

El tiempo de desintegración es un parámetro de calidad importante ya que para que el fármaco o principio activo presente en la formulación pueda disolverse en el sistema biológico y ejerza su efecto terapéutico, antes debe ser liberado de la forma farmacéutica que lo contiene.¹⁰⁹

El criterio de aceptación para este parámetro normalmente se establece en la monografía individual de cada preparado farmacéutico, sin embargo, para el caso de medicamentos herbolarios no se tiene una referencia o un criterio universal en la FEUM. Por otro lado, la USP en el capítulo <2040> establece como criterio universal un tiempo de desintegración menor a 30 min para suplementos dietéticos, entre los cuales considera a las formulaciones preparadas con ingredientes de origen botánico.¹¹⁰ Tomando como base este criterio, la formulación desarrollada en este trabajo cumple con este parámetro de calidad.

4.8.4 Perfil de disolución

Determinar el perfil de disolución como parte del desarrollo de un producto farmacéutico tiene diversas razones, entre las que destacan dos; por un lado, funciona como un parámetro de control de calidad ya que permite establecer valores con los que debe cumplir el producto y permite asegurar la calidad y consistencia entre lotes. Por otro lado, la

prueba se realiza con medios de disolución que simulen las características *in vivo* del sistema biológico en el que se encontrará el medicamento, por lo que da indicios sobre su biodisponibilidad en un organismo vivo.⁶⁸

Hay diversos parámetros que deben tomarse en cuenta para el diseño de una prueba de disolución: el tipo de aparato, la velocidad de agitación, los tiempos de muestreo y el medio de disolución, por mencionar algunos. En el presente trabajo se decidió utilizar un aparato de disolución tipo II ya que es el aparato más frecuentemente empleado, a una velocidad de 100 rpm.¹¹¹ Si bien la USP sugiere una velocidad de agitación de entre 50 y 75 rpm, velocidades mayores de hasta 100 rpm también pueden ser utilizadas.^{111,112} Los tiempos de muestreo se seleccionaron con base en las recomendaciones de las guías de la USP para formulaciones de liberación inmediata.¹¹³

En lo que respecta al medio de disolución, se sugiere evaluar el perfil en el intervalo de pH fisiológico, es decir, entre 1.20 y 6.80. Al comparar el perfil de disolución del hepatodamianol en los distintos medios evaluados (figura 41) mediante el método del factor de similitud, se obtuvieron valores de $f_2 > 50$ para todas las comparaciones, a excepción del perfil de disolución en agua vs el perfil de disolución a pH 4.50 y 6.80 (tabla 27). Estos resultados indican que el perfil de disolución del hepatodamianol en los buffers evaluados son similares entre sí.⁶⁸

De manera general se considera que para que una formulación cumpla con los criterios de calidad esta debe liberar por lo menos el 85 % de la dosis en un periodo de tiempo establecido (usualmente entre 30 y 60 min), a menos que la monografía individual indique algo distinto; por otro lado, la USP indica que para formulaciones herbales por lo menos el 75 % de la dosis indicada debe ser liberada en el transcurso de una hora.⁶⁸ Bajo cualquiera

de estos dos criterios, el perfil de disolución del hepatodamianol bajo todas las condiciones evaluadas cumple con los criterios de calidad.

Es importante mencionar que, en todos los medios evaluados, a excepción del medio con HCl (pH 1.20), el % *F* de hepatodamianol a los 20 min fue ≥ 85 %. En el caso del perfil de disolución evaluado a pH de 1.20 se tuvo un % *F* del 81 % a los 20 min. Este menor % *F* en medio ácido podría deberse a la naturaleza tipo ácido débil de los flavonoides, lo que provoca que su solubilidad se reduzca a medida que disminuye el pH.¹¹⁴

Sedbare y cols. obtuvieron resultados similares al evaluar el perfil de disolución de antocianinas a partir de formulaciones en cápsulas rígidas de gelatina, alcanzando % *F* de entre 70 y 80 % a los 30 min con HCl como medio de disolución.¹¹⁵ Por otro lado, Mbamalu y cols. evaluaron el perfil de disolución de sutherlandinas A, B, C y D de cápsulas que contenían un extracto acuoso secado por pulverización (spray drying) de *Sutherlandia frutescens*. Los autores reportan un comportamiento semejante, donde las sutherlandinas A y C alcanzaron un % *F* de 85 % en 30 min o menos en los 3 medios evaluados (pH 1.20, 4.50 y 6.80), mientras que las sutherlandias B y D solamente alcanzaron estos niveles en los medios con pH 4.50 y 6.80.¹¹⁶

Como se mencionó anteriormente, uno de los propósitos del perfil de disolución es que sirva como una herramienta para el control de calidad de la formulación. Esto implica que la prueba debe tener capacidad o potencial discriminatorio, es decir, que sea capaz de diferenciar o distinguir cambios significativos en la composición y proceso de manufactura de la formulación.⁶⁸ Bredael y cols. sugieren que utilizar un método de disolución con una tasa de disolución relativamente lenta, mientras se alcance un % *F* de por lo menos un 85 % en 60 min puede proporcionar suficiente capacidad de discriminación.¹¹⁷ Por otro lado

Ashokraj y cols. establecieron como objetivos obtener un perfil con $< 50\%$ de liberación a los 10 min y $> 80\%$ de liberación a los 30 min para el desarrollo de un método de disolución discriminatorio.¹¹⁸ Tomando estos criterios como base, se podría utilizar HCl (pH 1.20) o buffer de acetatos (pH 4.50) como medio para utilizar el perfil de disolución como parámetro de control de calidad. Sin embargo, aún hace falta realizar pruebas adicionales en donde se ponga a prueba la capacidad de discriminación del método en cada medio, utilizando formulaciones elaboradas con variaciones en la cantidad de excipiente o en el proceso de elaboración de las cápsulas.

El perfil de disolución de una formulación puede ser descrito a través de modelos matemáticos, los cuales pueden clasificarse como mecanísticos o empíricos. Los modelos mecanísticos se derivan de fenómenos físicos relacionadas con las características fisicoquímicas del fármaco y pueden dar información relacionada no solo con la cinética, sino también con el mecanismo de liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica. Por otro lado, los modelos empíricos parten de un tratamiento puramente matemático y solamente describen el perfil.^{119,120}

Los modelos evaluados en este trabajo (primer orden, Weibull, Hixson – Crowell y Makoid – Banakar) se seleccionaron debido a que se encuentran entre los más comúnmente empleados, además de ser los que generalmente se implementan en formulaciones de liberación inmediata. Si bien el modelo de orden cero también se encuentra entre los más utilizados, usualmente se aplica para formulaciones de liberación modificada, con matrices que no se desintegran o formulaciones transdérmicas.^{68,119,120}

Los parámetros más comúnmente usados para la selección del modelo que mejor representa el mecanismo de liberación del fármaco son el r^2 , r^2_{adj} , el AIC y el MSC.⁶⁷ De

manera general se considera como criterio de aceptación un $r^2 \geq 0.95$ para determinar que el modelo es adecuado;⁶⁸ sin embargo, debido a que este valor tiende a aumentar a medida que se integran más parámetros en el modelo, es preferible utilizar el r^2_{adj} cuando se comparan modelos con distinto número de parámetros. Por otro lado, un AIC menor indica un mejor ajuste, en contraste, un MSC más alto señala un modelo más apropiado;⁶⁷ valores de MSC > 2-3 indican un modelo adecuado.¹²¹

Con base en los resultados obtenidos (tabla 28 y Anexo V) el modelo que mejor se ajustó a los datos de perfil de disolución fue el de Weibull, ya que se obtuvieron valores de r^2 y $r^2_{adj} \geq 0.95$, así como los valores de AIC más bajos y valores de MSC > 2. Este modelo describe la fracción acumulada de fármaco (m) en solución al tiempo t mediante la ecuación (16)

$$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t-T_i)^b}{a} \right] \quad (16)$$

Donde el parámetro a define la escala de tiempo del proceso, T_i representa el tiempo de latencia antes del inicio del proceso de disolución o liberación (la mayoría de las veces es cero), y b caracteriza la forma o el tipo de curva como exponencial ($b = 1$), sigmoidea ($b > 1$) o parabólica ($b < 1$).¹²² Si bien este modelo puede ajustarse a la mayoría de las curvas de disolución, presenta algunas limitaciones. Autores como Costa y cols. señalan que debido a su naturaleza puramente empírica este modelo solo puede describir mas no caracterizar las propiedades cinéticas de disolución del fármaco, y que el modelo no presenta parámetros relacionados con su tasa de disolución intrínseca.¹²² Sin embargo, algunos estudios han correlacionado el valor del parámetro b del modelo de Weibull con el tipo de mecanismo de liberación;¹²³ Papadopoulos y cols. encontraron que valores de $b < 0.75$ están asociados con

un mecanismo de difusión tipo Fick, mientras que valores de 0.75 a 1 presentan un mecanismo combinado (difusión tipo Fick y transporte controlado por hinchamiento). Por otro lado, cuando $b = 1$, se tiene un mecanismo de liberación de primer orden y valores de $b > 1$ indican un mecanismo complejo en donde la tasa de liberación se incrementa de forma no lineal al inicio y luego disminuye de manera asintótica.¹²⁴ De acuerdo con los valores de b obtenidos (tabla 29), la liberación de hepatodamianol a partir de la formulación sigue un mecanismo de difusión tipo Fick en todos los medios evaluados, salvo en el caso del agua, donde se obtuvo un valor de $b > 1$, por lo que en este caso se tendría un mecanismo complejo de liberación.

4.8.5 Límites microbianos

Los productos farmacéuticos pueden clasificarse como estériles o no estériles, dependiendo principalmente de su vía de administración. A su vez, los productos no estériles deben cumplir con estándares de calidad microbiológicos, los cuales se estipulan en la monografía individual de cada producto dentro de la Farmacopea. En el caso de la mayoría de los productos no estériles, los límites microbianos se establecen con el recuento de OMA y HL; aunque en ocasiones, dependiendo de la vía de administración puede haber pruebas adicionales para corroborar la ausencia de organismos específicos. Para productos sólidos no estériles de administración oral, la FEUM establece como límite para OMA un recuento de 10^3 UFC g^{-1} , mientras que para HL se tiene como criterio 10^2 UFC g^{-1} , además de la ausencia de *E. coli* por g de producto.²³

En el caso específico de productos medicinales derivados de plantas, la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos no especifica límites; otras Farmacopeas, como la de los Estados Unidos (10^4 UFC g⁻¹ para OMA y 10^3 UFC g⁻¹ para HL para suplementos dietéticos)¹²⁵ o la Farmacopea Europea (10^4 UFC g⁻¹ para OMA para productos herbales)¹²⁶ fijan límites incluso ligeramente más laxos; aunque también incluyen a *Salmonella* spp., además de *E. coli*, en la lista de microorganismos que deben estar ausentes en este tipo de productos.

Para la formulación desarrollada en este trabajo se obtuvo un recuento de OMA de 2×10^2 UFC g⁻¹ de muestra, mientras que el recuento de HL fue de 4×10^1 UFC g⁻¹ de muestra (tabla 30); además, se determinó la ausencia de bacterias Gram negativas bilis tolerantes (figura 42). Estos valores se encuentran debajo de los límites establecidos en la FEUM para productos farmacéuticos no estériles, e incluso se encuentran hasta dos órdenes de magnitud por debajo de los límites permisibles, si se toma como criterio establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos.

A pesar de que la formulación desarrollada en este trabajo es considerada un producto farmacéutico no estéril, es importante monitorear los niveles de microorganismos que puedan estar presentes. La contaminación de productos herbales con patógenos es un problema serio debido a que la materia prima con la que se fabrican puede estar inoculada.¹²⁷ Además, el proceso de manufactura de la formulación debe realizarse en todo momento bajo condiciones de higiene que aseguren que los límites microbianos se encuentren dentro de los valores máximos permisibles. Los resultados obtenidos para esta prueba, particularmente con relación a la ausencia de bacterias Gram negativas bilis tolerantes, son evidencia del manejo adecuado e higiénico durante el proceso de fabricación de las cápsulas.

Si bien se obtuvieron resultados satisfactorios en la prueba de límites microbianos, la prueba presenta algunas limitaciones, principalmente relacionadas con el tamaño de muestra analizado. Si bien la FEUM establece que para productos en donde el número total de unidades del lote es menor a 100 el tamaño de la muestra puede reducirse a una o dos unidades (en este caso se utilizaron nueve unidades), lo ideal sería obtener un lote lo suficientemente grande para analizar la cantidad de muestra recomendada (10 g).

4.8.6 Estabilidad a largo plazo

Como parte del control de calidad de los productos elaborados a base de plantas, a menudo se utilizan marcadores químicos. Estos son constituyentes químicamente definidos, que pueden o no contribuir a la eficacia clínica. La OMS sugiere que, si se tienen constituyentes con actividad terapéutica conocida, estos se utilicen como marcadores químicos. Idealmente, el marcador seleccionado también sirve como un medio de identificación de la planta.¹²⁸ El monitoreo de la presencia de estos marcadores, así como de sus niveles cumple distintos propósitos, siendo uno de estos el estudio de la estabilidad del producto.

Muchas veces la actividad biológica está correlacionada con la concentración del marcador químico presente en el producto, por lo que su cuantificación en el producto es suficiente para determinar su estabilidad. Sin embargo, en la mayoría de los casos no es un único componente o marcador el responsable de la actividad biológica, si no el conjunto de compuestos presentes en el extracto, los cuales no siempre se tienen identificados. Debido a

esto se sugiere que los estudios de estabilidad de productos herbales analicen tanto la estabilidad química, como la estabilidad biológica en relación con la actividad terapéutica.³³

Con base en todo lo anterior, se seleccionó al hepatodamianol como marcador de seguimiento para la evaluación de la estabilidad; por un lado, se ha identificado como uno de los componentes responsables de la actividad hepatoprotectora de la planta, dicho de otra manera, es un marcador con actividad terapéutica conocida. Además, también es indicativo de la identidad de la planta, ya que únicamente se ha reportado su presencia en esta especie de *Turnera*.⁴⁸ Finalmente, estudios previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que una disminución en el contenido de hepatodamianol se ve acompañado de una pérdida de la actividad hepatoprotectora, es decir, el contenido de hepatodamianol puede correlacionarse con la actividad biológica.⁵² De manera que el estudio de estabilidad de la formulación elaborada en este proyecto consideró la cuantificación mediante HPLC-DAD de hepatodamianol en las cápsulas para la estabilidad química, así como la evaluación de la actividad hepatoprotectora *in vitro* de la formulación para la estabilidad biológica.

La legislación mexicana contempla en la NOM-073-SSA1-2015 las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) a las que deben someterse los fármacos o medicamentos en estudios de estabilidad. Para medicamentos nuevos en estudios de estabilidad a largo plazo, estas condiciones son de 25 °C y 60 % de HR por un periodo de 12 meses, con una frecuencia de análisis trimestral.⁶⁹

La figura 43 A muestra un gráfico con el porcentaje de hepatodamianol en la formulación a los tres, seis, nueve y doce meses de almacenamiento, en relación con el contenido inicial (es decir, al mes cero). Se aprecia que la concentración de hepatodamianol se mantiene estable hasta los seis meses, y que a partir de los nueve meses disminuye

significativamente, presentando una reducción de poco más del 20 % del contenido inicial de hepatodamianol. La NOM-073-SSA1-2015 establece una variación del 5 % respecto a la valoración inicial como un cambio significativo en el medicamento.⁶⁹ Tomando como base este criterio, el medicamento mantiene la estabilidad química durante seis meses, ya que el contenido de hepatodamianol en este periodo de tiempo está dentro de los límites permitidos (95 – 105 %).

Respecto a la estabilidad biológica del medicamento, la figura 43 B muestra que, a pesar de que hay una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de AST a los doce meses de almacenamiento en comparación con el control de daño, existe una tendencia al alza en la concentración de la enzima liberada a medida que pasa el tiempo. Además, el análisis estadístico mostró que a partir del mes seis de almacenamiento, la actividad hepatoprotectora del extracto en la formulación al mes seis de almacenamiento ya presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al mes cero de almacenamiento.

Esto contrasta con los resultados esperados, ya que previamente se había notado que una pérdida en el contenido de hepatodamianol viene acompañado de una pérdida de la actividad hepatoprotectora. Con base en ello, se esperaría que al no haber cambios significativos en el contenido de hepatodamianol, por lo menos hasta los seis meses de almacenamiento, tampoco habría cambios significativos en la actividad hepatoprotectora a este tiempo. Esta diferencia en la estabilidad química y biológica del extracto en la formulación a los seis meses de almacenamiento podría explicarse por la presencia de otros componentes bioactivos en el extracto, cuya concentración podría haber cambiado a lo largo del tiempo de almacenamiento.

A pesar de que la NOM-073-SSA1-2015 es clara respecto al porcentaje de variación permitido para el contenido del marcador, no es el caso para los métodos biológicos o inmunológicos. Para este tipo de pruebas, únicamente indica como cambio significativo el no cumplimiento del criterio de aceptación para potencia.⁶⁹ Esta se define como una medida cuantitativa de la actividad biológica del producto basado en sus propiedades biológicas relevantes.¹²⁹

En este caso, la actividad biológica del producto se evaluó a través del ensayo de hepatoprotección *in vitro*. Si se toma como medida de la potencia el porcentaje de reducción de AST liberada al medio en comparación con el control de daño de AVP, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa en la potencia a partir del mes seis de almacenamiento; aunque cabe remarcar que la actividad hepatoprotectora se mantiene.

Como se mencionó previamente, la normativa no contempla un parámetro de aceptación en relación con la variación en la potencia que debe presentar un producto cuando se evalúa su estabilidad. Sin embargo, algunas publicaciones sugieren un 80-120 % de la potencia como criterio de aceptación cuando se evalúan productos biológicos.^{130,131} En este estudio, las muestras del mes cero de estabilidad generaron una reducción en el porcentaje de enzima AST liberada al medio de 60.11 % ; con estos resultados se podría establecer como criterio de aceptación para potencia un porcentaje de reducción de la enzima liberada de 48.09 – 72.13 %. Bajo este criterio, la formulación presenta una estabilidad biológica de tres meses, ya que, a partir de los seis meses de almacenamiento, el porcentaje de reducción de la enzima es menor al 43 % (figura 43 C).

4.9 Actividad hepatoprotectora *in vivo*

La actividad hepatoprotectora *in vitro* del EE ya había sido previamente demostrada por nuestro grupo de trabajo en un modelo de daño con CCl₄; los resultados de ese ensayo mostraron que el EE, administrado por vía oral, redujo significativamente ($p < 0.05$) los niveles de las enzimas AST y ALT, en comparación con el grupo de daño.⁵¹

En este proyecto, nuevamente se evaluó la actividad hepatoprotectora *in vivo*, utilizando AVP como agente hepatotóxico, con el objetivo de verificar que la incorporación del EE en la formulación no modificara su bioactividad. Como se muestra en la figura 44, tanto el EE administrado en forma libre (120 ± 35.34 U/L), como la formulación (114 ± 22.07 U/L), disminuyeron de forma significativa los niveles de AST en comparación con el grupo control de daño (245.70 ± 56.80 U/L). Además, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los resultados del EE y la formulación, por lo que la incorporación del EE en la formulación no modifica la actividad hepatoprotectora *in vivo*.

Otro aspecto que destacar con relación a los reportes de actividad hepatoprotectora *in vivo* de especies del género *Turnera* es que la mayoría utiliza modelos de daño prolongados, incluso de hasta 21 o 28 días, así como dosis altas de extracto (de 80 a 500 mg kg⁻¹).⁴⁴ Los resultados de este trabajo demuestran que una dosis reducida, de tan solo 70 mg kg⁻¹ administrada durante siete días, es suficiente para ejercer el efecto hepatoprotector de esta planta.

CONCLUSIONES

- Se validó un método por HPLC-DAD para la cuantificación de hepatodamianol, el cual es lineal ($5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), preciso y exacto, con LDD y LDC de 0.87 y $4.45 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.
- El extracto estandarizado de *T. diffusa* cumple con los requisitos establecidos por Delgado – Montemayor para los parámetros de contenido de hepatodamianol, actividad antioxidante y flavonoides totales.
- Se obtuvieron NP poliméricas cargadas con el extracto estandarizado de *T. diffusa*, sin embargo, el porcentaje de eficiencia de encapsulación para el hepatodamianol fue muy bajo.
- Se desarrolló una formulación en cápsulas rígidas de gelatina para el extracto estandarizado de *T. diffusa*, la cual cumple con los parámetros de uniformidad de peso, uniformidad de contenido, tiempo de desintegración, límites microbianos y perfil de disolución establecidos en la FEUM.
- Los perfiles de disolución de hepatodamianol en los tres buffers evaluados son similares entre sí.
- El hepatodamianol sigue un mecanismo de liberación de tipo Weibull.
- La incorporación del EE en la formulación en polvo no modifica sus parámetros de calidad en términos de actividad antioxidante, contenido de flavonoides totales y actividad hepatoprotectora *in vitro*.

- Bajo las condiciones de almacenamiento probadas, el EE en la formulación presenta una estabilidad química de seis meses y una estabilidad biológica de tres meses.
- Se acepta la hipótesis, ya que la incorporación del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en la formulación permitió mejorar su estabilidad manteniendo la actividad hepatoprotectora.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la capacidad de discriminación del perfil de disolución a pH 1.20 o 4.50, introduciendo variaciones en la cantidad de excipiente o proceso de elaboración de las cápsulas.
- Correlacionar otros componentes en el extracto cuyos cambios en la concentración puedan contribuir a la pérdida de la estabilidad biológica bajo las condiciones evaluadas.
- Evaluar la estabilidad química y biológica de la formulación bajo condiciones de refrigeración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gwamzhi LN. Hepatocellular Function. In: *Liver: A Complete Book on Hepato-Pancreato-Biliary Diseases*. Elsevier; 2009:10-13.
2. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol*. 2023;79(2):516-537. doi:10.1016/j.jhep.2023.03.017
3. Gan C, Yuan Y, Shen H, et al. Liver diseases: epidemiology, causes, trends and predictions. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):33. doi:10.1038/s41392-024-02072-z
4. INEGI. Estadísticas de Defunciones Registradas. Accessed April 29, 2025. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2026/edr/edr2025_ene-sep_CP.pdf
5. Gonzalez-Chagolla A, Olivas-Martinez A, Ruiz-Manriquez J, et al. Cirrhosis etiology trends in developing countries: Transition from infectious to metabolic conditions. Report from a multicentric cohort in central Mexico. *Lancet Reg Health Am*. 2021;7:100151. doi:10.1016/j.lana.2021.100151
6. Flores-García NC, Dirac M, Han H, Kershenobich-Stalnikowitz D. La carga de la enfermedad por cirrosis hepática en México. *Gac Med Mex*. 2023;159(6):509-516. doi:10.24875/GMM.23000370
7. Méndez-Sánchez N, Ramírez-Mejía MM, Cortez-Hernández C, et al. Epidemiology and etiologic trends of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients in Mexico: a multicenter retrospective study (2018–2024). *Ann Hepatol*. 2025;31(1):102131. doi:10.1016/j.aohep.2025.102131
8. Palma-Lara I, Ortiz-López MG, Bonilla-Delgado J, et al. A landscape of liver cirrhosis and transplantation in Mexico: Changing leading causes and transplant as response. *Ann Hepatol*. 2025;30(1):101562. doi:10.1016/j.aohep.2024.101562
9. FDA. FDA Approves Treatment for Serious Liver Disease Known as ‘MASH.’ August 15, 2025. Accessed April 16, 2026. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-serious-liver-disease-known-mash>
10. Barritt AS, Stine JG. Update on Newly Federal Drug Administration-Approved Drug, Resmetirom: A Practical Perspective. *Am J Gastroenterol*. 2024;120(2):272-276. doi:10.14309/ajg.0000000000002922
11. WHO. *WHO Global Report on Traditional, Complementary and Integrative Medicine 2024*. 2025.

12. NORMA Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios.
13. NORMA Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios.
14. Ley General de Salud. Accessed September 3, 2022. <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGS.pdf>
15. COFEPRIS. Listados de Registros Sanitarios de Medicamentos. Accessed September 3, 2022. <https://www.gob.mx/cofepris/documentos/registros-sanitarios-medicamentos>
16. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2022. Accessed October 9, 2022. <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
17. Reimers EAL, Fernández C. E, Reimers DJL, et al. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Papantla, Veracruz, Mexico. *Plants*. 2019;8(8):246. doi:10.3390/plants8080246
18. Sansores-España D, Pech-Aguilar AG, Cua-Pech KG, et al. Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Management of Urolithiasis: A Review of Preclinical Evidence, Bioactive Compounds, and Molecular Mechanisms. *Molecules*. 2022;27(6):2008. doi:10.3390/molecules27062008
19. Geck MS, Cristians S, Berger-González M, Casu L, Heinrich M, Leonti M. Traditional Herbal Medicine in Mesoamerica: Toward Its Evidence Base for Improving Universal Health Coverage. *Front Pharmacol*. 2020;11:1160. doi:10.3389/fphar.2020.01160
20. Dash AK. Ch. 8. Drug, Dosage Form, and Drug Delivery Systems. Ch. 9 Solid Dosage Forms. In: Alekha K. Dash, Somnath Singh, eds. *Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice, Second Edition*. Academic Press; 2024:223-269. doi:10.1016/C2020-0-03331-1
21. Nagalingam A. Drug Delivery Aspects of Herbal Medicines. In: *Japanese Kampo Medicines for the Treatment of Common Diseases: Focus on Inflammation*. Elsevier Inc.; 2017:143-164. doi:10.1016/B978-0-12-809398-6.00015-9
22. Rodríguez Martínez IA, Londoño-Ruíz PS, Serafini MR, Alves IA, Aragon Novoa DM. Trends in Oral Flavonoid Drug Delivery Systems Based on Current Pharmaceutical Strategies. A Systematic Patent Review (2011–2023). *J Herb Med*. 2024;43:100828. doi:10.1016/j.hermed.2023.100828
23. *Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos*. 2018.

24. Huang L, Huang XH, Yang X, et al. Novel nano-drug delivery system for natural products and their application. *Pharmacol Res.* 2024;201:107100. doi:10.1016/j.phrs.2024.107100
25. Kumar R, Harilal S, Arora S, et al. Nanotechnology-enhanced phytomedicines: Innovations and applications in cancer therapy. *Int Immunopharmacol.* 2025;166:115537. doi:10.1016/j.intimp.2025.115537
26. Bertoni S, Passerini N, Albertini B. Nanomaterials for oral drug administration. In: *Nanotechnology for Oral Drug Delivery: From Concept to Applications.* Elsevier Inc.; 2020:27-76. doi:10.1016/B978-0-12-818038-9.00004-1
27. Seremeta KP, Sosnik A. Delivery platforms for oral drug administration. In: *Nanotechnology for Oral Drug Delivery: From Concept to Applications.* Elsevier Inc.; 2020:199-224. doi:10.1016/B978-0-12-818038-9.00010-7
28. Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm.* 2017;532(1):66-81. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.064
29. Yan X, Bernard J, Ganachaud F. Nanoprecipitation as a simple and straightforward process to create complex polymeric colloidal morphologies. *Adv Colloid Interface Sci.* 2021;294:102474. doi:10.1016/j.cis.2021.102474
30. Wang H, Chen Y, Wang L, Liu Q, Yang S, Wang C. Advancing herbal medicine: enhancing product quality and safety through robust quality control practices. *Front Pharmacol.* 2023;14:1265178. doi:10.3389/fphar.2023.1265178
31. Klein-Junior LC, de Souza MR, Viaene J, et al. Quality Control of Herbal Medicines: From Traditional Techniques to State-of-the-art Approaches. *Planta Med.* 2021;87(12-13):964-988. doi:10.1055/a-1529-8339
32. EMA. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Preprint posted online 2022.
33. Bansal G, Kaur J, Suthar N, Kaur S, Negi RS. Stability Testing Issues and Test Parameters for Herbal Medicinal Products. In: *Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals.* 2018:307-333. doi:10.1007/978-1-4939-7686-7_14
34. Bachar SC, Bachar R, Jannat K, Jahan R, Rahmatullah M. Hepatoprotective natural products. In: *Annual Reports in Medicinal Chemistry.* Elsevier Inc.; 2020:207-249. doi:10.1016/bs.armc.2020.06.003
35. Szulżyły P, Paśko P, Galanty A. Natural Products as Hepatoprotective Agents—A Comprehensive Review of Clinical Trials. *Plants.* 2024;13(14):1985. doi:10.3390/plants13141985

36. Méndez-Sánchez N, Dibildox-Martinez M, Sosa-Noguera J, Sánchez-Medal R, Flores-Murrieta FJ. Superior silybin bioavailability of silybin–phosphatidylcholine complex in oily-medium soft-gel capsules versus conventional silymarin tablets in healthy volunteers. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2019;20(1):5. doi:10.1186/s40360-021-00500-2
37. Gutiérrez-Rebolledo GA, Siordia-Reyes AG, Meckes-Fischer M, Jiménez-Arellanes A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(7):644-651. doi:10.1016/j.apjtm.2016.05.015
38. Murillo-Villicaña M, Noriega-Cisneros R, Peña-Montes DJ, et al. Antilipidemic and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extract of *Justicia spicigera* in Streptozotocin Diabetic Rats. *Nutrients.* 2022;14(9):1946. doi:10.3390/nu14091946
39. Morales-López J, Centeno-Álvarez M, Nieto-Camacho A, et al. Evaluation of antioxidant and hepatoprotective effects of white cabbage essential oil. *Pharm Biol.* 2017;55(1):233-241. doi:10.1080/13880209.2016.1258424
40. Urrutia-Hernández TA, Santos-López JA, Benedí J, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of croton hypoleucus extract in an induced-necrosis model in rats. *Molecules.* 2019;24(14):2533. doi:10.3390/molecules24142533
41. Rodríguez-Rodríguez DR, Lozano-Sepulveda SA, Delgado-Montemayor C, Waksman N, Cordero-Perez P, Rivas-Estilla AM. Turnera diffusa extract attenuates profibrotic, extracellular matrix and mitochondrial markers in activated human hepatic stellate cells (HSC). *Ann Hepatol.* 2021;22:100281. doi:10.1016/j.aohep.2020.10.009
42. Rocha L, Ribeiro PL, Rapini A. A lineage-based infrageneric classification of *Turnera* (Turneraceae). *Taxon.* 2020;69(2):290-306. doi:10.1002/tax.12210
43. Cárdenas LOA. *Flora Del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 43 Turneraceae.* Instituto de Biología de la UNAM; 2006.
44. Parra-Naranjo A, Delgado-Montemayor C, Salazar-Aranda R, Waksman-Minsky N. Bioactivity of the Genus *Turnera*: A Review of the Last 10 Years. *Pharmaceuticals.* 2023;16(11):1573. doi:10.3390/ph16111573
45. Parra-Naranjo A, Delgado-Montemayor C, Fraga-López A, et al. Acute Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of Teuhetenone A Isolated from *Turnera diffusa*. *Molecules.* 2017;22(4):599. doi:10.3390/molecules22040599
46. Chaurasiya ND, Zhao J, Pandey P, Doerksen RJ, Muhammad I, Tekwani BL. Selective Inhibition of Human Monoamine Oxidase B by Acacetin 7-Methyl Ether Isolated from *Turnera diffusa* (Damiana). *Molecules.* 2019;24(4):810. doi:10.3390/molecules24040810

47. Zhao J, Dasmahapatra AK, Khan SI, Khan IA. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *J Ethnopharmacol.* 2008;120(3):387-393. doi:10.1016/j.jep.2008.09.016
48. Delgado-Montemayor C, Pérez-Meseguer J, Salazar-Aranda R, Cordero-Pérez P, Waksman N. Hepatodamianol as the hepatoprotective constituent of *Turnera diffusa*. *Pak J Pharm Sci.* 2023;36(5):1553-1559. doi:10.36721/PJPS.2023.36.5.REG.1553-1559.1
49. Willer J, Jöhrer K, Greil R, Zidorn C, Çiçek SS. Cytotoxic Properties of Damiana (*Turnera diffusa*) Extracts and Constituents and A Validated Quantitative UHPLC-DAD Assay. *Molecules.* 2019;24(5):855. doi:10.3390/molecules24050855
50. Taha MME, Salga MS, Ali HM, et al. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *J Ethnopharmacol.* 2012;141(1):273-281. doi:10.1016/j.jep.2012.02.030
51. Delgado-Montemayor C, Cordero-Pérez P, Torres-González L, et al. Development of a Hepatoprotective Herbal Drug from *Turnera diffusa*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022;2022:5114948. doi:10.1155/2022/5114948
52. Delgado Montemayor C. *Desarrollo de Un Medicamento Herbolario Con Actividad Hepatoprotectora a Partir de Turnera Diffusa*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2017.
53. Santana-Mayor Á, Socas-Rodríguez B, Rodríguez-Ramos R, Rodríguez-Delgado MÁ. A green and simple procedure based on deep eutectic solvents for the extraction of phthalates from beverages. *Food Chem.* 2020;312:125798. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125798
54. Mata-Huerta JR. *Comparación de La Eficiencia de Dos Métodos de Obtención de Extractos Hepatoprotectores de Turnera Diffusa*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2023.
55. Vial J, Jardy A. Validation of internal normalization for impurity assays. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2001;24(14):2067-2085. doi:10.1081/JLC-100104892
56. Parra-Naranjo A, Delgado-Montemayor C, Salazar-Aranda R, Castro-Ríos R, Saucedo AL, Waksman-Minsky N. Two Ways to Achieve the Same Goal—Two Validated Quantitative NMR Strategies for a Low-Abundance Natural Product in Standardized Extracts: The Case of Hepatodamianol in *Turnera diffusa*. *Molecules.* 2022;27(19):6593. doi:10.3390/molecules27196593
57. Zhao J, Pawar RS, Ali Z, Khan IA. Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *J Nat Prod.* 2007;70(2):289-292. doi:10.1021/np060253r

58. ICH Harmonised Guideline. Validation of Analytical Procedures Q2 (R2). 2023. Accessed March 30, 2024. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
59. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
60. Granados-Guzmán G, Salazar-Aranda R, Garza-Tapia M, Castro-Ríos R, Waksman de Torres N. Optimization and Validation of Two High-Throughput Methods Indicating Antiradical Activity. *Curr Anal Chem*. 2017;13(6):499–507. doi:10.2174/1573411013666170118111516
61. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *Food Chem*. 2004;84(3):329–339. doi:10.1016/S0308-8146(03)00216-4
62. United States Pharmacopeia, <467> Residual Solvents, Residual Solvents-Verification of Compendial Procedures and Validation of Alternative Procedures.
63. Solís-Cruz GY, Alvarez-Roman R, Rivas-Galindo VM, et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles loaded with riolozatrione: a promising nanoformulation with potential antiherpetic activity. *Acta Pharm*. 2023;73(3):457-473. doi:10.2478/acph-2023-0028
64. González-Moreno BJ, Galindo-Rodríguez SA, Rivas-Galindo VM, Pérez-López LA, Granados-Guzmán G, Álvarez-Román R. Enhancement of Strawberry Shelf Life via a Multisystem Coating Based on Lippia graveolens Essential Oil Loaded in Polymeric Nanocapsules. *Polymers (Basel)*. 2024;16(3):335. doi:10.3390/polym16030335
65. Montanari D, Agostini A, Bonini M, Corti G, Del Ventisette C. The use of empirical methods for testing granular materials in analogue modelling. *Materials*. 2017;10(6):635. doi:10.3390/ma10060635
66. Diaz DA, Colgan ST, Langer CS, Bandi NT, Likar MD, Van Alstine L. Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations? *AAPS J*. 2015;18(1):15-22. doi:10.1208/s12248-015-9830-9
67. Zhang Y, Huo M, Zhou J, et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J*. 2010;12(3):263-271. doi:10.1208/s12248-010-9185-1
68. Banakar U V. *Pharmaceutical Dissolution Testing, Bioavailability, and Bioequivalence*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2022. doi:10.1002/9781119634645

69. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.
70. Greenspan L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *J Res Natl Bur Stand A Phys Chem.* 1977;81A(1):89-96. doi:10.6028/jres.081A.011
71. Cordero-Pérez P, Tijerina-Márquez R, Rivas-Galindo VM, et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Jatropha dioica* against the valproic acid-induced damage in an in vivo model. *BMC Complement Med Ther.* 2025;25(1):207. doi:10.1186/s12906-025-04914-x
72. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2001.
73. Montemayor CD. *Aislamiento Biodirigido de Compuesto(s) Con Actividad Hepatoprotectora a Partir de Turnera Diffusa*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2013.
74. Saito T, Yamazaki T, Numata M. Development of nuclear magnetic resonance as a tool of quantitative analysis for organic materials. *Metrologia.* 2019;56(5):054002. doi:10.1088/1681-7575/AB348D
75. Nelson MA, Bedner M, Lang BE, Toman B, Lippa KA. Metrological approaches to organic chemical purity: primary reference materials for vitamin D metabolites. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(28):8557-8569. doi:10.1007/s00216-015-9013-7
76. Choi K, Myoung S, Seo Y, Ahn S. Quantitative NMR as a Versatile Tool for the Reference Material Preparation. *Magnetochemistry.* 2021;7(1):15. doi:10.3390/MAGNETOCHEMISTRY7010015
77. Pérez-Meseguer J, Garza-Juárez A, Salazar-Aranda R, et al. Development and Validation of an HPLC-DAD Analytical Procedure for Quality Control of Damiana (*Turnera diffusa*), Using an Antioxidant Marker Isolated from the Plant. *J AOAC Int.* 2010;93(4):1161-1168. doi:10.1093/jaoac/93.4.1161
78. Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT.* 2021;150:111932. doi:10.1016/j.lwt.2021.111932
79. Xu S, Chen Y, Ma Y, et al. Lipidomic Profiling Reveals Disruption of Lipid Metabolism in Valproic Acid-Induced Hepatotoxicity. *Front Pharmacol.* 2019;10:819. doi:10.3389/fphar.2019.00819
80. Yassin NYS, AbouZid SF, El-Kalaawy AM, Ali TM, Almehmadi MM, Ahmed OM. *Silybum marianum* total extract, silymarin and silibinin abate hepatocarcinogenesis and hepatocellular carcinoma growth via modulation of

- the HGF/c-Met, Wnt/ β -catenin, and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 2022;145:112409. doi:10.1016/j.biopha.2021.112409
81. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, CEMAR. (2025). Guía sobre impurezas en fármacos y medicamentos. México: COFEPRIS.
 82. Ngo W, Ahmed S, Blackadar C, et al. Why nanoparticles prefer liver macrophage cell uptake in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;185:114238. doi:10.1016/j.addr.2022.114238
 83. Li J, Chen C, Xia T. Understanding Nanomaterial–Liver Interactions to Facilitate the Development of Safer Nanoapplications. *Adv Mater.* 2022;34(11):2106456. doi:10.1002/adma.202106456
 84. He Y, Wang Y, Wang L, Jiang W, Wilhelm S. Understanding nanoparticle-liver interactions in nanomedicine. *Expert Opin Drug Deliv.* 2024;21(6):829-843. doi:10.1080/17425247.2024.2375400
 85. Vanzan DF, Goma EP, Locatelli FR, et al. Evaluation of Silybin Nanoparticles against Liver Damage in Murine Schistosomiasis mansoni Infection. *Pharmaceutics.* 2024;16(5):618. doi:10.3390/PHARMACEUTICS16050618/S1
 86. Mohamed Anter H, Mokhtar Aman R, Abdelaziz Shaaban A, Ibrahim Abu Hashim I, Mohamed Meshali M. Propitious maneuvering for delivery of the phytopharmaceutical “apocynin” to induced fulminant hepatitis in BALB/c mice: In vitro and in vivo assessments. *Int J Pharm.* 2022;626:122165. doi:10.1016/J.IJPHARM.2022.122165
 87. Mahmoud MH, El-Gogary RI, Soliman ME, Kamel AO. Novel green-based polyglycerol polymeric nanoparticles loaded with ferulic acid: A promising approach for hepatoprotection. *Int J Biol Macromol.* 2024;264:130698. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2024.130698
 88. Durymanov M, Permyakova A, Reineke J. Pre-treatment With PLGA/Silibinin Nanoparticles Mitigates Dacarbazine-Induced Hepatotoxicity. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:495. doi:10.3389/fbioe.2020.00495
 89. Hernández-Giottonini KY, Rodríguez-Córdova RJ, Gutiérrez-Valenzuela CA, et al. PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: Effects of formulation parameters. *RSC Adv.* 2020;10(8):4218-4231. doi:10.1039/c9ra10857b
 90. Badri W, Miladi K, Nazari QA, Fessi H, Elaissari A. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2017;516:238-244. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.12.029

91. Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharm Res.* 2004;21(8):1428-1439. doi:0724-8741/04/0800-1428/0
92. Piacentini E, Russo B, Bazzarelli F, Giorno L. Membrane nanoprecipitation: From basics to technology development. *J Memb Sci.* 2022;654:120564. doi:10.1016/j.memsci.2022.120564
93. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;163(2):90-122. doi:10.1016/j.cis.2011.02.005
94. Budhian A, Siegel SJ, Winey KI. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *Int J Pharm.* 2007;336(2):367-375. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.061
95. Ahirwar K, Shukla R. Preformulation Studies: A Versatile Tool in Formulation Design. In: *Drug Formulation Design.* IntechOpen; 2023. doi:10.5772/intechopen.110346
96. Warren FJ, Gidley MJ, Flanagan BM. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure—a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydr Polym.* 2016;139:35-42. doi:10.1016/J.CARBPOL.2015.11.066
97. Abdullah AHD, Chalimah S, Primadona I, Hanantyo MHG. Physical and chemical properties of corn, cassava, and potato starches. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2018;160(1):012003. doi:10.1088/1755-1315/160/1/012003
98. Krysa M, Szymańska-Chargot M, Zdunek A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chem.* 2022;393:133430. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430
99. Bishop JL, King SJ, Lane MD, et al. Spectral Properties of Anhydrous Carbonates and Nitrates. *Earth Space Sci.* 2021;8:e2021EA001844. doi:10.1029/2021EA001844
100. Cai G Bin, Chen SF, Liu L, et al. 1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid stabilized amorphous calcium carbonate: nucleation, transformation and crystal growth. *CrystEngComm.* 2010;12:234-241. doi:10.1039/B911426M
101. Ning J, Luo X, Wang F, et al. Synergetic Sensing Effect of Sodium Carboxymethyl Cellulose and Bismuth on Cadmium Detection by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry. *Sensors.* 2019;19(24):5482. doi:10.3390/s19245482

102. Cukrowicz S, Grabowska B, Kaczmarek K, Bobrowski A, Sitarz M, Tyliczszak B. Structural Studies (FTIR, XRD) of Sodium Carboxymethyl Cellulose Modified Bentonite. *Archives of Foundry Engineering*. 2020;20(3):119-125. doi:10.24425/AFE.2020.133340
103. Chen W, Zhang Y, Chen H, et al. Development of a Pure Certified Reference Material of D-Mannitol. *Molecules*. 2023;28(19):6794. doi:10.3390/MOLECULES28196794/S1
104. Wu LM, Tong DS, Zhao LZ, Yu WH, Zhou CH, Wang H. Fourier transform infrared spectroscopy analysis for hydrothermal transformation of microcrystalline cellulose on montmorillonite. *Appl Clay Sci*. 2014;95:74-82. doi:10.1016/J.CLAY.2014.03.014
105. Zheng D, Zhang Y, Guo Y, Yue J. Isolation and Characterization of Nanocellulose with a Novel Shape from Walnut (*Juglans Regia* L.) Shell Agricultural Waste. *Polymers (Basel)*. 2019;11(7):1130. doi:10.3390/polym11071130
106. Bosio A, Gianoncelli A, Zacco A, et al. A new nanotechnology of fly ash inertization based on the use of silica gel extracted from rice husk ash and microwave treatment. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanoengineering and Nanosystems*. 2014;228(1):27-32. doi:10.1177/1740349913490683
107. Hoag SW. Capsules dosage form: Formulation and manufacturing considerations. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2017:723-747. doi:10.1016/B978-0-12-802447-8.00027-3
108. Biological evaluation of medical devices-Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5. 2009. Accessed April 29, 2025. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>
109. Silva DA, Webster GK, Bou-Chacra N, Löbenberg R. The significance of disintegration testing in pharmaceutical development. *Dissolut Technol*. 2018;25:30-38. doi:10.14227/DT250318P30
110. United States Pharmacopeia, (2040) Disintegration and dissolution of dietary supplements.
111. Mehtani D, Seth A, Sharma P, et al. Dissolution Profile Consideration in Pharmaceutical Product Development. In: *Dosage Form Design Considerations: Volume I*. Elsevier; 2018:287-336. doi:10.1016/B978-0-12-814423-7.00009-5
112. FDA. Compilation of FDA Guidance and Resources for in vitro Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.

<https://www.fda.gov/animal-veterinary/new-animal-drug-applications/compilation-fda-guidance-and-resources-in-vitro-dissolution-testing-immediate-release-solid-oral-dosage>.

113. United States Pharmacopeia, <1092> The dissolution procedure: development and validation.
114. Jakab G, Bogdán D, Mazák K, et al. Physicochemical Profiling of Baicalin Along with the Development and Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(8):314. doi:10.1208/s12249-019-1525-6
115. Šedbarè R, Janulis V, Ramanauskiene K. Formulation and Biopharmaceutical Evaluation of Capsules Containing Freeze-Dried Cranberry Fruit Powder. *Plants*. 2023;12(6). doi:10.3390/plants12061397
116. Mbamalu ON, Syce J, Samsodien H. Challenges relating to comparison of flavonoid glycosides dissolution profiles from *Sutherlandia frutescens* products. *Acta Pharm*. 2017;67(1):137-146. doi:10.1515/acph-2017-0003
117. Bredael G, Liang S, Hahn D. A Strategy for Quality Control Dissolution Method Development for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms. *Dissolut Technol*. 2015;22:10-16. doi:10.14227/DT220315P10
118. Ashokraj Y, Daroi A, Gupta R, et al. Discriminatory Dissolution Method Development and Validation of Etoricoxib Tablets. *Dissolut Technol*. 2016;23(2):30-34. doi:10.14227/DT230216P30
119. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm*. 2008;364(2):328-343. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.004
120. Askarizadeh M, Esfandiari N, Honarvar B, Sajadian SA, Azdarpour A. Kinetic Modeling to Explain the Release of Medicine from Drug Delivery Systems. *ChemBioEng Reviews*. 2023;10(6):1006-1049. doi:10.1002/cben.202300027
121. Mayer BX, Mensik C, Krishnaswami S, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic profile of systemic nitric oxide-synthase inhibition with L-NMMA in humans. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(5):539-544. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00930.x
122. Costa P, Sousa-Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*. 2001;13(2):123-133. doi:10.1016/s0928-0987(01)00095-1
123. Martín-Camacho U de J, Rodríguez-Barajas N, Sánchez-Burgos JA, Pérez-Larios A. Weibull β value for the discernment of drug release mechanism of PLGA particles. *Int J Pharm*. 2023;640:123017. doi:10.1016/j.ijpharm.2023.123017

124. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm.* 2006;309(1-2):44-50. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.044
125. USP – United States Pharmacopeial Convention USP 35–NF 30 (2023) Microbiological attributes of nonsterile nutritional and dietary supplements.
126. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). Chapter 5.1.8 Microbiological Quality of Herbal Medicinal Products for Oral Use.
127. Tyski S, Burza M, Laudy AE. Microbiological Contamination of Medicinal Products —Is It a Significant Problem? *Pharmaceuticals.* 2025;18(7):946. doi:10.3390/ph18070946
128. WHO. WHO guidelines for selecting marker substances of herbal. *WHO Technical Report Series, No. 1003.* Preprint posted online 2017:71-86.
129. ICH. ICH Harmonised Tripartite Guideline Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria For Biotechnological/Biological Products Q6B.
130. Bharali P, Chand S, Chander H. A Cost-Effective and Robust Cell-Based Bioassay Method for Evaluating the Bioactivity of Trastuzumab-like Antibodies. *Biomedicines.* 2025;13(1):23. doi:10.3390/biomedicines13010023
131. Limpikirati PK, Mongkoltipparat S, Denchaipradit T, et al. Basic regulatory science behind drug substance and drug product specifications of monoclonal antibodies and other protein therapeutics. *J Pharm Anal.* 2024;14(6):100916. doi:10.1016/j.jpha.2023.12.006

ANEXOS

Anexo I: Espectros de IR de prueba de solubilidad

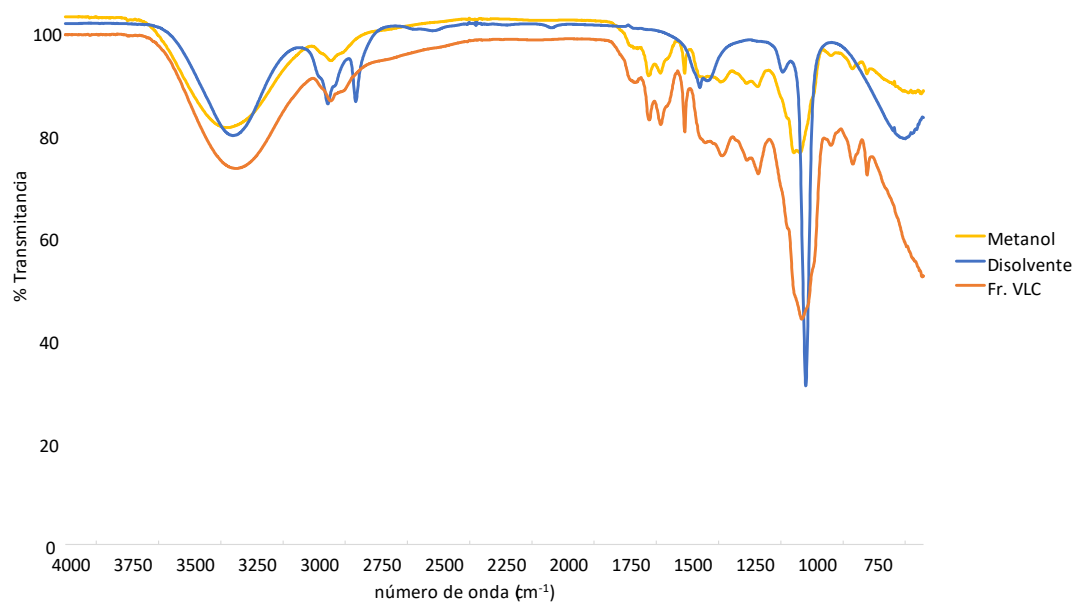


Figura 48. Espectro de IR de prueba con MeOH.

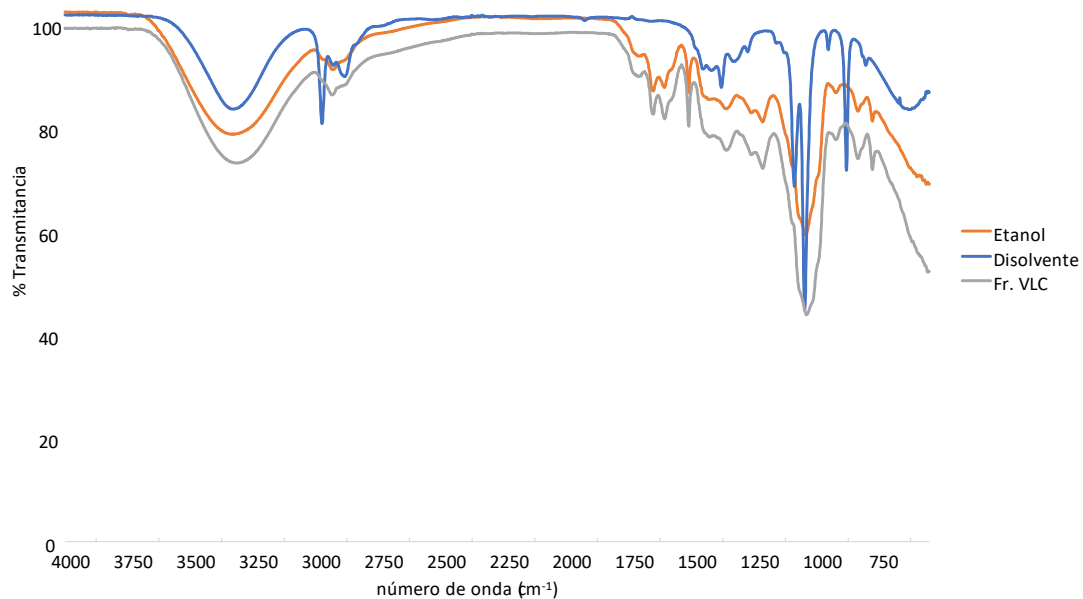


Figura 49. Espectro de IR de prueba con etanol.

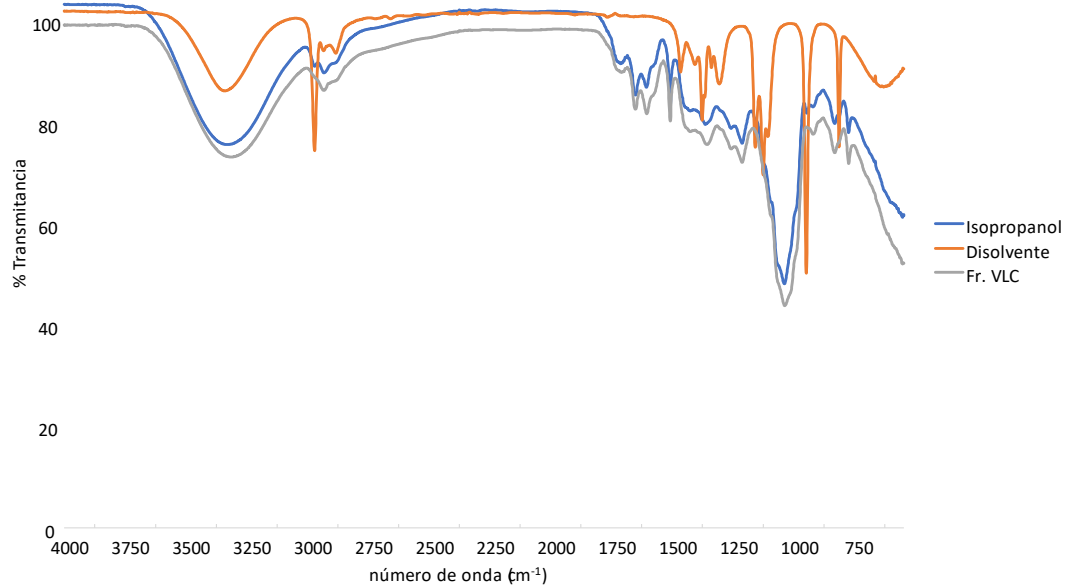


Figura 50. Espectro de IR de prueba con isopropanol.

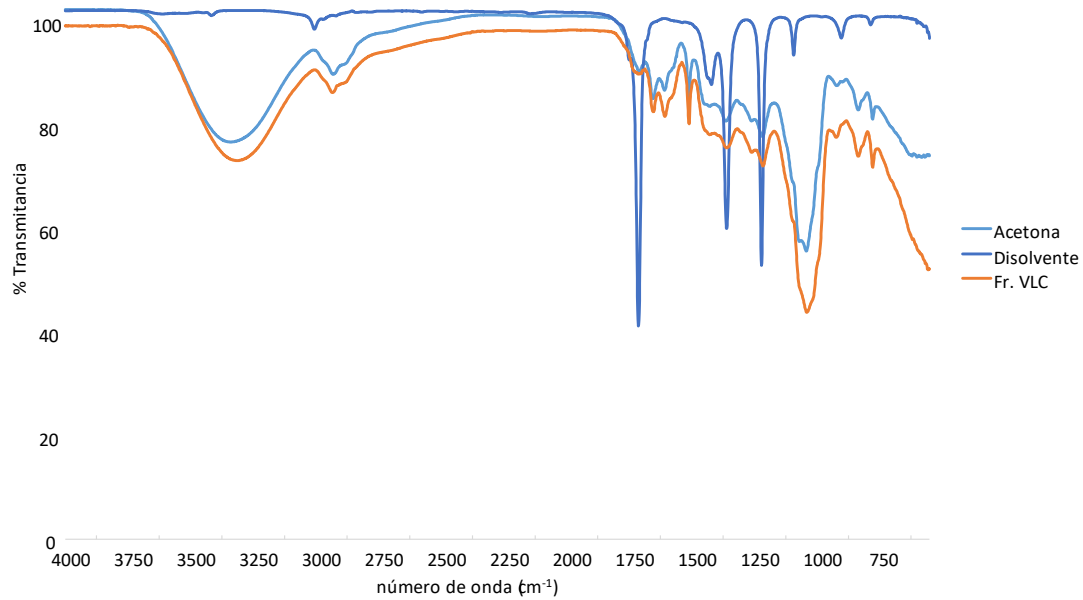


Figura 51. Espectro de IR de prueba con acetona.

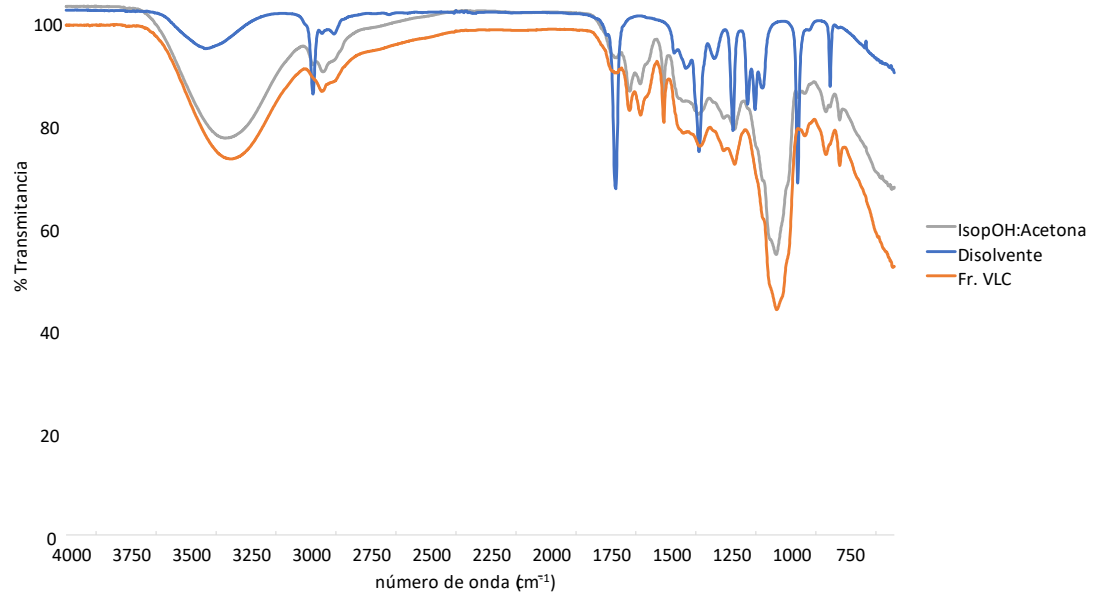


Figura 52. Espectro de IR de prueba con isopropanol:acetona.

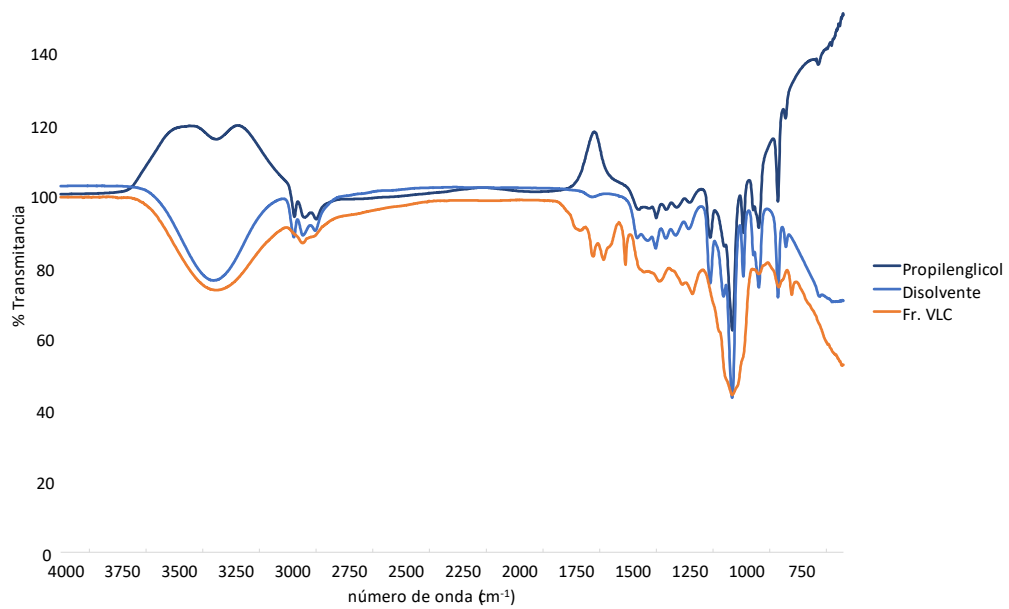


Figura 53. Espectro de IR de prueba con propilenglicol.

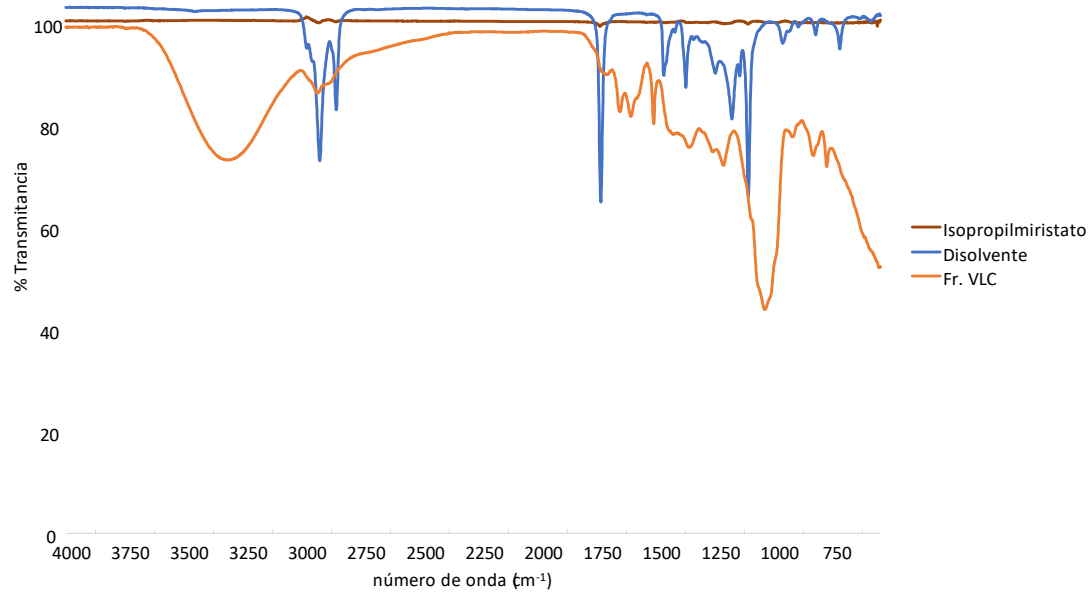


Figura 54. Espectro de IR de prueba con isopropilmiristato.

Anexo II: Espectros de IR de prueba estabilidad a 30 días

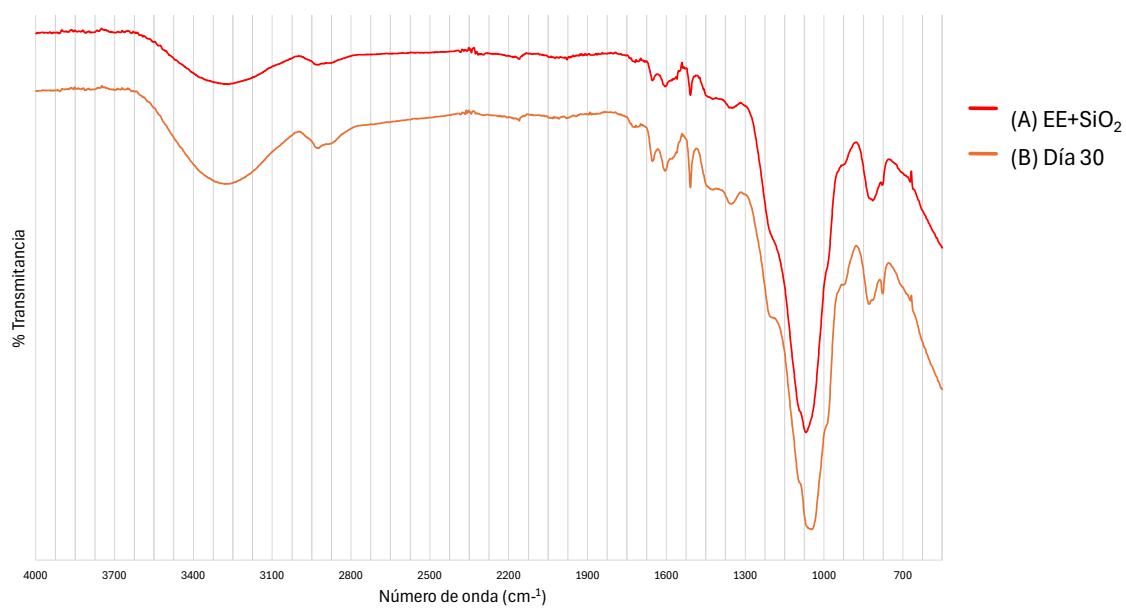


Figura 55. Espectro de IR de mezcla de EE y SiO₂ (A) día 1, (B) día 30.

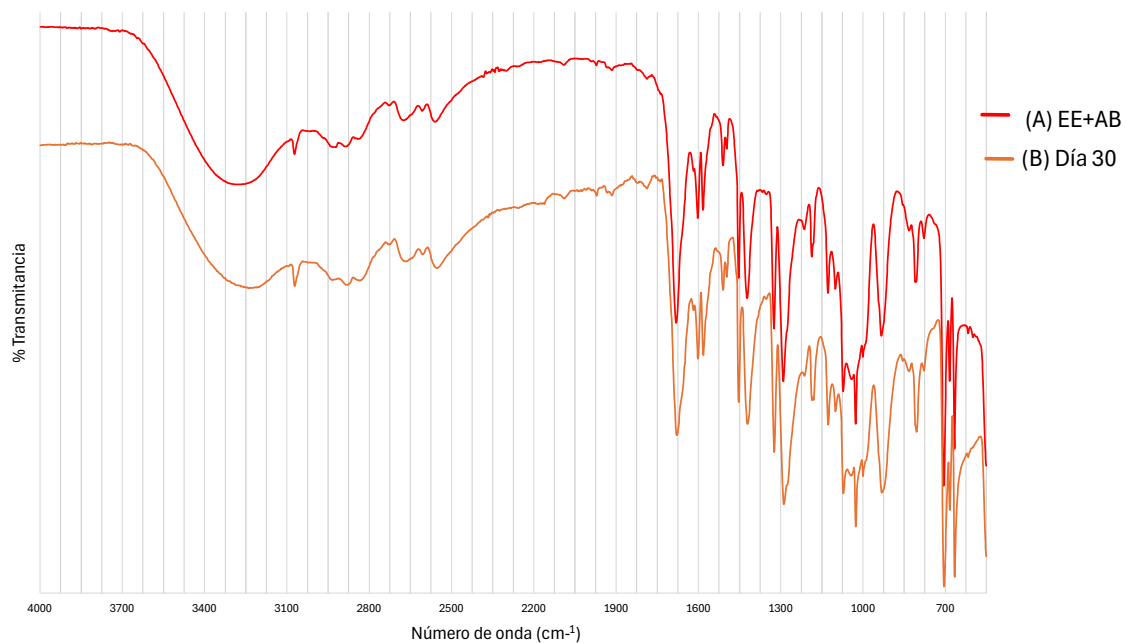


Figura 56. Espectro de IR de mezcla de EE y ácido benzoico (A) día 1, (B) día 30.

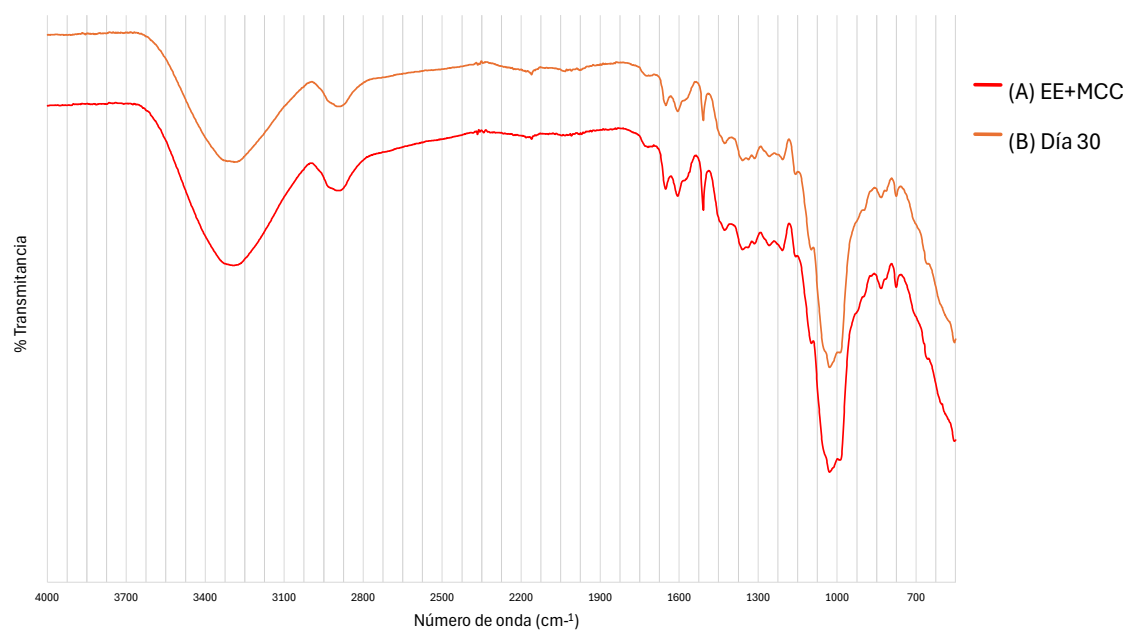


Figura 57. Espectro de IR de mezcla de EE y MCC (A) día 1, (B) día 30.



Figura 58. Espectro de IR de mezcla de EE, MCC y ácido benzoico (A) día 1, (B) día 30.



Figura 59. Espectro de IR de mezcla de EE, SiO₂ y ácido benzoico (A) día 1, (B) día 30.

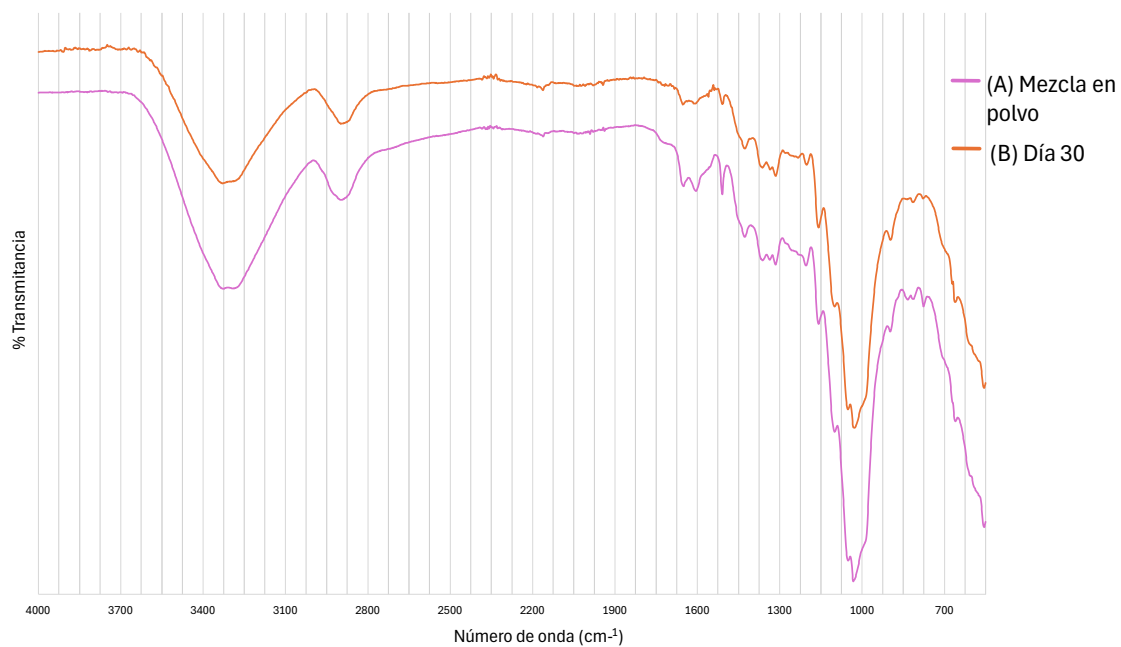


Figura 60. Espectro de IR de la formulación en polvo (A) día 1, (B) día 30.

**Anexo III Espectros de masas por impacto electrónico de los disolventes analizados
para la determinación de disolventes residuales**

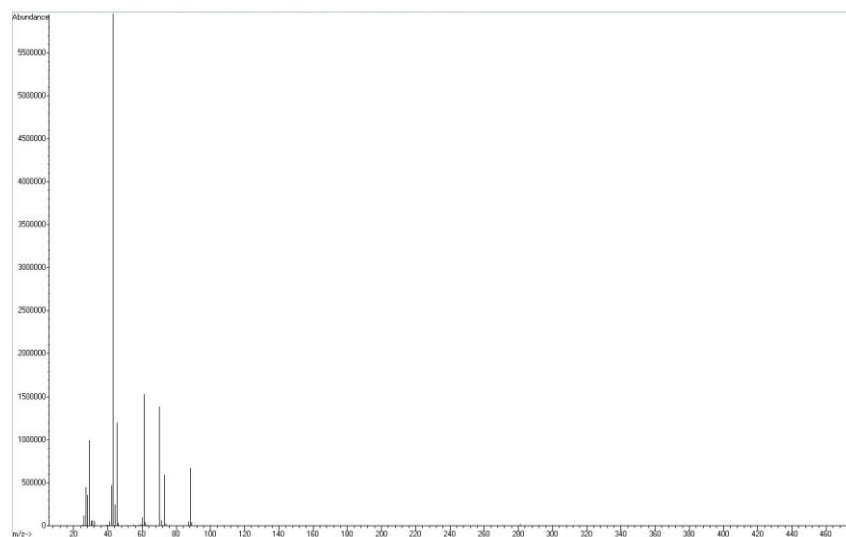


Figura 61. Espectro de masas de acetato de etilo.



Figura 62. Espectro de masas de acetona



Figura 63. Espectro de masas de agua

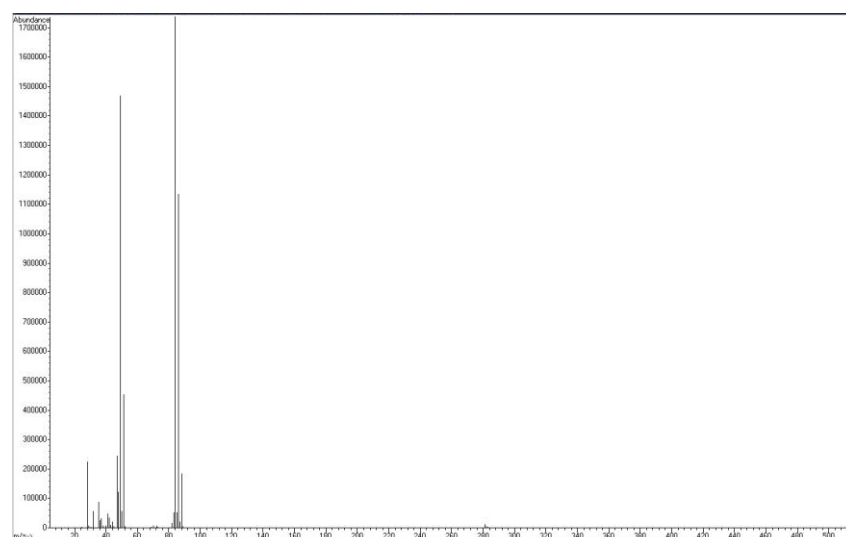


Figura 64. Espectro de masas de cloruro de metileno



Figura 65. Espectro de masas de etanol

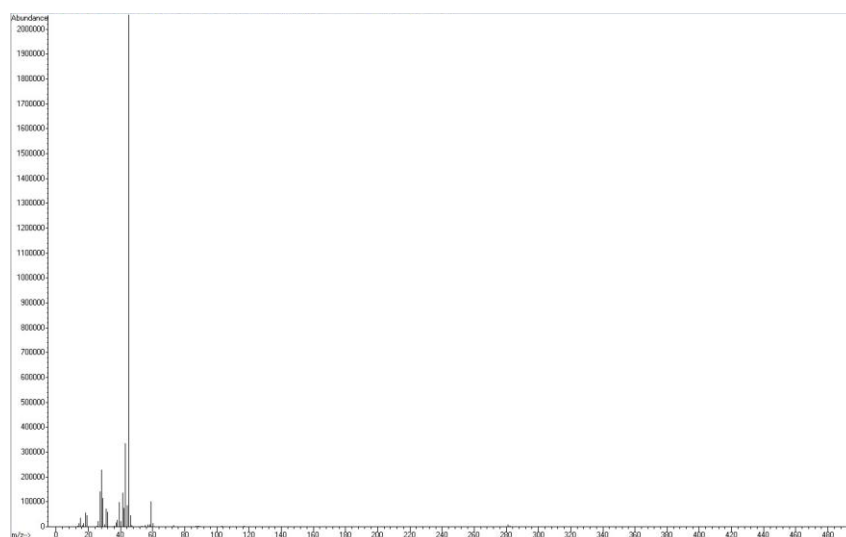


Figura 66. Espectro de masas de isopropanol



Figura 67. Espectro de masas de metanol



Figura 68. Espectro de masas de dióxido de carbono

**Anexo IV: Aspecto y montado del equipo de desintegración y reporte de análisis
emitido**

GRUPO MEDIFARMA



Figura 69. Sinkers malla N.10.

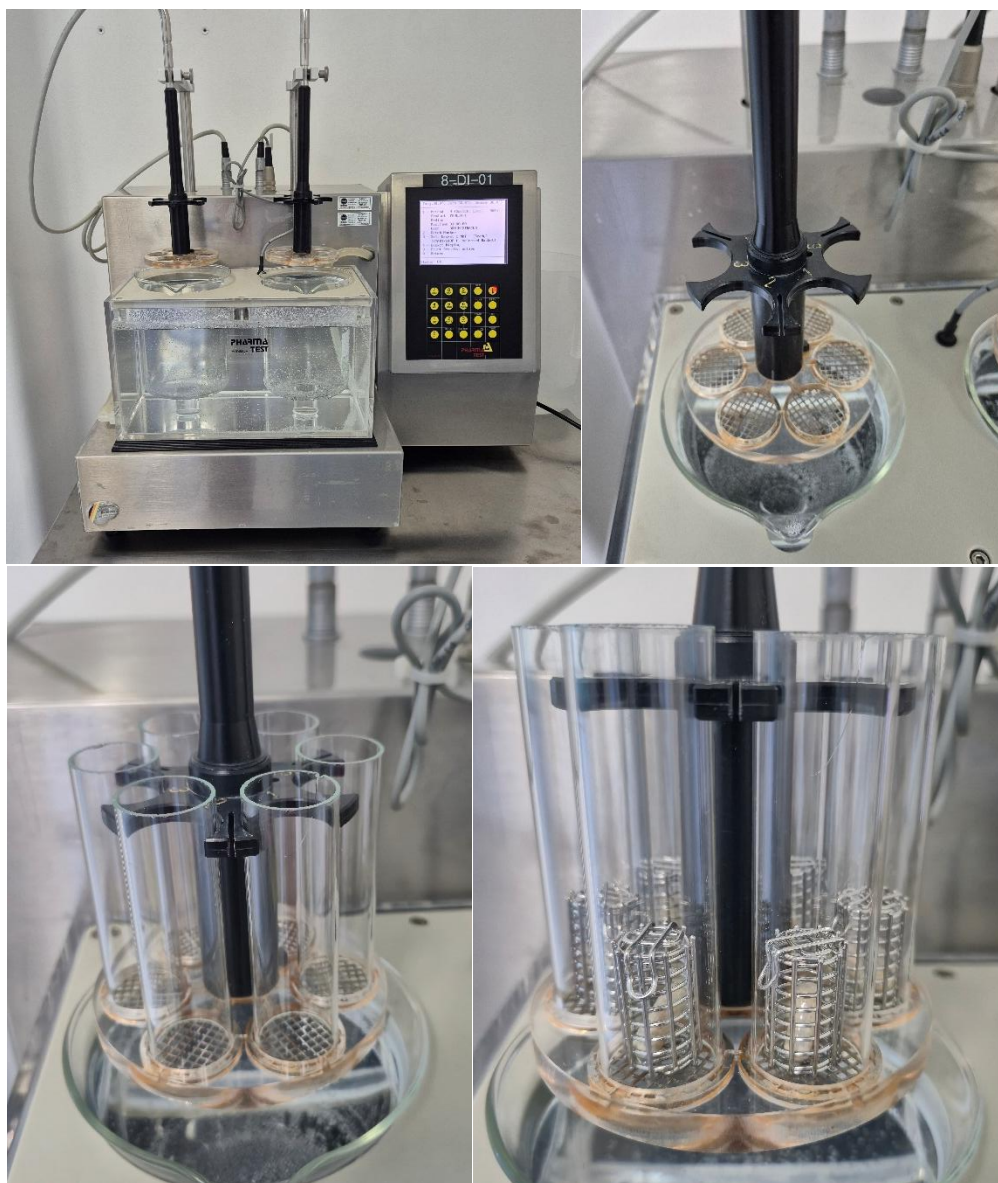


Figura 70. Aspecto y montaje del Desintegrador PHARMATEST PTZ Auto.



Figura 71. Aspecto posterior a la desintegración.

GRUPO MEDIFARMA

Departamento de Innovación y tecnología

DESINTEGRACIÓN

Datos del Producto

Producto:	Cápsulas de Damiana
Lote Proveedor:	n.a.
No. de Análisis:	n.a.
Tipo de análisis:	PG
Cantidad:	20 Tab
Fecha Fabricación:	12-MAY-25
Fecha Caducidad:	31-DIC-26
Fecha Recepción:	14-MAY-25
Fecha De análisis:	15-MAY-25
Ejecutó:	LF. Luis Alcocer

Datos del equipo

DESINTEGRADOR	
Clave:	8-DS-01
Marca:	PHARMATEST
Modelo:	PTZ AUTO
Bitacora:	BIT-013-01
Página:	014
Fecha de Cal.:	09-MAY-25
Medio:	Agua purificada
T° del medio:	37°C
Ciclos:	30 /min

DETERMINACIÓN	MÉTODO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Desintegración de cápsula de gelatina dura	MGA 0261. Desintegración - FEUM 13a edición.	INFORMATIVO	2' 31"

Observaciones:

Para la ejecución de la prueba de desintegración, la farmacopea indica el uso de tamiz de alambre de Malla N.10, esto para mitigar la flotabilidad de las cápsulas. Grupo Medifarma no cuenta con los dispositivos, sin embargo, la prueba se ejecutó con **sinker de canastilla con abertura de malla N.10 (2-3 mm)** lo cual asegura el mismo fundamento y condiciones (Ver evidencia fotográfica del proceso en Anexo 1).

Adicionalmente, la prueba se realizó con un tiempo final de **5 min** para asegurar la completa desintegración y se ejecutó por **triplicado** para obtener datos significativos. Los tiempos de desintegración de la cápsulas varían entre cada unidad dosis (6 cápsulas por prueba) dando un tiempo mínimo de desintegración= **2' 12"** y un tiempo máximo de desintegración= **2' 53"**.

Realizó:  16-MAY-25

LF. Luis Alfredo Alcocer Rivera.

Formulador

Figura 72. Reporte prueba de desintegración de cápsulas rígidas de gelatina.

Anexo V Gráficos de mejor ajuste para los modelos de mecanismo de liberación evaluados

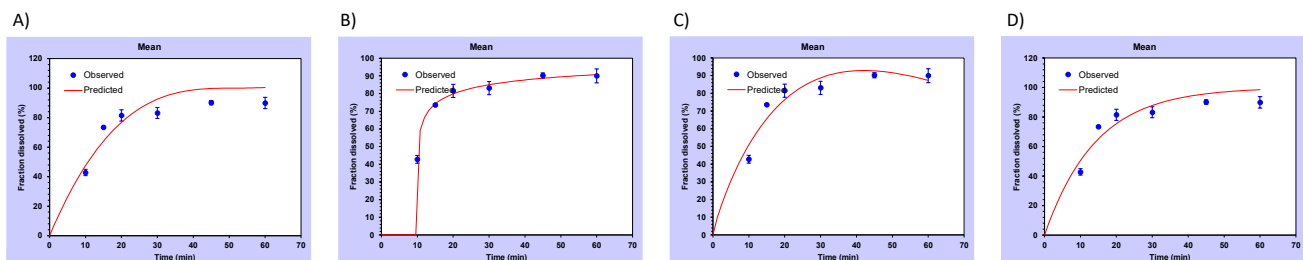


Figura 73. Gráficos de mejor ajuste en solución de HCl pH 1.2. A) modelo Hixson-Crowel. B) modelo Weibull. C) modelo Makoid-Banakar. D) modelo de primer orden.

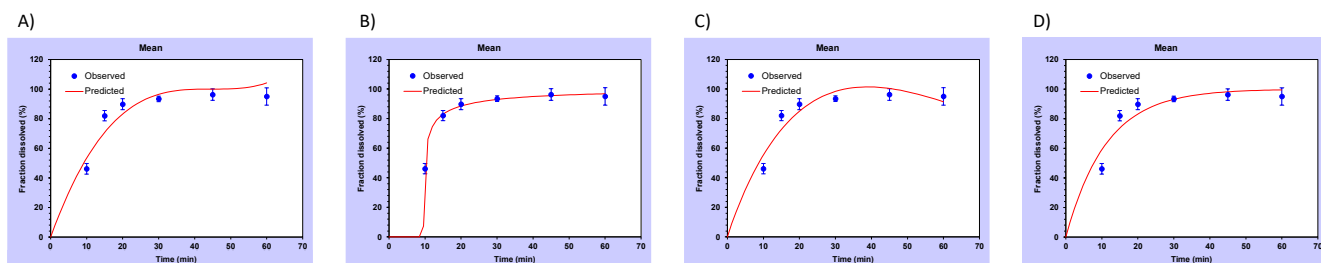


Figura 74. Gráficos de mejor ajuste en solución de buffer de acetatos pH 4.5. A) modelo Hixson-Crowel. B) modelo Weibull. C) modelo Makoid-Banakar. D) modelo de primer orden.

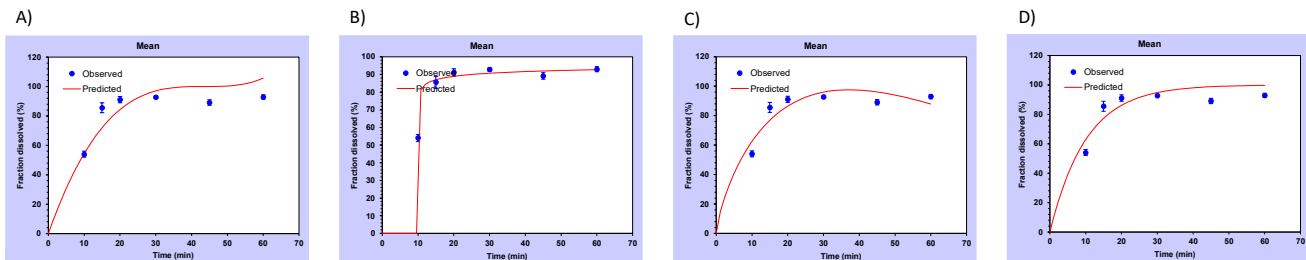


Figura 75. Gráficos de mejor ajuste en solución de buffer de fosfatos pH 6.8. A) modelo Hixson-Crowel. B) modelo Weibull. C) modelo Makoid-Banakar. D) modelo de primer orden.

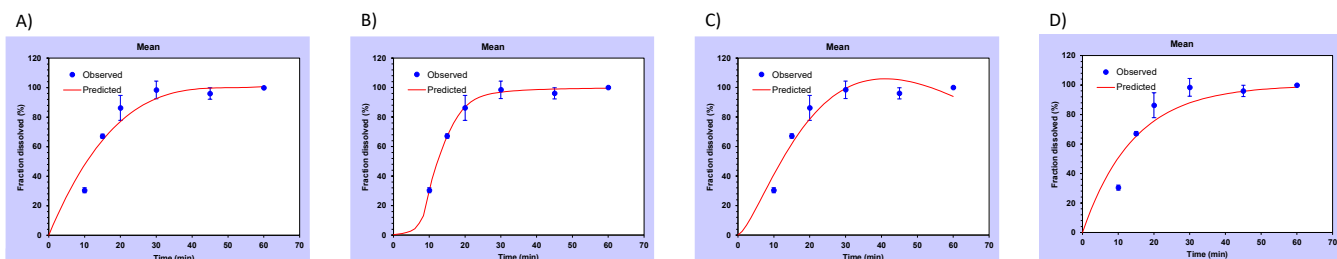


Figura 76. Gráficos de mejor ajuste en agua. A) modelo Hixson-Crowel. B) modelo Weibull. C) modelo Makoid-Banakar. D) modelo de primer orden.