



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“MICROENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA MEDIANTE
GELIFICACIÓN IÓNICA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ESTEBAN NICOLÁS VELASCO ROMERO

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA., M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2016

©2016, Esteban Nicolás Velasco Romero

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “MICROENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA” de responsabilidad del señor Esteban Nicolás Velasco Romero, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF Diego Vinueza Tapia., M.Sc. DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	_____
Dra. Adriana Rincón MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Lic. Karen Agosta DELEGADA DEL DECANO	_____	_____
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH	_____	_____

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Esteban Nicolás Velasco Romero, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba 30 de Marzo del 2016

ESTEBAN NICOLÁS VELASCO ROMERO

060440836-9

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme con la salud y la vida.

A mis padres por su amor incondicional, por su dedicación y esmero.

A mi Familia ya que con su amor y su apoyo me han ayudado a salir adelante.

Esteban

AGRADECIMIENTO

A mi mamá por todo su amor y cariño, por el esfuerzo y dedicación que has puesto para sacarnos adelante a mis hermanos y a mí, por enseñarnos que la educación es el mejor regalo que un padre le puede dejar a su hijo, pero sobre todo gracias por enseñarme que la humildad y la honestidad son lo que hacen a una persona valiosa.

A mi papá por brindarme su apoyo y alentarme a seguir adelante.

A la ESPOCH y sus docentes, por haber dedicado su tiempo y haber compartido sus conocimientos durante toda mi formación académica.

A mis hermanos Nancy y Javier por sus consejos y su apoyo incondicional.

A mis abuelitos Enriqueta y Víctor por el amor que me han sabido mostrar durante toda mi vida y por las enseñanzas impartidas.

A mi tía Nancita quien ha sido mi segunda madre gracias por tu cariño, gracias por formar parte de mi vida y brindarme el apoyo que he necesitado siempre, por enseñarme a ser agradecido, responsable y sobre todo honesto.

A mi tutor y amigo, Diego Vinuesa por su ayuda durante el desarrollo de este trabajo, gracias por creer en mí y por compartir tu conocimiento conmigo y por alentarme a seguir adelante.

A todos mis amigos por haber estado ahí en las buenas y en las malas siempre brindándome su apoyo incondicional, enseñándome que siempre se puede ser mejor y que el verdadero significado de la palabra AMISTAD es “**HERMANDAD**”

Esteban

TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Metabolitos secundarios.....	5
1.2. Compuestos fenólicos	5
1.2.1. Flavonoides.....	6
<i>1.2.1.1. Actividad Farmacológica</i>	<i>9</i>
<i>1.2.1.2. Fuente de flavonoides.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.1.3. Aplicaciones clínicas.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.1.4. Criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante.....</i>	<i>10</i>
1.2.3. Quercetina	11
<i>1.2.3.1. Fuentes de quercetina</i>	<i>12</i>
<i>1.2.3.2. Beneficios de la quercetina y aplicaciones clínicas.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2.3.3. Características farmacocinéticas</i>	<i>13</i>
<i>1.2.3.4. La quercetina en el tratamiento del cáncer</i>	<i>13</i>
1.3 Formas farmacéuticas de liberación modificada de administración oral.....	14
1.3.1. Definición	14

1.3.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	15
1.3.3.	<i>Clasificación</i>	15
1.4.	Microencapsulación	17
1.4.1.	<i>Definición</i>	17
1.4.2.	<i>Tipos de microcápsulas</i>	17
1.4.3.	<i>Beneficios de la microencapsulación en el campo farmacéutico.</i>	18
1.4.4.	<i>Métodos de microencapsulación</i>	19
1.4.4.1.	<i>Gelificación Iónica</i>	21
1.4.5.	<i>Materiales usados en microencapsulación</i>	21
1.4.5.1.	<i>Polímeros</i>	21
1.4.5.2.	<i>Quitosano</i>	22
 CAPÍTULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	24
2.1	Lugar de investigación	24
2.2	Equipos y Reactivos	24
2.2.1	<i>Equipos</i>	24
2.2.2	<i>Materiales</i>	24
2.2.3	<i>Reactivos</i>	25
2.3	Técnicas y métodos	25
	27
	28
2.3.1	<i>Solubilidad de la quercetina</i>	29
2.3.2	<i>Determinación de las concentraciones de CS y TPP para la formación de microcápsulas.</i> ..	30
2.3.3	<i>Determinación de la eficiencia de encapsulación</i>	32
 CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
3.1.	Solubilidad de quercetina	34

3.2.	Derminación de las concentraciones de CS y TPP para la formación de microcápsulas...	36
3.3.	Determinación de la eficiencia de encapsulación	38
3.3.1.	<i>Análisis de Taguchi</i>.....	40
	CONCLUSIONES.....	43
	RECOMENDACIONES.....	44
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.....	Grupo de Flavonoides.....	7
Tabla 2-1.....	Criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de un flavonoide.....	11
Tabla 3-1.....	Métodos para la obtención de microcápsulas.....	20
Tabla 4-1.....	Tamaño de partícula en función del método.....	20
Tabla 1-2.....	Alícuotas de las mezclas etanol – agua.....	29
Tabla 1-3.....	Solubilidad de quercetina en mg.....	34
Tabla 2-3.....	Coefficientes de modelos estimados para medias.....	40
Tabla 3-3.....	Tabla de respuestas para medias.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1Estructura básica de un flavonoide.....	7
Figura 2-1Estructura química de la quercetina.....	11
Figura 3-1Perfiles de concentración plasmática.....	16
Figura 4-1Tipos de microcápsulas.....	18
Figura 5-1Estructura del quitosano.....	22
Figura 1-2Ensayos previos para la obtención de microcápsulas.....	26
Figura 2-2Obtención de microcápsulas a partir de CS y TPP.....	27
Figura 3-2Eficiencia de encapsulación de quercetina.....	28
Figura 4-2Volúmenes de TPP añadidos al CS.....	30
Figura 5-2Soluciones de TPP añadidas a cada solución de CS.....	32
Figura 1a-3Identificación de la formación de microcápsulas, paso 1.....	36
Figura 1b-3Identificación de la formación de microcápsulas, paso 2.....	38
Figura 2-3Factores y niveles del diseño experimental.....	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3.....	Curva de calibración de Quercetina.....	34
Gráfico 2-3.....	Solubilidad de Quercetina.....	35
Gráfico 3-3.....	Curva de calibración Quitosan-Quercetina.....	38
Gráfico 4-3.....	Gráfica de interacción para medias.....	42

INDICE DE ANEXOS

Anexo A.....Diseño Robusto de taguchi. Número de experimentos realizados

Anexo B.....Soluciones de quercetina en mezclas etanol – agua (20/80, 30/70, 40/60, 50/50) y etanol puro.

Anexo C.....Soluciones de quitosan en concentraciones 0.05%, 0.1%, 0.5% y 1%.

Anexo D.....Soluciones de TPP en concentraciones 0.05%, 0.1%, 0.5% y 1%.

Anexo E.....Determinación de las concentraciones de CS y TPP, paso 1.

Anexo F.....Determinación de las concentraciones de CS y TPP, paso 2.

Anexo G.....Determinación de la eficiencia de encapsulación.

Anexo H.....Identificación de microcápsulas de quercetina mediante microscopio óptico.

Anexo I.....Concentración de quercetina libre.

Anexo J.....Porcentaje eficiencia de encapsulación (%EE) de quercetina.

RESUMEN

Se elaboró microcápsulas utilizando Quitosan (CS) y Tripolifosfato (TPP) como agentes gelificantes, determinando si la eficiencia de encapsulación mediante la técnica propuesta alcanza al menos un porcentaje del 50%. El estudio consistió de tres ensayos: solubilidad de quercetina en diferentes mezclas etanol – agua, determinación de las proporciones a las que el CS y el TPP forman microcápsulas utilizando la técnica descrita por Calvo en 1996, y cuantificación del porcentaje de eficiencia de encapsulación mediante métodos espectrofotométricos. Para el ensayo de solubilidad se obtuvo que en una proporción etanol – agua 30/70 la quercetina mostró una solubilidad de 0.59 mg/mL y la solución no mostró incompatibilidad con el resto de componentes. Se establecieron las proporciones a las cuales el CS y el TPP formaron microcápsulas obteniéndose que, a concentraciones de CS/TPP de 0.1/0.06, 0.1/0.07 y 0.1/0.08 %, existe formación de microcápsulas. Para cuantificar la eficiencia de encapsulación se construyó un diseño experimental robusto de Taguchi, los factores a ser controlados fueron el tiempo de agitación, la velocidad de agitación y la proporción CS/TPP, se plantearon 27 ensayos y fueron analizados mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 272 nm, como resultado se obtuvo que el ensayo número 3, para el cual se manejó un tiempo de agitación de 15 min, una velocidad de agitación de 250 rpm y una proporción CS/TPP 0.1/0.08 %, presentó la mayor eficiencia de encapsulación con un porcentaje promedio de 77.434%. Se recomendó continuar con el estudio de las microcápsulas de quercetina determinando el tamaño de la micropartícula, la capacidad de carga y la liberación *in vitro* del principio activo.

Palabras Clave: <MICROENCAPSULACIÓN>, <GELIFICACIÓN IÓNICA>, <QUERCETINA>, <EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN>, <DISEÑO ROBUSTO DE TAGUCHI>, <QUITOSAN [CS]>, <TRIPOLIFOSFATO [TPP]>, <TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA>.

SUMMARY

Microcapsules were prepared using Chitosan (CS) and Tripolyphosphate (TPP) as gelling agents, in order to determine if the encapsulation efficiency by using the proposed technique achieves at least 50%. The studied consisted of three tests: quercetin solubility in different blends; ethanol-water, determination of the proportions to which the CS and TPP form microcapsules using the technique described by Calvo in 1996, and percentage quantification of the encapsulation efficiency by spectrophotometric methods. For the solubility testing the results were that in a portion ethanol - water 30/70, quercetin showed a solubility of 0.59 mg/mL and the solution did not show incompatibility with the other components. The proportions were established to which CS and TPP formed microcapsules showing that, to concentrations of CS/TPP 0.1/0.06, 0.1/0.07 y 0.1/0.08%, there is microcapsule formation. In order to quantify the encapsulation efficiency, the Taguchi robust experimental design was built, the factors to be controlled were stirring time; stirring speed, and CS/TPP proportion, 27 tests were formulated and analyzed through UV spectrophotometry at a wavelength of 272 nm, as a result it was observed that the test number 3, for which a stirring time of 272 was used, a stirring speed of 250 rpm, and a proportion CS/TPP 0.1/0.08%, showed the highest encapsulation efficiency with an average percentage of 77.434. It is recommended to continue with the quercetin microcapsules study by determining the microparticle size, the load capacity, and the *in vitro* release of the active ingredient.

Keywords: <MICROENCAPSULATION>, <IONIC GELIFICATION>, <QUERCETIN>, <ENCAPSULATION EFFICIENCY>, <TAGUCHI ROBUST DESIGN>, <CHITOSAN [CS]> <TRIPOLYPHOSPHATE [TPP]> < PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY>.

INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

En la actualidad existen una serie de compuestos con actividad biológica que de una u otra forma actúan en beneficio del organismo generando respuestas favorables durante su uso. Las características fisicoquímicas, propias de dichas sustancias, en muchas ocasiones son limitantes para que estas lleguen y actúen de la manera que lo deben hacer puesto que pueden verse afectadas por condiciones ya sean del ambiente donde son manipuladas como la temperatura, la humedad, la presión, etc., por su inestabilidad química o por las barreras metabólicas del organismo.

El estilo de vida que las personas llevan hoy en día es un factor sumamente relevante para la aparición de problemas de salud. Enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares son el resultado de los inadecuados hábitos alimenticios y el consumo de alimentos con bajo nivel nutricional que llevan a la aparición del estrés oxidativo por acumulación de especies reactivas de oxígeno conocidos como radicales libres (Delgado et al., 2010, pp.10-15).

Los radicales libres son el resultado de procesos metabólicos propios del organismo, en condiciones fisiológicas estos radicales son neutralizados con enzimas antioxidantes (peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión, etc) pero cuando estas enzimas no se encuentran en cantidad suficiente existe un desbalance que puede provocar grandes daños a células y biomoléculas. (Maldonado et al., 2010, p.32)

Los antioxidantes son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones desencadenan procesos patológicos considerados graves. Otra función de los antioxidantes es la de facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias reduciendo así los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno mediante la formación de complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales libres (Zamora, 2007)

La utilización de sustancias antioxidantes exógenas compensa el desbalance antes descrito, siendo los flavonoides el grupo de sustancias vegetales más utilizadas por su actividad secuestradora de radicales libres.

La quercetina es una sustancia de origen vegetal que pertenece al grupo de los flavonoides, ampliamente utilizados por su capacidad antioxidante, que se encuentra presente en la dieta diaria humana. Los flavonoides en general y por ende la quercetina presentan una baja absorción en humanos, esto debido a que es muy poco soluble ya que en la mayoría de casos ésta se encuentra glicosidada y polimerizada, lo que ocasiona que tenga menor reactividad e incluso una menor eficacia como antioxidante (siendo la quercetina el flavonoide con la mayor actividad antioxidante). Para que la actividad antioxidante de la quercetina pueda ser aprovechada al máximo se deben tener en cuenta ciertas barreras que condicionan su accionar como son su baja solubilidad, baja permeabilidad, alto metabolismo y excreción y la captación por parte de los tejidos diana. (Scalia & Mezzena, 20009, pp.90-94)

Debido a que el contenido de quercetina en la dieta diaria es baja (aproximadamente 20-35 mg), y gracias a su poder antioxidante la cantidad consumida no es suficiente para satisfacer las necesidades que el organismo tiene con respecto al estrés oxidativo como se ha explicado anteriormente, planteándose así la necesidad de considerar diversos enfoques que le permitan a la quercetina alcanzar sus objetivos y ejercer su función de una forma eficaz, ideando ya sean nuevas formulaciones o medios de transporte, microcápsulas o nanocápsulas, que faciliten su acceso al tejido diana (BIO-INREN, 2014).

Según estadísticas y datos de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) y el Registro Nacional de Tumores, el cáncer colorectal a nivel nacional ocupa el quinto lugar en varones y el sexto lugar en mujeres, convirtiéndose en un problema de salud pública muy preocupante. El estilo de vida, el ambiente, la alimentación y las condiciones biológicas propias del individuo juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad razón por la cual es de suma importancia investigar sobre nuevos tratamientos y métodos que puedan contribuir con la disminución de la prevalencia de este tipo de cáncer que como se explicó anteriormente afecta a una población considerable de nuestro país.

Investigaciones realizadas en Estados Unidos y Europa acerca del uso de flavonoides en la terapia contra el cáncer, muestran una disminución en la aparición de tumores relacionados a esta

enfermedad. El principal responsable de este efecto es el flavonoide denominado Quercetina sustancia capaz de inhibir el crecimiento de tumores en cáncer de colon y recto, obteniéndose resultados alentadores con el uso de esta terapia.

Estudios han revelado que la terapia con quercetina (10 μ M) reduce los niveles estacionarios de las proteínas p21-ras tanto en líneas celulares de cáncer como en tumores colorectales primarios. Tratamientos de 24 horas con dosis de 10 μ M de quercetina han mostrado una reducción aproximada del 50% en los niveles de p21-ras lo que hace suponer que la quercetina se puede utilizar como un tratamiento quimiopreventivo en carcinogénesis colorectal (Ranelletti et al., 2000, pp.438-45).

Como se mencionó anteriormente para que la quercetina cumpla con su acción tiene que afrontar ciertas barreras principalmente su solubilidad y el alto metabolismo que sufre. En la industria farmacéutica surgen una serie de técnicas y procesos que nos permiten hasta cierto punto controlar y mejorar dichos obstáculos, una de estas técnicas es la microencapsulación la cual nos permite encapsular sustancias o compuestos activos dentro de microcápsulas que consisten de una membrana semipermeable, fuerte y delgada formada a partir de polímeros protectores que rodean y contienen la sustancia de interés (Reyes, 2010).

Por lo anterior el uso de la microencapsulación permitirá conseguir que la quercetina que es poco permeable y poco soluble logre atravesar las barreras biológicas con mayor facilidad y en mayor cantidad aumentando así su biodisponibilidad, logrando aprovechar de una manera eficaz su actividad antioxidante. Se podrá también conseguir que las microcápsulas puedan liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas logrando que éstas no sólo protejan al compuesto encapsulado, sino que también cumpla con su función de conservar sus propiedades biológicas y fisicoquímicas. (Parzanese, n.d., pp.1-12).

OBJETIVOS

Objetivo General

“Microencapsular quercetina utilizando la técnica de gelificación iónica”

Objetivos Específicos

- Evaluar la solubilidad de quercetina en etanol al cien por ciento y en mezclas etanol – agua a diferentes proporciones.

- Elaborar microcápsulas de quercetina utilizando quitosan y TPP como agentes gelificantes.
- Cuantificar la eficiencia de encapsulación de quercetina mediante espectrofotometría UV.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que no están involucrados directamente en el crecimiento y desarrollo normal de un organismo. Mientras que los metabolitos primarios juegan una función activa en la fotosíntesis y la respiración; la ausencia de metabolitos secundarios no da lugar a la muerte inmediata, a largo plazo existe un deterioro de la capacidad de supervivencia del organismo. Estos compuestos son un grupo muy diverso de productos naturales sintetizado por plantas, hongos, bacterias, algas, y los animales. La mayoría de metabolitos secundarios, tales como terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides se clasifican en función de su biosíntesis. (Agostini-Costa, 2012, p.131)

Los metabolitos secundarios se producen en niveles más altos durante la transición desde crecimiento activo hasta la fase estacionaria. Estas moléculas juegan un papel importante en la adaptación de las plantas en su entorno. El organismo productor puede crecer en ausencia de su síntesis, lo que sugiere que el metabolismo secundario no es esencial, por lo menos a corto plazo para la supervivencia. Los genes implicados en el metabolismo secundario proporcionan una ventaja genética que permite la mutación y la selección natural. El metabolismo secundario se basa en el metabolismo primario, el cual suministra las enzimas, energía, sustratos y maquinaria celular necesaria. (Agostini-Costa, 2012, p.131)

Una clasificación simple de los metabolitos secundarios incluye los siguientes principales grupos: terpenos (glucósidos cardiacos, carotenoides y esteroides), compuestos fenólicos (tales como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, estilbenos, taninos y lignina) y compuestos nitrogenados (tales como alcaloides y glucosinolatos). (Agostini-Costa, 2012, p.131)

1.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático (C_6) que lleva uno o más grupos hidroxilo. Ellos se sintetizan principalmente a partir ácido cinámico, que se forma

a partir de fenilalanina por la acción fenilalanina amonio liasa. Los compuestos fenólicos son divididos en varios grupos, que se distinguen por el número de átomos de carbono constitutivos en conjunto con la estructura del esqueleto básico fenólico (fenoles simples, ácidos benzoicos y flavonoides). (Michalak, 2006, pp.523-30)

Estas moléculas presentan actividad antioxidante, antimutagénica, antiviral, antibacterial (bactericida, bacteriostática), antifúngica, insecticida, estrogénica y queratolítica; actividades que sirven para proteger al organismo de factores ambientales. (Castellano et al., 2012, pp.231-350)

En condiciones de estrés se observa un incremento en el metabolismo fenilpropanoide y por tanto un incremento de la cantidad de compuestos fenólicos sintetizados. La síntesis de las isoflavonas y algunos otros flavonoides se induce cuando las plantas se infectan o lesionan, o en bajas temperaturas y condiciones de baja de nutrientes. La mayoría de ellos tienen actividad antimicrobiana.

1.2.1. Flavonoides

Se identifican como flavonoides a un grupo extenso de compuestos polifenólicos los cuales se caracterizan por poseer una estructura benzo- γ -pirano (Figura 1-1) y por estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose generalmente en plantas vasculares en forma de glicósidos (Cartaya & Reynaldo, 2001, pp.5-14).

Constituyen el grupo más abundante dentro de los compuestos fenólicos, con más de 6500 compuestos identificados (Hendrich, 2006, pp.27-40). Son sintetizados por vía fenilpropanoide. Algunos estudios muestran que metabolitos secundarios de naturaleza fenólica incluyendo flavonoides son responsables de la variedad de actividades farmacológicas. (Kumar & Pandey, 2013, pp.1-11)

Los flavonoides son un grupo de compuestos naturales con diversas estructuras fenólicas. En 1930 una nueva sustancia fue aislada de naranjas. En ese momento se creía que se trataba de una vitamina y se designó como vitamina P. Más tarde se hizo evidente que esta sustancia era un flavonoide (rutina) y hasta ahora más de 4.000 variedades de flavonoides se han identificado. (Kumar & Pandey, 2013, pp.1-11)

La estructura química de los flavonoides se basa en un esqueleto de quince carbonos que consta de dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico de pirano (C) (Figura 1-1). Se pueden dividir en una variedad de clases, tales como flavonas (por ejemplo, apigenina y luteolina), flavonoles (por ejemplo, quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina), flavanonas (por ejemplo, flavanona, hesperetina, y naringenina), y otros. (Kumar & Pandey, 2013, pp.1-11)

Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B. (Kumar & Pandey, 2013, pp.1-11)

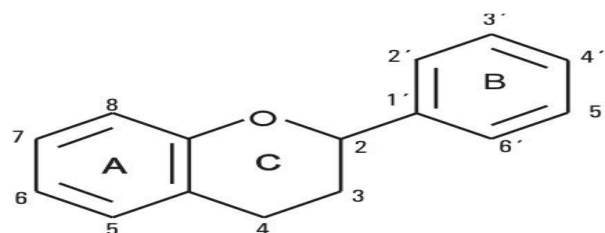


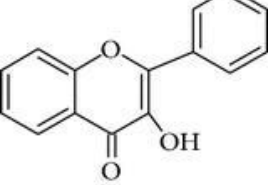
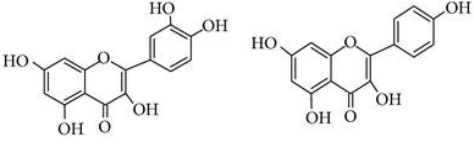
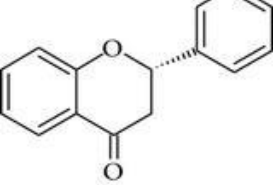
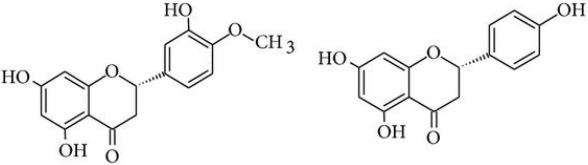
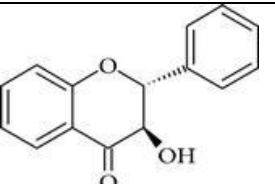
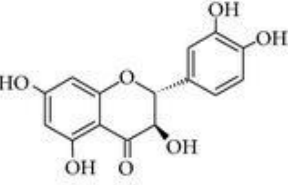
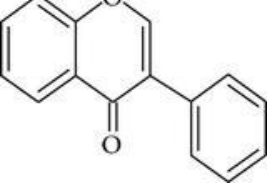
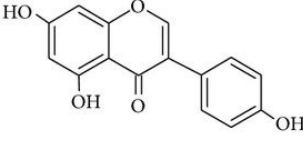
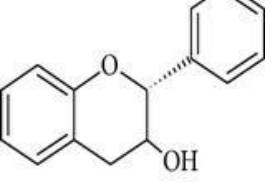
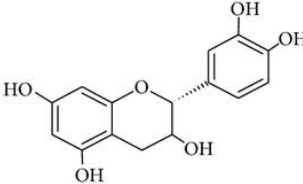
Figura 1-1. Estructura básica de un flavonoide

Fuente:(Biesaga, 2011)

Los flavonoides se presentan como agliconas, glucósidos, y derivados metilados. La estructura básica de un flavonoide es la aglicona. Cuando se forman los glucósidos, el enlace glicosídico normalmente se encuentra en las posiciones 3 o 7 y el hidrato de carbono puede ser L-ramnosa, D-glucosa, glucorhamnose, galactosa, o arabinosa. (Kumar & Pandey, 2013, pp.1-11)

Tabla 1-1: Grupos de flavonoides

GRUPO	ESTRUCTURA BÁSICA	EJEMPLOS
Flavonas		
		Luteolina Apigenina Crisina

Flavonol		 <p style="text-align: center;">Quercetina Kaempferol</p>
Flavanonas		 <p style="text-align: center;">Hesperidina Naringenina</p>
Flavanonol		 <p style="text-align: center;">Taxifolin</p>
Isoflavonas		 <p style="text-align: center;">Genisteína</p>
Flavan-3-ol		 <p style="text-align: center;">Catequina</p>

Fuente: (Kumar & Shashank, 2013)

Realizado por: (Velasco, 2016)

1.2.1.1. Actividad Farmacológica

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general, actividad sobre el sistema vascular con efecto protector de la pared vascular, (debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares). Asimismo, tienen efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. También actúan inhibiendo sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad vascular como: la catecol O-metil transferasa (COMT), con lo que aumentan la duración de la acción de las catecolaminas, incidiendo por tanto en la resistencia vascular; la histidina decarboxilasa, afectando por tanto a la acción de la histamina; las fosfodiesterasas, por lo que inhiben la agregación y adhesividad plaquetaria, etc. Por otro lado, los flavonoides ejercen otras acciones: diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria. En fitoterapia los flavonoides se emplean principalmente en casos de fragilidad capilar como venotónicos. (López, 2002, pp.108-14)

Además, se ha demostrado la actividad de ciertos flavonoides sobre el sistema nervioso central. Tanto las agliconas y sus conjugados pueden pasar la barrera hematoencefálica. En el SNC varias flavonas, entre ellas la apigenina, se unen al sitio de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A lo que resulta en la sedación, efectos ansiolíticos o anticonvulsivos. (Jäger & Saaby, 2011, pp.1471-85)

1.2.1.2. Fuente de flavonoides

Al ser ampliamente distribuidos los podemos encontrar en frutas, verduras y flores, siendo también una fuente de este tipo de compuestos algunas bebidas como: la cerveza, vino, té negro y té verde. Su papel dentro de la biología vegetal es de alta relevancia puesto que responden a la luz y normalizan los niveles de auxinas reguladoras del crecimiento y de diferenciación de las plantas. Por lo general se localizan en las hojas y en el exterior de la planta, siendo el tubérculo de cebolla la excepción al presentar un alto contenido de quercetina 4'-D-glucósidos (Martínez et al., 2002, pp.271-78).

Los flavonoides que se consumen en la dieta se encuentran por lo general y de una manera abundante en forma glicosidada (3-O-glicosidada) y polimerizada. Aunque al estar glicosidados

aumentan su hidrosolubilidad, esta característica hace que sean menos reactivos frente a los radicales libres (Heim et al., 2002, pp.572-84)

1.2.1.3. Aplicaciones clínicas

Las aplicaciones de los flavonoides son variadas, encontrándose que poseen actividad diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica, antiviral, antialérgica, antitrombótica y antiinflamatoria, sin embargo su aplicación más importante se debe a su actividad antioxidante. Los flavonoides poseen una elevada actividad antioxidante debido a su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, actuar sobre el cáncer gracias a sus efectos antimutagénicos y ser inhibidores enzimáticos (López, 2002, pp.108-14)

Su actividad antioxidante depende de las propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, inhibiendo también las oxidasas (lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, xantina oxidasa) impidiendo así la formación de radicales libres (Escamilla et al., 2009, pp.73-75).

Por todo lo nombrado anteriormente se han descrito una serie de efectos protectores sobre patologías como:

- Diabetes mellitus
- Cardiopatías
- Infecciones víricas
- Úlceras estomacales
- Inflamaciones
- Cáncer.

1.2.1.4. Criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante que presente un flavonoide dependerá de las modificaciones que su estructura base presente (Figura 1-1) para lo cual se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

Tabla 2-1. Criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de un flavonoide.

Criterio	Resultado
Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B.	Le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.	Necesarios para ejercer el máximo potencial oxidante
Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C.	

Fuente: (Martinez et al, 2002)

Elboarado por: (Velasco, 2016)

En base a los criterios antes señalados el flavonoide quercetina (Figura 2-1) es el compuesto que ejerce una mayor actividad antioxidante, en comparación con la vitamina C y E, presentando una solubilidad parecida a la de esta última.

1.2.3. *Quercetina*

Se conoce que a lo largo del tiempo se han descubierto más de 5000 variedades de flavonoides distribuidos en 6 familias diferentes: Flavonas, flavonoles, antocianinas, flavanoles, flavononas e isoflavonas. La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) cuya estructura se muestra en la Figura 2-1, es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad, aproximadamente entre un 60 y 75 por ciento del total de los flavonoles consumidos (Hertog & Hollman, 1996, pp.63-71).

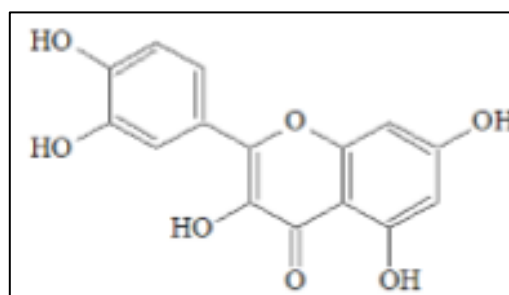


Figura 2-1. Estructura química de la quercetina

Fuente: (Hertog & Hollman, 1996)

La quercetina es un bioflavonoide, altamente consumido en la dieta diaria, que puede ejercer una serie de efectos positivos sobre la salud humana puesto que previene la peroxidación lipídica, el daño oxidativo en el DNA y la presión baja. Al igual que el resto de flavonoides existe suficiente evidencia para decir que la quercetina puede ser considerada como un agente farmacológico por su capacidad para prevenir enfermedades degenerativas y crónicas, debido a su potente actividad antioxidante, incluyendo las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo los flavonoides muestran una especie de dicotomía, a concentraciones bajas ejercen actividad antiinflamatoria mejorando la supervivencia de la célula mientras que a dosis altas pueden incrementar la muerte celular, inducir citotoxicidad, causar roturas en la cadena de DNA e inducir apoptosis. (Moretti et al., 2016, pp.140-47)

1.2.3.1. Fuentes de quercetina

Al igual que el resto de los flavonoides la quercetina se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal encontrándola principalmente en frutas y vegetales. Las principales fuentes de quercetina son: las manzanas, las cebollas, el té verde, té negro, pimienta negra y el vino tinto, (Esmailzadeh et al., 2013, pp.1963-66).

1.2.3.2. Beneficios de la quercetina y aplicaciones clínicas.

Las propiedades beneficiosas de la quercetina se relacionan estrechamente con su estructura química, que le confiere propiedades antioxidantes. Actúa como protector frente a las especies reactivas de oxígeno, mediante la neutralización de radicales libres como aniones superóxido, óxido nítrico y peroxinitritos entre otros. El efecto antioxidante también podría deberse a su capacidad para inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la muerte celular (Vicente-Vicente et al., 2013, pp.171-81). Además puede incrementar la producción de antioxidantes endógenos. Entre otras aplicaciones podemos encontrar:

- Alergias
- Diabetes
- Procesos Inflamatorios
- Gastroprotección
- Prevención de la enfermedad cardiovascular

1.2.3.3. Características farmacocinéticas

La quercetina no presenta una buena biodisponibilidad, generalmente a la quercetina se la encuentra como glucósido, de esta forma presenta una absorción del 52 por ciento del total de quercetina ingerido, al estar la quercetina unida a una azúcar hace que la molécula sea más hidrofílica y que tenga un mayor peso molecular por lo cual presenta una menor absorción por difusión pasiva requiriendo de transporte activo. - Ciertos autores citan que estos glicósidos se transportan directamente hacia el interior de los enterocitos por el transportador I de glucosa dependiente de Na (Hollman et al., 1995, pp.1276-82) que se encuentra localizado en la pared del intestino delgado -. Por otro lado la absorción de quercetina en forma de aglicona representa el 20 por ciento y puede transportarse a través de las membranas por difusión pasiva en el intestino grueso (Vicente-Vicente et al., 2013, pp.171-81).

Una vez que los metabolitos se encuentran a nivel de torrente sanguíneo estos se unen a la albumina para ser transportados hacia diferentes órganos principalmente intestino delgado, colon, hígado y riñón donde sufrirán metabolismo en fase II (Day et al., 2000, pp.166-70), y estos podrán permanecer hasta 10 horas debido al reciclaje enterohepático que sufren. Se ha encontrado que después de una ingesta de alimentos ricos en quercetina, en el plasma, la concentración de este flavonol fluctúa entre 0.7 y 7.6 μM (Van der Woude et al., 2006, pp.193-203)

Con respecto a su vida media se ha estimado que en humanos es de 31-50 horas mostrando un pico de concentración en plasma a los 30 minutos y otro a las 8 horas después de haber ingerido 100 mg.

1.2.3.4 La quercetina en el tratamiento del cáncer

Los compuestos polifenólicos y en general los flavonoides poseen características que han llamado la atención para incentivar la investigación anticancerígena. Interfieren *in vitro* y por distintos mecanismos en el proceso oncogénico, lo que los hace posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión.

Las proteínas p21-ras se encuentran localizadas en la superficie interna de la membrana celular, donde actúan como interruptores moleculares binarios en vías de señalización que influyen el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. La activación oncogénica ras es una de las más

frecuentemente implicadas en el desarrollo de tumores humanos y experimentales (Sarasin, 2003, pp.99-106).

Una de las características principales de las proteínas p21-ras es su capacidad de añadir nucleótidos de guanina (GDP Y GTP) y además poseer actividad GTPasa intrínseca muy baja con relación al resto de proteínas G (Walker & Lockyer, 2004, pp.2879-86). Su actividad biológica es controlada por un ciclo regulado de intercambio GDP/DTP, en el cual intervienen varios tipos de proteínas reguladoras:

- Factores que intercambian nucleótidos de guanina (GEFs) los cuales activan las proteínas ras.
- Proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa (GAPs) que dan lugar a la desactivación de las proteínas ras.

El sustituir tan solo un simple aminoácido en la posición 12, 13 o 61 da lugar a la aparición de proteínas ras mutadas insensibles a la regulación negativa de las proteínas GAPs por lo que permanecen en un estado activo unido a GTP y conllevan a una activación constitutiva de Ras (Guirado, 2007).

En el caso específico de la quercetina estudios han revelado que este compuesto reduce los niveles de estado estacionario de la proteína p21-ras tanto en líneas celulares de cáncer de colon como en tumores colorectales primarios. (Ranelletti et al., 2000, pp.438-45).

1.3. Formas farmacéuticas de liberación modificada de administración oral

1.3.1. Definición

Las formas farmacéuticas de liberación modificada se refieren a la aplicación de un proceso tecnológico sobre una determinada sustancia química con el fin de modificar su interacción con el medio en el cuál será utilizada. Este proceso se lleva a cabo con el objetivo de controlar cuatro aspectos básicos los cuales son: controlar el lugar, el momento, la duración o la magnitud de su acción (Suñe, 2003, pp.31-35).

1.3.2. Mecanismo de acción

La liberación de estos fármacos en el tracto digestivo implica, integrar el activo determinado a una forma farmacéutica específica, que actúe como un dispositivo de control y brindar así un perfil de cesión óptima. Se los clasifica de dos formas.

- Fármacos que liberan el principio activo durante un periodo de tiempo prolongado, tienen una cinética predecible, con el objetivo de alargar el lapso de tiempo para obtener un nivel plasmático dentro de la zona terapéutica.
- Sistemas diseñados para modificar la velocidad de tránsito del fármaco durante su transcurso por el tracto (Aulton, 2004, pp.222-32).

1.3.3. Clasificación

Debido a la amplia, diversa y confusa forma de definir a las formas farmacéuticas orales de liberación modificada, Ballard y Nelson en 1970 proponen una clasificación dividiéndolas de la siguiente manera:

- Formas farmacéuticas de liberación sostenida

Son aquellas en donde inicialmente se libera tan solo la cantidad necesaria de principio activo pretendiéndose obtener una respuesta farmacológica deseada de forma rápida, para posteriormente presentar una liberación continua de tal forma que las velocidades tanto de absorción del principio activo como de eliminación sean iguales durante un tiempo prolongado. Normalmente se habla de tiempos comprendidos entre 10 y 24 horas observándose que estas formas farmacéuticas presentan una cinética de liberación de orden cero, logrando así mantenerse un nivel constante de principio activo a nivel plasmático (Suñe, 2003, pp.31-35).

- Formas farmacéuticas de liberación prolongada

A diferencia de la forma farmacéutica descrita anteriormente se puede decir que las formas de liberación prolongada, al inicio, liberan una cantidad suficiente del fármaco e incluso un ligero exceso para conseguir la acción terapéutica sin causar repercusiones tóxicas para el organismo. Posteriormente la liberación del principio activo se da de manera lenta y a una velocidad que no es

igual a la velocidad de eliminación obteniéndose así una liberación lenta pero no constante, observándose niveles plasmáticos que varían dentro de la zona terapéutica (Suñe, 2003, pp.31-35).

- Formas farmacéuticas de liberación repetida

Se refieren a las formas farmacéuticas que en un inicio liberan una cantidad simple de principio activo para en un tiempo posterior liberar otra dosis igual. Durante el intervalo de tiempo entre la liberación de las dosis no se da liberación del fármaco.

- Formas farmacéuticas de liberación retardada o diferida

Se emplean para conseguir la liberación del principio activo a nivel de tracto digestivo en dependencia del pH de la zona en donde se quiere que dicho principio activo cumpla su acción terapéutica. Su utilización se centra principalmente en la elaboración de comprimidos gastrorresistentes y para cuando se quiere que la liberación del principio activo se de en el colon (en la primera porción) (Suñe, 2003, pp.31-35).

A manera de resumen en la figura 3-1 se muestran los diferentes perfiles de concentración plasmática obtenidos de los diferentes tipos de formas farmacéuticas orales de liberación modificada.

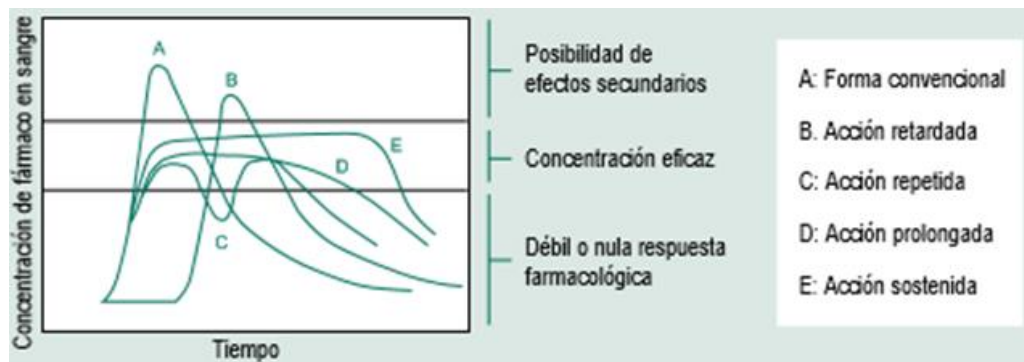


Figura 3-1. Perfiles de concentración plasmática

Fuente: (Suñe, 2003)

1.4. Microencapsulación

1.4.1. Definición

Se entiende por microencapsulación al proceso por el que varias sustancias pueden ser encapsuladas dentro de una capa de tamaño microscópico con el fin de protegerla y de liberarla posteriormente. Más específicamente la microencapsulación es el proceso en donde se encierran o se contienen pequeñas partículas, un líquido o un gas dentro de una capa de recubrimiento o de una matriz (Gaonkar et al., 2014, pp.557-69).

El proceso de microencapsulación tradicional no utiliza aquellas cápsulas de más de 3 mm de longitud, encapsulaciones que se encuentran dentro del rango comprendido entre 100 nm y 1000 nm son clasificadas como microcápsulas mientras que los componentes que se encuentran entre 1 nm y 100 nm son clasificados como nanocápsulas (Gaonkar et al., 2014, pp.557-69).

Este método nos permite proteger muchos compuestos funcionales como son antioxidantes, enzimas, polifenoles y micronutrientes para distribuirlos en un blanco específico de una manera controlada, protegiéndolos de las características hostiles del medio en donde van a ser liberados (Kwak, 2014, pp.57-63)

1.4.2. Tipos de microcápsulas

La forma y la estructura es decir la morfología de la microencapsulación se encuentra dentro de tres categorías (Figura 4-1):

- Microcápsulas

Son llamadas así ya que tienen una morfología núcleo–cubierta muy bien definida, pudiendo llevar en su interior una sustancia activa ya sea esta sólida o líquida obteniéndose así un sistema heterogéneo (Gaonkar et al., 2014, pp.557-69).

- Microesferas

Este tipo de macropartículas están constituidas por una red continua de material soporte o polimérico en donde la sustancia o componente a ser encapsulado esta dispersado en forma molecular constituyendo un sistema homogéneo (Murillo et al., 2001, pp.19-34)

- Microcápsulas homogéneas o microesferas heterogéneas

Sistemas intermedios entre los dos estados, homogéneos en formas multinucleares y heterogéneas de dispersiones particulares. Se caracterizan porque presentan en algunas zonas mayor cantidad de principio activo (zonas ricas) con respecto a otras (zonas pobres) (Murillo et al., 2001, pp.19-34)

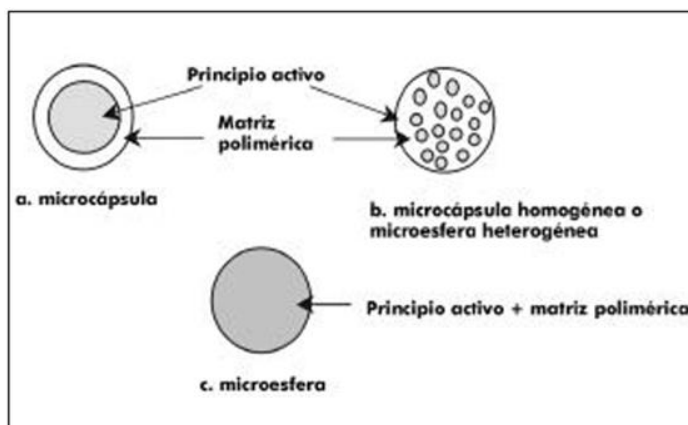


Figura 4-1. Tipos de microcápsulas

Fuente: (Murillo et al., 2001, p. 22)

1.4.3. Beneficios de la microencapsulación en el campo farmacéutico.

El uso de la microencapsulación ha dado lugar a una serie de beneficios ya sea a nivel tecnológico como a nivel de paciente (cumplimiento de los tratamientos). José Luis Vila Jato en su libro Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas, volumen I (Vila Jato, 2008, pp.571-82), señala que en el campo farmacéutico desde el punto de vista tecnológico la microencapsulación reporta los beneficios siguientes:

- Estabilización de moléculas activas inestables: brinda protección a las sustancias o principios activos encapsulados de factores tanto físicos como químicos dentro y fuera del organismo.
- Modifica las características del principio activo principalmente la solubilidad, permeabilidad.

- Permite la conversión de principios activos líquidos en formas sólidas más manejable y de fácil almacenamiento.
- Inclusión de principios activos incompatibles en la misma forma farmacéutica.

Por otro lado desde el punto de vista biofarmacéutico y terapéutico los beneficios que presenta la microencapsulación se podrían resumir en:

- Reducción del efecto irritante causado por algunos medicamentos en la mucosa gástrica e intestinal.
- Permite enmascarar olor y sabor mejorando indudablemente la aceptación por parte del paciente.
- Permite controlar la liberación del fármaco de manera localizada en dependencia del pH del medio.
- Permite una distribución más homogénea del principio activo en el tracto gastrointestinal, siendo, además, su tiempo de transición intestinal mucho menos influenciado por la alimentación.
- Aumenta la biodisponibilidad del principio activo ya que impide que pueda sufrir degradación o pérdida a lo largo del trayecto hasta llegar al lugar de la liberación.

1.4.4. Métodos de microencapsulación

En la actualidad la utilización de la técnica de microencapsulación se ha convertido en un proceso muy atractivo principalmente en el área farmacéutica por las ventajas que la microencapsulación presenta. Existen una serie de métodos y técnicas para elaborarlas pero se las puede clasificar en tres como se describe a continuación en la tabla 3-1.

Tabla 3-1. Métodos para la obtención de microcápsulas

MÉTODOS		
Físicos	Fisicoquímicos	Químicos
Secado por atomización.	Coacervación simple o compleja.	Inclusión molecular.
Extrusión.	Liposomas.	Polimerización interfacial.
Recubrimiento por lecho fluidizado.	Gelación Iónica.	
Separación por suspensión rotacional.		

Fuente: (Gharsallaoui et al., 2007, p. 1118)

Elaborado por: (Velasco, 2016)

La utilización de un método específico para la obtención de las microcápsulas dependerá del tamaño de partícula requerido, de las propiedades físicas y químicas del agente encapsulante así como del activo, de los costos y de la aplicación de las macropartículas, entre otros (Gharsallaoui et al., 2007, pp.1107-21).

Con respecto al tamaño de la partícula este estará en función del método utilizado, como se observa en el cuadro 2, en dependencia del método se obtendrán los siguientes tamaños de partículas:

Tabla 4-1. Tamaño de partícula en función del método.

MÉTODO	TAMAÑO DE LA PARTÍCULA
Coacervación	1-1000 μm
Polimerización interfacial	1-1000 μm
Extracción / evaporación del solvente	0,1-1000 μm
Atomización y atomización - congelación	1-1000 μm
Suspensión en aire	50-5000 μm
Gelación iónica	>1000 μm

Fuente: (Gharsallaoui et al., 2007)

Elaborado por: (Velasco, 2016)

1.4.4.1. Gelificación Iónica

Técnica utilizada para formar la cubierta de las microcápsulas la cual se lleva a cabo mediante una reacción de gelificación iónica entre dos sustancias con carga opuesta, por lo general un polisacárido (polianión) y un ión (catión). Las cubiertas formadas entre si tienen la característica de ser insolubles, pero lo suficientemente permeables como para liberar el fármaco (Helgerud et al., 2010, pp.48-67)

1.4.5. Materiales usados en microencapsulación

La variedad de materiales que pueden emplearse en microencapsulación se va ampliando gradualmente en función, tanto, de nuevos biomateriales investigados como de nuevas aplicaciones de la microencapsulación. En el pasado las microcápsulas estaban destinadas a ser administradas únicamente por vía oral, sin embargo, actualmente existen en el mercado una amplia variedad de formulaciones destinadas a su administración por vía parenteral, razón por la cual se ha clasificado en tres categorías a los materiales capaces de construir microcápsulas: grasas, proteínas y polímeros (Vila Jato, 2008, pp.577-82)

1.4.5.1. Polímeros

Debido a su gran versatilidad, ésta es la familia de materiales más utilizada en microencapsulación, encontrándose dentro de este grupo a los polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos. Los polímeros naturales son básicamente de naturales polisacárida pudiendo ser de origen vegetal o animal, dentro de esta clasificación encontramos el alginato, el dextrano, la goma arábiga y el quitosano.

Con respecto a los polímeros semisintéticos, éstos se refieren a los derivados celulósicos los cuales poseen diferentes características de solubilidad, es así que dentro de los polímeros semisintéticos insolubles tenemos al acetobutarato de celulosa y etilcelulosa, mientras que el acetoftalato de celulosa presenta una solubilidad que es dependiente del pH.

Finalmente al hablar de polímeros sintéticos los más destacables son los derivados acrílicos y los poliésteres. Los derivados acrílicos abarcan polímeros insolubles con diferente grado de permeabilidad así como diferente grado de solubilidad que es dependiente del pH ofreciendo así

en la formulación de este tipo de sistemas de distribución de medicamentos debido a las características que presenta.

En pH ácido los grupos aminos pueden someterse a protonación haciéndolo soluble en agua. La solubilidad del quitosán depende de la distribución de los grupos aminos libres y de los grupos N-acetil. Posee una buena adhesión, capacidad de coagulación y actividad inmunoestimulante. El quitosán presenta muchas ventajas, particularmente para el desarrollo de micro y nanopartículas; entre ellas encontramos la capacidad de controlar la liberación de agentes activos, evita el uso de disolventes orgánicos peligrosos durante la fabricación de la partícula, es una poliamina lineal que posee varios grupos aminos libres fácilmente disponibles para el entrecruzamiento con aniones multivalentes, su carácter mucoadhesivo el cual incrementa el tiempo residual en el sitio de absorción. (Mohammadpourdounighi et al., 2010, pp.137-43)

Además de las características antes mencionadas el quitosán puede ser utilizado para la obtención de microcápsulas, mediante la técnica de gelación iónica, ya que le otorga a las micropartículas mayor estabilidad, forma más definida y un tamaño homogéneo. (Flores - Belmont & Jiménez - Munguia, 2013, pp.48-56)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2. Equipos y Reactivos

2.2.1. *Equipos*

- Estufa Memmert SNB400
- Vortex
- Centrífuga
- Balanza analítica Radwag
- Espectrofotómetro Cole Parmer S-2150
- Agitador magnético DragonLab MS-S
- Microscopio óptico.
- Sonicador bransonico modelo B220

2.2.2. *Materiales*

- Vasos de precipitación de 25 mL
- Vasos de precipitación de 150 mL
- Espátula
- Balones aforados de 100 mL
- Balnes aforados de 10 mL
- Probeta de 100 mL

- Probeta de 1000 mL
- Tubos para centrifuga
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Varilla de agitación
- Micropipeta 10-100 μ L
- Micropipeta 100 – 1000 μ L
- Pipeta volumétrica de 5 mL y 10 mL
- Guantes de manejo
- Mascarilla
- Discos de filtrado Whatman Uniflo 0,45 μ m PVDF

2.2.3. Reactivos

- Ácido acético
- Ácido clorhídrico 1%
- Etanol anhídrido
- Etanol 10, 20, 30, 40, 50 porciento
- Agua destilada
- Quercetina
- Quitosano
- Tripolifosfato (TPP)

2.3. Técnicas y métodos

La metodología usada en la investigación se describe en la Figura 1-2, en donde se resumen los procedimientos llevados a cabo para la obtención de las microcápsulas, dentro de los cuales se encuentran los ensayos previos de solubilidad de quercetina y la determinación de las concentraciones óptimas de quitosano y tripolifosfato para la formación de microcápsulas. También se presenta en la figura 2-2 el procedimiento para la obtención de microcápsulas a partir de CS y TPP y en la figura 3-2 se resume la metodología para determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación.

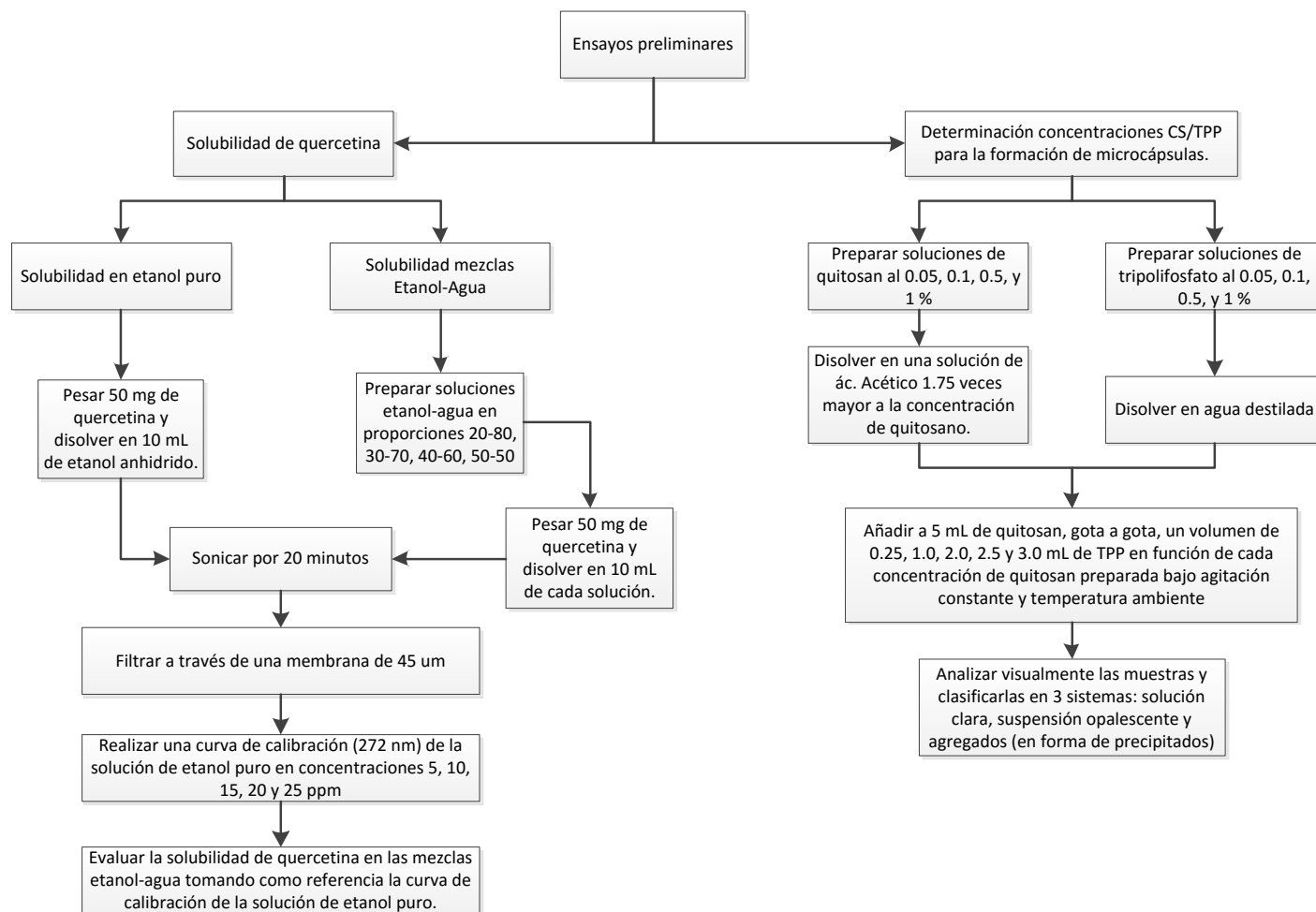


Figura 1-2. Ensayos previos para la obtención de microcápsulas

Elaborado por: (Velasco, 2016)

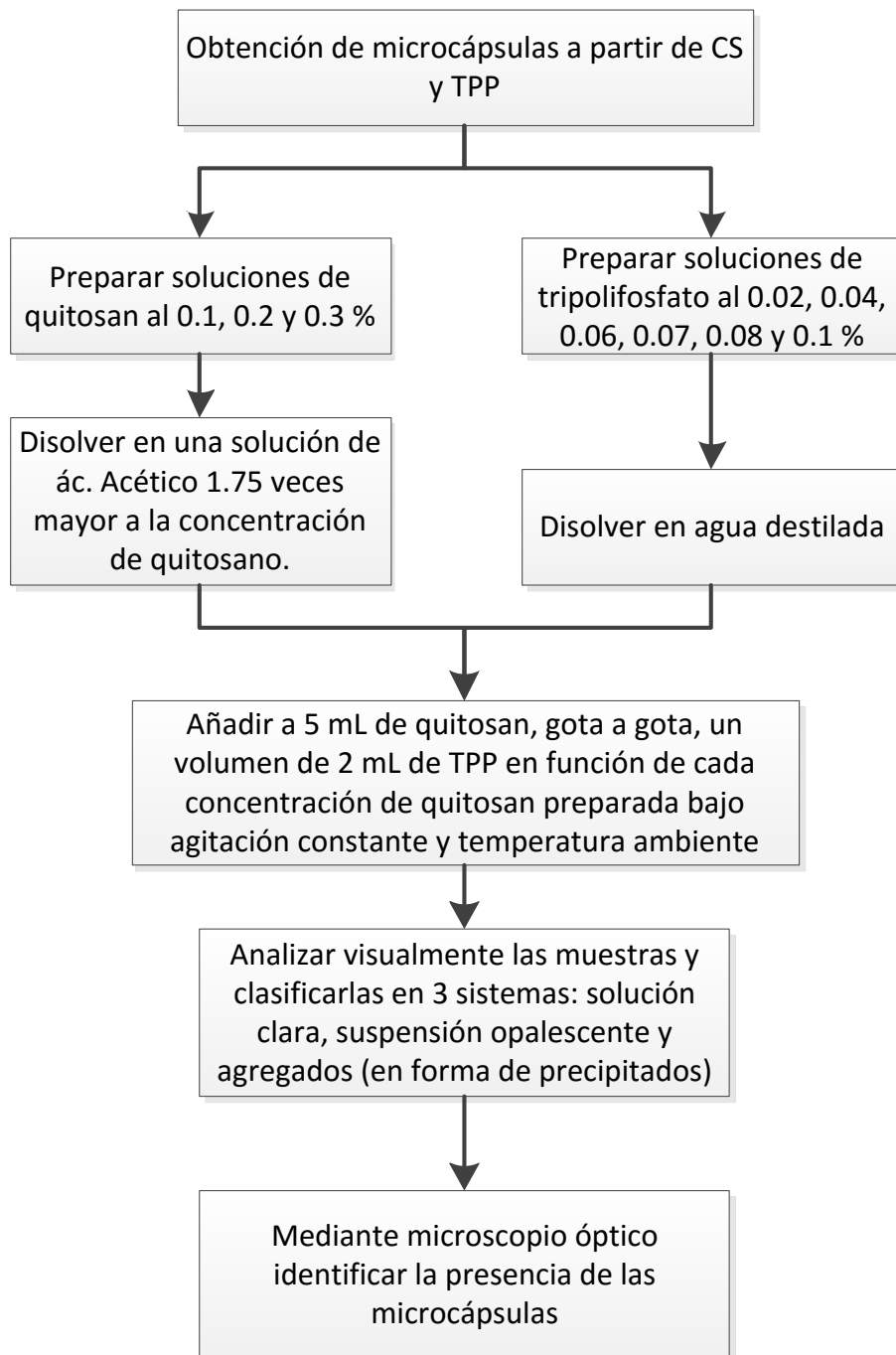


Figura 2-2. Obtención de microcápsulas a partir de CS y TPP

Elaborado por: (Velasco, 2016)

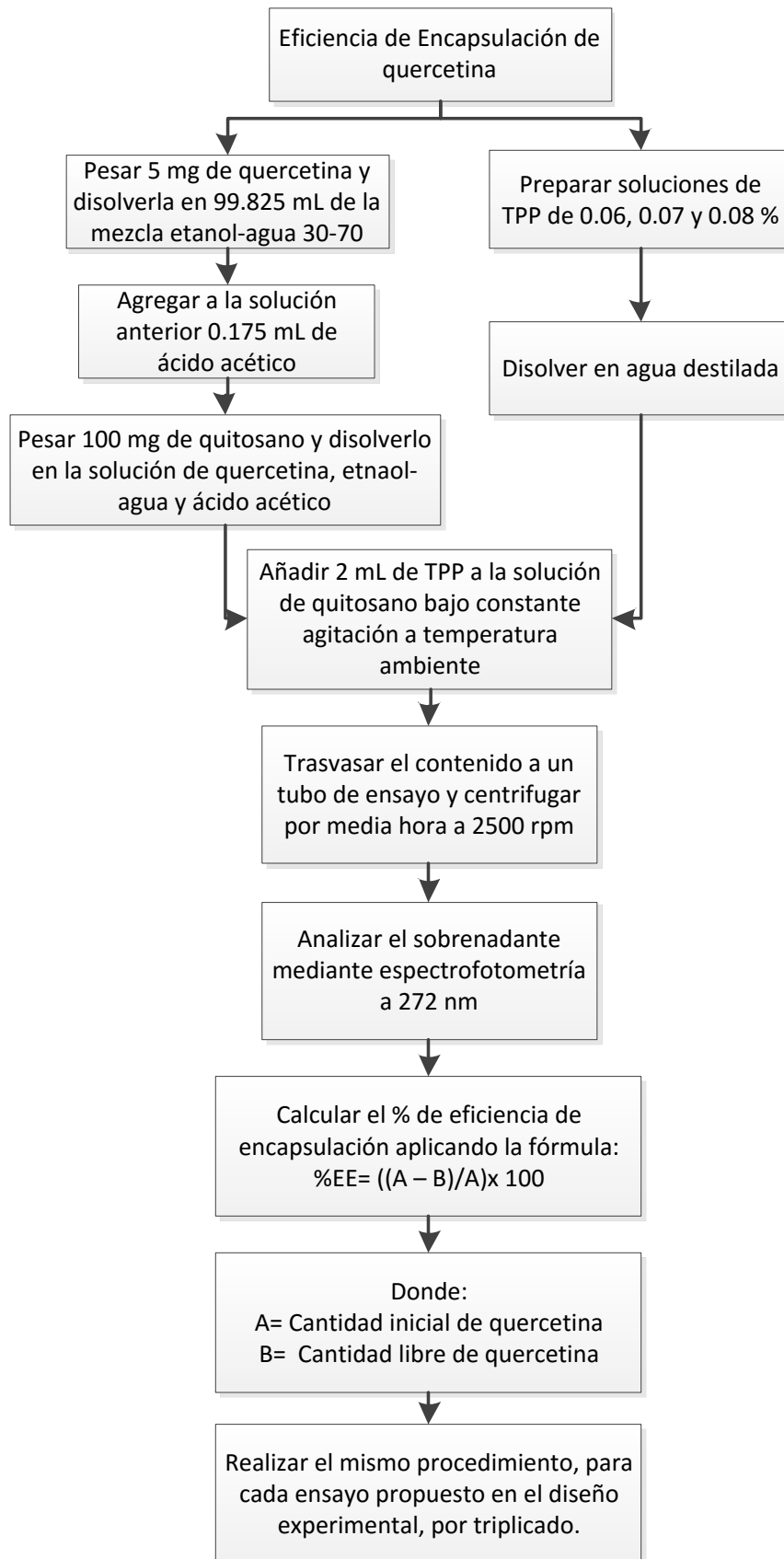


Figura 3-2. Eficiencia de encapsulación

Elaborado por: (Velasco, 2016)

2.3.1. Solubilidad de la quercetina

El ensayo de solubilidad de quercetina se llevó a cabo mediante la preparación de dos soluciones, una en etanol puro y otra en una mezcla de etanol-agua en diferentes proporciones. Para la solución de etanol puro se pesó 50 mg de quercetina, se aforó con etanol a un volumen final de 10 ml, se sonicó por 20 minutos utilizando un sonicador marca bransonic modelo B220, posteriormente se procedió a filtrar utilizando un disco de filtrado Whatman Uniflo 0,45 μm PVDF, y se realizaron diluciones con concentraciones finales de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm.

Utilizando las concentraciones anteriormente preparadas se procedió a elaborar una curva de calibración de quercetina para lo cual se utilizó un espectrofotómetro de marca Cole Parmer S-2150 como instrumento de medición. Las lecturas de las absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 272 nm como describe la metodología propuesta por (Sohrabi & Darabi, 2016)

Para evaluar la solubilidad de quercetina en las mezclas etanol-agua se prepararon cuatro soluciones con proporciones 20/80, 30/70, 40/60 y 50/50. Al igual que con la solución de etanol, se pesó 50 mg de quercetina y se aforó a un volumen final de 10 mL con cada mezcla, se sonicó por 20 minutos utilizando un sonicador marca bransonic modelo B220, posteriormente se filtró la solución utilizando un disco de filtrado Whatman Uniflo 0,45 μm PVDF

Para determinar la cantidad de quercetina disuelta en cada mezcla (solubilidad máxima) se tomaron diferentes volúmenes de las soluciones antes mencionadas (etanol-agua 20/80, 30/70, 40/60 y 50/50), como se muestra en la tabla 1-2. Todas las alícuotas fueron llevadas a un volumen final de 10 mL utilizando balones aforados, y se procedió a leer las absorbancias en un espectrofotómetro Cole Parmer S-2150 a una longitud de onda de 272 nm como se describió anteriormente.

Tabla1-2. Alícuotas de las mezclas etanol-agua.

Mezcla etanol - agua	Alícuotas, μL				
20/80	3000	3500	4000	4500	5000
30/70	1000	1500	2000	2500	3000
40/60	500	600	700	800	900
50/50	400	500	600	700	800

Elaborador por: (Velasco, 2016)

2.3.2. Determinación de las concentraciones de CS y TPP para la formación de microcápsulas.

Para determinar la concentración a las que el CS y el TPP formaron microcápsulas se utilizó la metodología descrita por (Calvo et al., 1996, pp.1-8) . Para la obtención de microcápsulas se prepararon soluciones de quitosán y TPP a las mismas concentraciones 0.05, 0.1, 0.5 y 1%, para lo cual se pesaron 50, 100, 500 y 1000 mg respectivamente de cada sustancia.

Para disolver el CS se prepararon soluciones de ácido acético* 1.75 veces mayor a la concentración de quitosán es decir soluciones de 0.0875, 0.175, 0.875 y 1.75%. Para disolver el TPP se utilizó agua destilada, un volumen de 100 mL, y se ajustó la solución a un pH final de 5 utilizando ácido clorhídrico al 1%.

Una vez preparadas las soluciones de CS y TPP se procedió a realizar el ensayo:

- En 5 vasos de precipitación de 25 mL se añadieron 5 mL de la solución de quitosán al 0.05%.
- Se identificaron los vasos etiquetándolos con la concentración de CS y un número del 1 al 5.
- Se sometió a agitación magnética cada vaso a una velocidad de 500 rpm.
- Al minuto de agitación a cada vaso se agregó, gota a gota, un volumen diferente de TPP de concentración 0.05%, como se muestra en la figura 4-2.
- Se mantuvo en agitación por un tiempo de 15 minutos.

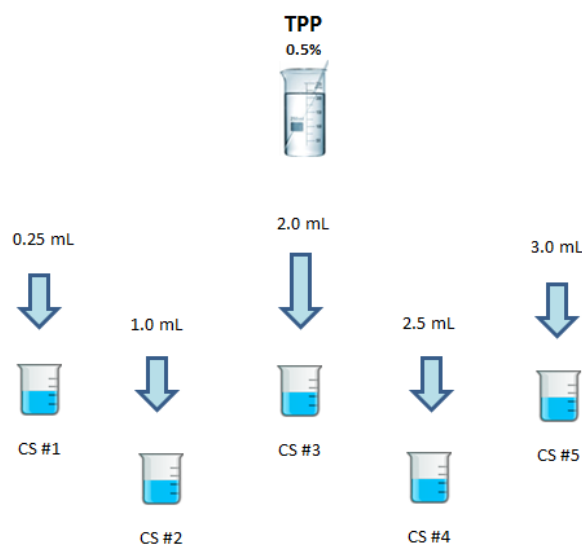


Figura 4-2. Volúmenes de TPP añadidos al CS

Elaborado por: (Velasco, 2016)

Se repitió el ensayo bajo las mismas condiciones detalladas anteriormente, variando únicamente la concentración de quitosán y de TPP las cuales fueron 0.1, 0.5 y 1%. Una vez obtenidos todos los vasos con las soluciones de CS y TPP en diferentes concentraciones se procedió a clasificar visualmente el contenido en tres sistemas claramente identificables:

- Solución clara.
- Suspensión opalescente.
- Agregados (en forma de precipitados).

Una vez realizada la clasificación e identificación de las concentraciones en las que se observó la formación de una suspensión opalescente se procedió a realizar el ensayo bajo nuevas condiciones como se explica a continuación:

- Se prepararon soluciones de CS al 0.1, 0.2 y 0.3% pesándose 100, 200 y 300 mg respectivamente., se disolvieron en una solución de ácido acético* 1.75 veces mayor que la concentración de CS es decir se prepararon soluciones de ácido acético de concentración 0.175, 0.350 y 0.525%.
- Se prepararon soluciones de TPP al 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1% por lo tanto se pesaron 20, 40, 60, 80 y 100 mg respectivamente y fueron disueltos en 100 mL de agua destilada. Se ajustó la solución a un pH final de 5 utilizando ácido clorhídrico al 1%.

Ya preparadas las soluciones de CS y TPP se procedió a realizar el ensayo:

- En 5 vasos de precipitación de 25 mL se añadieron 5 mL de la solución de quitosán al 0.1%.
- Se identificaron los vasos etiquetándolos con la concentración de CS y un número del 1 al 5.
- Se sometió a agitación magnética cada vaso a una velocidad de 500 rpm.
- Al minuto de agitación a cada vaso se agregó, gota a gota, un volumen fijo de 2.0 mL de las soluciones de TPP, como se muestra en la figura 5-2.
- Se mantuvo en agitación por un tiempo de 15 minutos.

Se repitió el ensayo bajo las mismas condiciones detalladas anteriormente, variando únicamente la concentración de quitosán las cuales fueron 0.2 y 0.3%. Una vez obtenidos todos los vasos con las soluciones de CS y TPP en diferentes concentraciones se procedió a determinar visualmente a que concentración se obtuvo una suspensión opalescente. Finalmente con la ayuda de un

microscopio óptico se identificó la presencia de microcápsulas en la concentración seleccionada como la mejor.

* Las soluciones de ácido acético se prepararon utilizando la mezcla etanol-agua 30/70 como solvente.

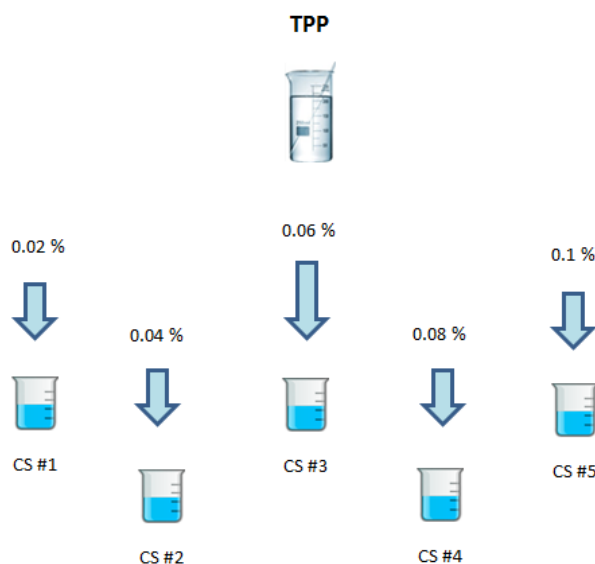


Figura 5-2. Soluciones de TPP añadidas a cada solución de CS

Elaborado por: (Velasco, 2016)

2.3.3. *Determinación de la eficiencia de encapsulación*

Para determinar la eficiencia de encapsulación de las microcápsulas a partir de las concentraciones de CS y TPP se elaboró una curva de calibración, para ello se prepararon 100 mL de una solución madre que contenía Quitosan al 0.1%, Quercetina 5 mg, ácido acético 0.175% y como solvente una mezcla de etanol-agua 30/70.

Se prepararon cinco diluciones con una concentración final de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm tomando de la solución madre alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 mL y llevándolas a un volumen final de 10 mL utilizando como medio de dilución una solución de CS 0.1%, ácido acético 0.175% y una mezcla de etanol-agua 30/70. La recolección de datos se realizó con un espectrofotómetro Cole Parmer S-2150 a una longitud de onda de 272 nm.

Se utilizó un diseño experimental robusto de taguchi de tres niveles y tres factores de tipo L27 (3^3) con el fin de determinar el número de ensayos a desarrollarse para determinar la eficiencia de encapsulación, para este fin se manejaron tres variables las cuales fueron el tiempo de

agitación (TA), la velocidad de agitación (VA) y la proporción entre CS y TPP (Ratio) como se ve en el Anexo A.

Ya una vez definido el número de ensayos y con los datos de la curva de calibración se procedió a realizar el ensayo como se detalla a continuación:

- Se pesó 5.0 mg de quercetina y se disolvió en 99.825 mL de una mezcla etanol-agua 30/70.
- A la solución anterior se añadió 0.175 mL de ácido acético.
- Se pesó 100 mg de quitosano y se disolvió en la solución de quercetina, ácido acético y etanol-agua 30/70 obteniéndose una solución de CS al 0.1%.
- Se prepararon tres soluciones de TPP a diferentes concentraciones 0.06, 0.07 y 0.08 %, pesándose 60, 70 y 80 mg respectivamente y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.
- Las soluciones de TPP se ajustaron a un pH final de 5 utilizando ácido clorhídrico 1% como agente acidulante.
- En un vaso de precipitación de 25 mL se añadió 5.0 mL de la solución de CS, quercetina, ácido acético y la mezcla etanol-agua y en base a las condiciones propuestas en el anexo A se añadieron, gota a gota bajo agitación constante y temperatura ambiente, 2.0 mL de TPP dejándose agitar la mezcla durante el tiempo sugerido.
- Finalizada la agitación se trasvasó el contenido del vaso a un tubo de centrifuga y se procedió a centrifugar la mezcla por 30 minutos a una velocidad aproximada de 2500 rpm.
- Se analizó el sobrenadante mediante espectrofotometría y se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 272 nm.
- Para calcular el porcentaje de eficiencia de encapsulación se utilizó la fórmula $\%EE = ((A - B)/A) \times 100$ donde A representa la cantidad inicial de quercetina y B representa la cantidad libre de quercetina.
- Finalmente realizar el mismo procedimiento, para cada ensayo propuesto en el ensayo experimental, por triplicado.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Solubilidad de quercetina

Los resultados obtenidos representan la solubilidad de la quercetina en cada una de las mezclas etanol – agua, y fueron comparadas con la curva de calibración en etanol al cien por ciento.

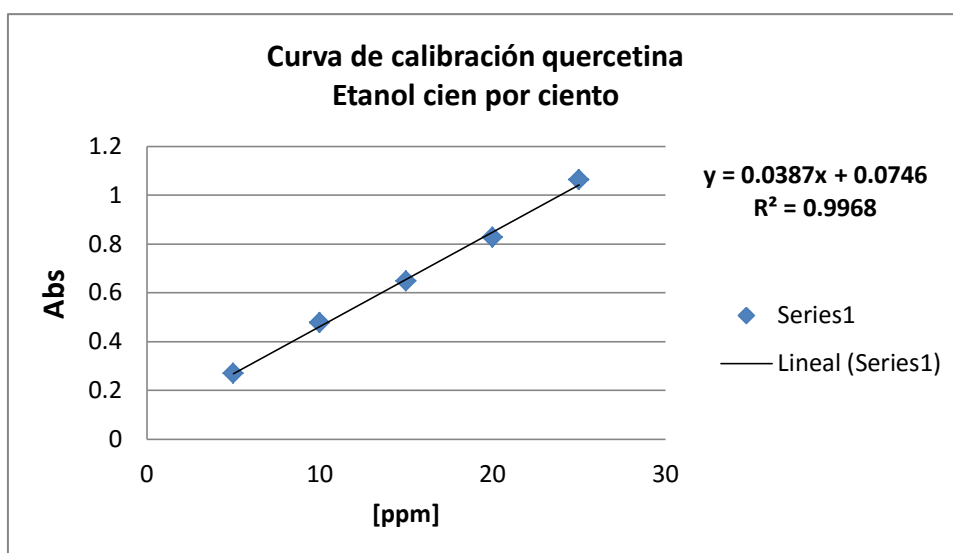


Gráfico 1-3. Curva de calibración de quercetina

Elaborado por (Velasco, 2016)

Tabla 1-3. Solubilidad de quercetina en mg

Etanol,%	Quercetina, mg
20	0.20878553
30	0.598966408
40	1.207005455
50	3.400516796

Elaborado por: (Velasco, 2016)

Como se observa en el gráfico 1-3 se obtuvo la ecuación de la recta de la curva de calibración de quercetina en etanol al cien por ciento la cual fue $y = 0.0387x + 0.0746$ y un coeficiente de

correlación $R= 0.9968$, la misma que nos permitió calcular los mg totales de quercetina disueltos en cada una de las mezclas etanol – agua.

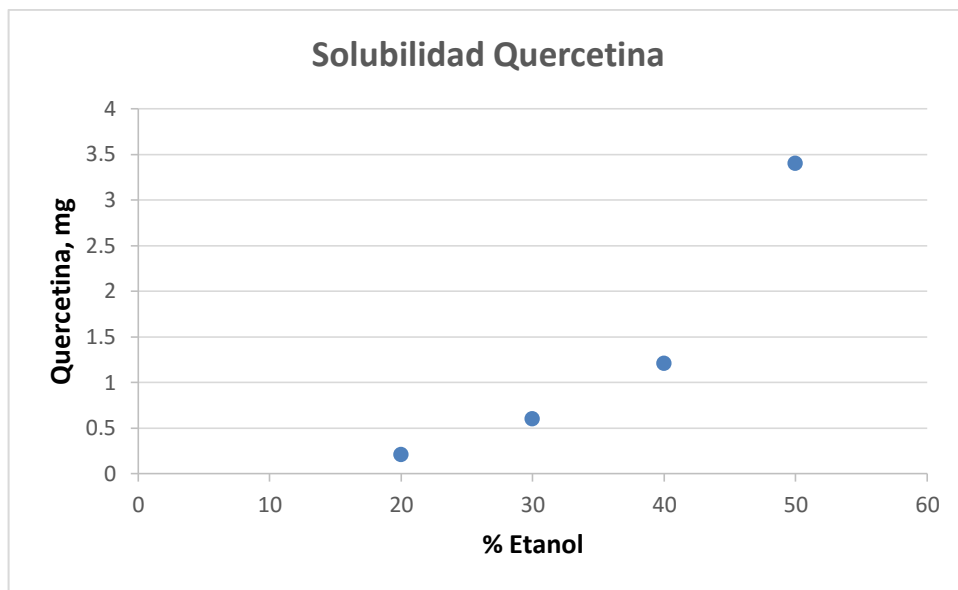


Gráfico 2-3. Solubilidad Quercetina

Elaborado por: (Velasco, 2016)

El gráfico 2-3 nos permite visualizar de mejor manera el comportamiento de la quercetina con respecto a su solubilidad en las diferentes mezclas utilizadas. Como se observa, a manera que aumenta el porcentaje de etanol, la solubilidad de la quercetina aumenta llegando a 3.40 mg cuando el porcentaje de etanol es 50%.

Para los fines buscados en esta investigación trabajar con un porcentaje de etanol del 50% sería ideal en términos de solubilidad de quercetina, sin embargo para los ensayos siguientes se debió analizar la compatibilidad del quitosán con las mezclas etanol - agua, debido a que hasta un porcentaje de 30% el quitosán no sufre alteración alguna, pero a partir de un porcentaje de etanol del 40% el quitosán presentó incompatibilidad con la mezcla etanol – agua viéndose afectada su solubilidad, ya que el quitosán en concentraciones de etanol al 40% o superiores forma films según lo descrito por (Pérez - Díaz et al., 2015, pp.317-23). Por lo tanto para los fines consiguientes se utilizó una mezcla de etanol – agua 30/70 lo que representó una solubilidad de quercetina de 0.59 mg/mL.

Al comparar los datos obtenidos en la tabla 1-3 con la cantidad de quercetina utilizada para preparar las muestras (50 mg), se puede encontrar que la solubilidad de la quercetina es sumamente baja, ya que en el caso de la mezcla etanol – agua 30/70 la cantidad realmente solubilizada representa tan solo el 1.18%.

3.2. Determinación de las concentraciones de CS y TPP para la formación de microcápsulas.

Tal como se detalla en la metodología, la determinación de las concentraciones de quitosán y TPP para la formación de microcápsulas se realizó en dos pasos. En el primero se manejaron concentraciones iguales de ambas sustancias 0.05, 0.1, 0.5 y 1 % pero se varió el volumen en el caso del TPP. En todos los ensayos se utilizó 5 mL de CS mientras que para el TPP los volúmenes fueron de 0.25, 1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 mL.

Una vez realizados los ensayos se procedió a clasificar las soluciones obtenidas en tres grupos: solución clara, microcápsulas y agregados. Se logró determinar que a la concentración 0.05% de CS y TPP no se formó nada por lo que se clasificó como solución clara (Anexo E). A la concentración 0.1% de CS y TPP a un volumen de 0.25 mL se clasificó como solución clara, pero a las soluciones con volúmenes de 1.0, 2.0, 2.5, y 3.0 mililitros de TPP se clasificó como microcápsulas ya que se observó la formación de una suspensión opalescente (Anexo E).

Se realizó el mismo procedimiento con la solución al 0.5% y se obtuvo que a un volumen de 0.25 mL de TPP se formó una suspensión opalescente por lo cual se clasificó como microcápsulas pero a partir de 1 mL de volumen se observó claramente la formación de agregados, por lo cual, se clasificó como tal. En el caso de la solución al 1% de CS y TPP se observó que en todos los volúmenes se formaron agregados.

En la figura 1a-3 se explica gráficamente la clasificación de los tres sistemas (solución clara, microcápsulas y agregados) en función de las concentraciones, en mg, de CS y TPP.

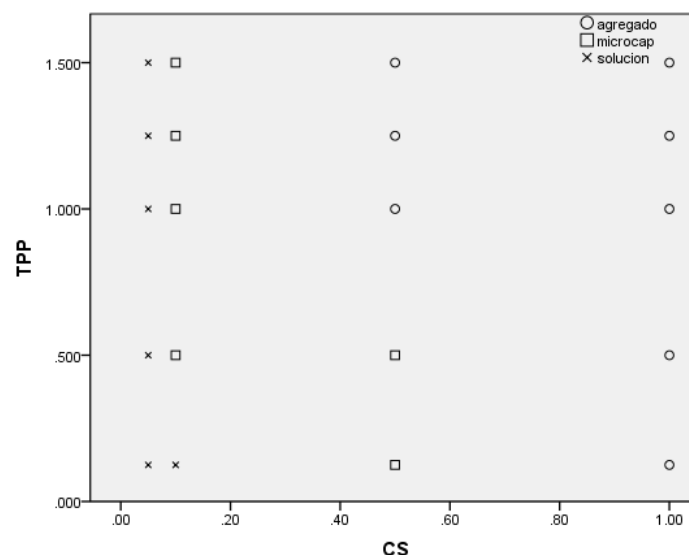


Figura 1a-3. Identificación de la formación de microcápsulas, paso 1

Elaborado por: (Velasco, 2016)

En el siguiente ensayo se manejaron diferentes concentraciones para cada sustancia, para el CS se prepararon soluciones al 0.1, 0.2 y 0.3 % mientras que para el TPP se prepararon soluciones al 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 %. En todos los ensayos se utilizaron 5 mL de CS y 2 mL de TPP y se procedió con la determinación como se explicó en la metodología.

Una vez realizados los ensayos se clasificó las soluciones en los tres sistemas anteriormente definidos, y se observó que a una concentración de CS del 0.1% y una concentración de TPP de 0.02 y 0.04 % no se formó nada por lo que se clasificó como solución clara, a una concentración de TPP de 0.06 y 0.08 % se observó la formación de una suspensión opalescente por lo cual se clasificó como microcápsulas, y a una concentración de TPP del 0.1% se observó la formación de agregados por lo que se clasificó como tal (Anexo F).

Con respecto a la concentración de CS 0.2% se observó que los ensayos con concentraciones de TPP 0.02 y 0.04 % no formaron nada por lo que fueron clasificados como solución clara, a una concentración de TPP 0.06% se observó la formación de una suspensión opalescente y se clasificó como microcápsulas, y a una concentración de TPP del 0.1% el ensayo se clasificó como agregados.

Finalmente con la concentración de CS de 0.3% se pudo observar que con todas las concentraciones de TPP se formaron agregados por lo que fueron clasificados con esa denominación.

En la figura 1b-3 se resume gráficamente la clasificación en los tres sistemas anteriormente planteados que permitieron identificar la formación de microcápsulas en función de las nuevas concentraciones de CS y TPP.

Se observó en el microscopio óptico una muestra de la solución CS/TPP 0.1/0.06 % y CS/TPP 0.1/0.08 %, con el lente de 40X lográndose identificar la presencia de las microcápsulas como se indica en el Anexo H.

Como resultado final del ensayo se obtuvo que las concentraciones óptimas a las que el quitosan y el tripolifosfato formaron microcápsulas fueron CS 0.1% y TPP 0.06 y 0.08 %; y CS 0.2% con TPP 0.06%. Estos resultados son comparables con los obtenidos por (Calvo et al., 1996) en donde señala que la concentración de CS puede llegar hasta 0.4% (4 mg/mL) mientras que la concentración de TPP es máximo de 0.075% (0.75mg/mL) teniendo en cuenta que a concentraciones superiores a 0.2% de CS el tamaño de la micropartícula aumenta y puede formar agregados.

Por las razones antes mencionadas para proceder a realizar la determinación de la eficiencia de encapsulación de quercetina se propuso realizar los ensayos tomando en cuenta tres proporciones de CS/TPP, la primera 0.1/0.06 %, la segunda 0.1/0.07 % y la tercera 0.1/0.08 %.

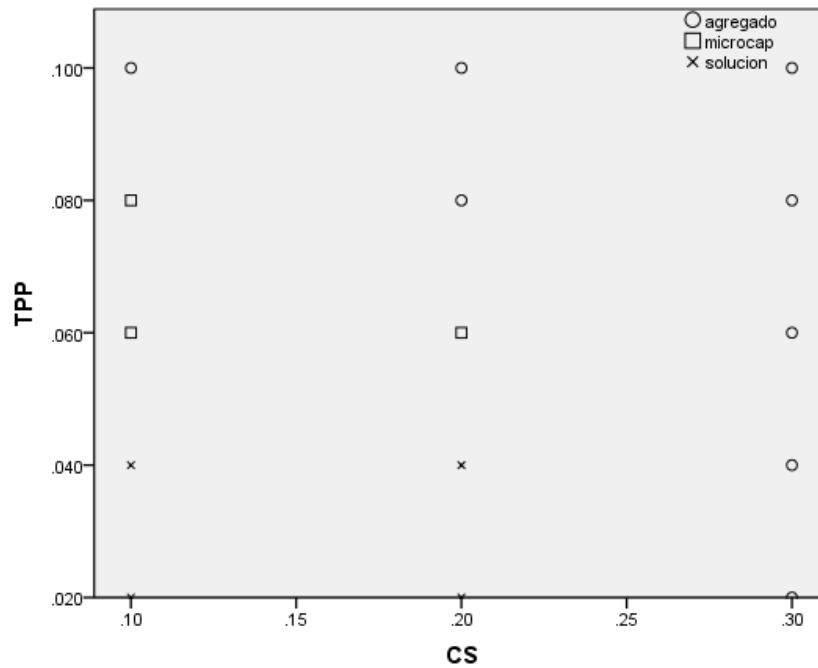


Figura 1b-3. Identificación de la formación de microcápsulas, paso 2

Elaborado por: (Velsaco, 2016)

3.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación

Para llevar a cabo la determinación de la eficiencia de encapsulación previamente se realizó una curva de calibración con el fin de obtener la ecuación de la recta que nos permitió calcular la eficiencia de encapsulación para cada ensayo propuesto.

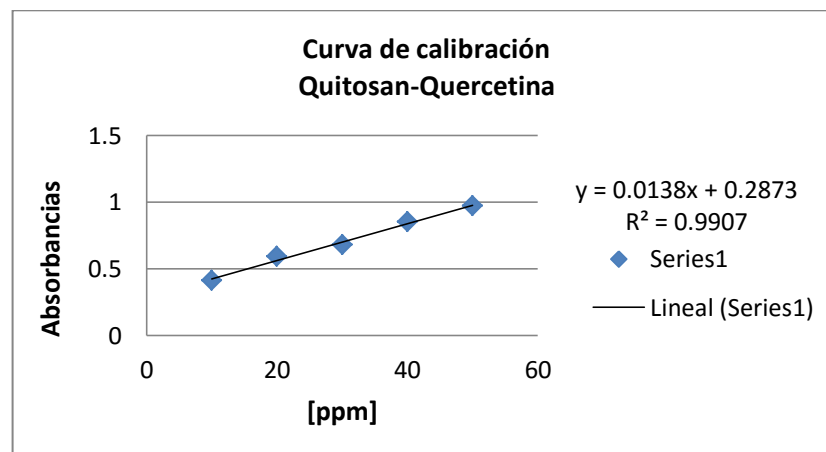


Gráfico 3-3. Curva de calibración Quitosan-Quercetina

Elaborado por: (Velasco, 2016)

Como se observa en el gráfico 3-3 la ecuación obtenida fue $y = 0.0138x + 0.2873$ con un coeficiente de correlación 0.9907. Con estos datos se procedió a realizar el ensayo por triplicado tomando en cuenta la metodología propuesta en el apartado 2.3.3 y variando las condiciones para cada ensayo como se muestra en el Anexo A.

Una vez centrifugadas las muestras se procedió a leer las absorbancias de cada uno de los 27 ensayos a una longitud de onda de 272 nm y se calculó la concentración, en ppm, de quercetina libre en la solución utilizando la ecuación de la recta previamente descrita. Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo I.

Para calcular el % de eficiencia de encapsulación se utilizó la fórmula $\%EE = ((A-B)/A) \times 100$, donde A representa la cantidad inicial de quercetina y B representa la cantidad libre de quercetina.

Cálculo del porcentaje de eficiencia de encapsulación para el ensayo 3

Tubo 1.

$$\% EE = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$\% EE = \frac{50 \text{ ppm} - 10.920}{50} \times 100$$

$$\% EE = 78.159$$

Tubo 2.

$$\% EE = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$\% EE = \frac{50 \text{ ppm} - 11.210}{50} \times 100$$

$$\% EE = 77.579$$

Tubo 3

$$\% EE = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$\% EE = \frac{50 \text{ ppm} - 11.717}{50} \times 100$$

$$\% EE = 76.565$$

Promedio del porcentaje de la eficiencia de encapsulación

$$\% \text{ EEP} = \frac{78.159 + 77.579 + 76.565}{3}$$

$$\% \text{ EEP} = 77.434$$

El cálculo mostrado corresponde al porcentaje de eficiencia de encapsulación del ensayo 3, para el cual se manejó un tiempo de agitación de 15 min, una velocidad de agitación de 250 rpm y una proporción CS/TPP 0.1/0.08 %, el cual presentó la mayor eficiencia de encapsulación con un porcentaje promedio de 77.434%. En el Anexo J se muestran todos los resultados obtenidos en función de cada ensayo.

3.3.1. Análisis de Taguchi

Análisis de modelo lineal: Medias vs. Tiempo Agitación, Velocidad agitación, Proporción CS/TPP

Tabla 2-3. Coeficientes de modelos estimados para Medias

Coeficientes de modelos estimados para Medias				
Término	Coef.	EE coef.	T	P
Constante	49.8055	2.598	19.171	0
Tiempo A 15min	-3.6375	3.674	-0.99	0.342
Tiempo A 30min	2.2186	3.674	0.604	0.557
Velocidad 1000rpm	-6.5575	3.674	-1.785	0.11
Velocidad 250rpm	6.2015	3.674	1.688	0.1
Proporción 0.1/0.06	-0.1002	3.674	-0.027	0.979
Proporción 0.1/0.07	-3.9488	3.674	-1.075	0.304
Tiempo A*Proporción 15min 0.1/0.06	-2.0147	5.196	-0.388	0.705
Tiempo A*Proporción 15min 0.1/0.07	2.3815	5.196	0.458	0.655
Tiempo A*Proporción 30min 0.1/0.06	-4.457	5.196	-0.858	0.408
Tiempo A*Proporción 30min 0.1/0.07	-0.4956	5.196	-0.095	0.926
Velocidad*Proporción 1000rpm 0.1/0.06	7.4271	5.196	1.429	0.178
Velocidad*Proporción 1000rpm 0.1/0.07	2.725	5.196	0.524	0.61
Velocidad*Proporción 250rpm 0.1/0.06	-8.2627	5.196	-1.59	0.138
Velocidad*Proporción 250rpm 0.1/0.07	-5.4929	5.196	-1.057	0.311
S = 13.50 R-cuad. = 57.8% R-cuad.(ajustado) = 8.5%				

Fuente: Minitab

Elaborado por: (Velasco, 2016)

Una vez cuantificado el porcentaje de eficiencia de encapsulación de cada ensayo se procedió a realizar el análisis de Taguchi mediante un análisis de modelo lineal en donde se compararon las Medias vs. Tiempo Agitación, Velocidad agitación, Proporción CS/TPP (Tabla 2-3) obteniéndose un valor p: 0.100 para la variable velocidad 250 rpm lo que nos indica que existe una diferencia significativa con respecto de los demás variables.

Tabla 3-3. Tabla de respuestas para medias

Tabla de respuesta para medias			
Nivel	Tiempo Agitación	Velocidad agitación	Proporción CS/TPP
1	46.17	43.25	49.71
2	52.02	56.01	45.86
3	51.22	50.16	53.85
Delta	5.86	12.76	8
Clasificar	3	1	2

Fuente: Minitab

Elaborado por: (Velasco, 2016)

La tabla 3-3 muestra el promedio de cada característica de respuesta (medias) para cada nivel de cada factor. La tabla incluye clasificaciones basadas en estadísticas Delta, las cuales comparan la magnitud relativa de los efectos. El programa estadístico Minitab asigna clasificaciones basadas en los valores Delta; la clasificación 1 para el valor Delta más alto, la clasificación 2 para el segundo más alto, y así sucesivamente.

La tabla de respuestas para medias (Tabla 3-3) muestra un valor Delta de 12.76 para el factor Velocidad de agitación, obteniéndose una media de 56.01 para el nivel 2 correspondiente a 250 rpm, lo que permitió clasificar a este factor con el número 1. Para el factor proporción CS/TPP el valor Delta fue de 8, con una media de 53.85 para el nivel tres correspondiente a la proporción 0.1/0.08 %, razón por la cual se clasificó con el número 2. En base a lo explicado anteriormente podemos decir que los factores que influyen directamente en el %EE son, en primer lugar, la Velocidad de agitación en el nivel 2 (250 rpm) y la proporción CS/TPP en el nivel 3 (proporción CS/TPP 0.1/0.08 %) (Figura 2-3). Debido a que el factor tiempo tiene un valor p mayor al nivel de significancia 0.10 y su valor Delta es el menor con respecto al resto, podemos decir que dicho factor no influye significativamente sobre el %EE.

Facto	Nombre	Valores de nivel	Nivele
A	Tiempo Agit	15min 30min 60min	3
B	Velocidad a	1000rpm 250rpm 500rpm	3
C	Proporción	0.1/0.06 0.1/0.07 0.1/0.08	3

Figura 2-3: Factores y niveles del diseño experimental

Fuente: Minitab

En el gráfico 4-3 se muestra la gráfica de interacción para medias en donde se observa claramente que el factor tiempo de agitación y proporción CS/TPP a niveles 2 y 3 respectivamente son los responsables del mayor porcentaje de eficiencia de encapsulación. Sin embargo, a pesar de no influir significativamente sobre dicho porcentaje se puede observar que un tiempo de agitación de 30 minutos fue considerado.

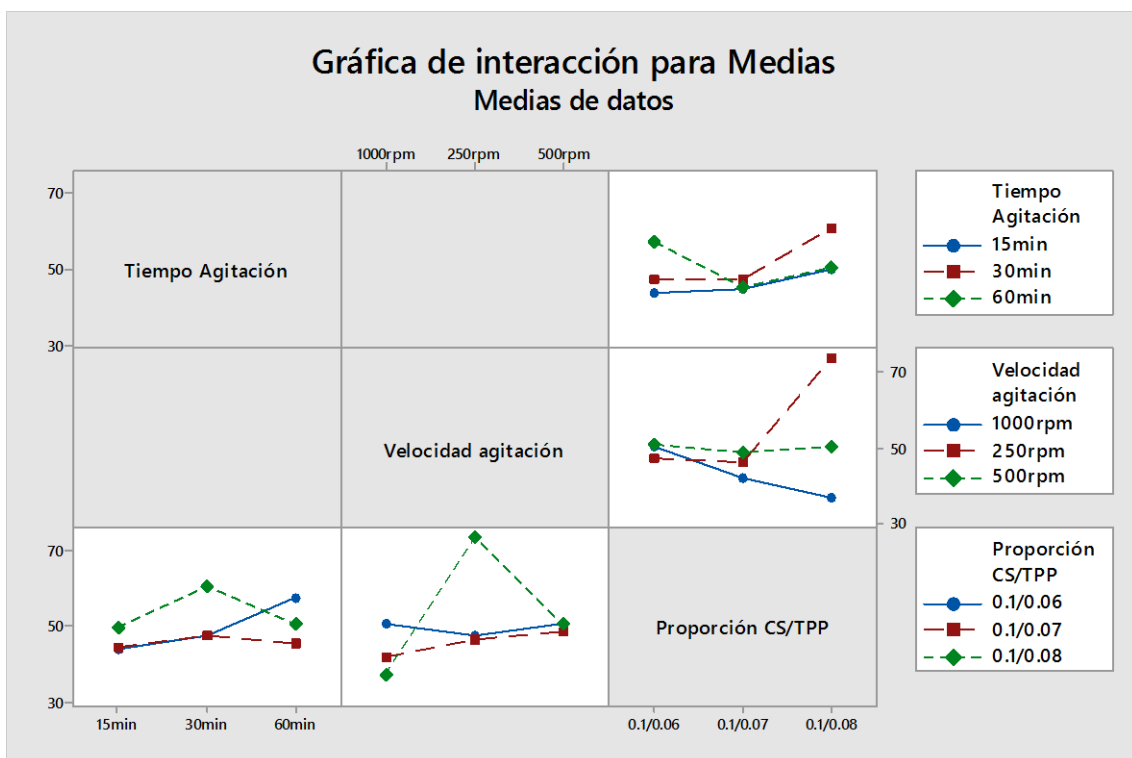


Gráfico 4-3. Gráfica de interacción para medias

Fuente: Minitab

Elaborado por: (Velasco, 2016)

CONCLUSIONES

- Mediante el ensayo de solubilidad se encontró que para los fines prácticos de esta investigación la mezcla etanol- agua 30/70 se puede utilizar como solvente ya que no presentó interacción alguna con los componentes del ensayo, y mostró una solubilidad de quercetina de 0.59 mg/mL.
- El ensayo de determinación de las concentraciones de quitosan y tripolifosfato demostró que concentraciones 0.1/0.06 %, 0.1/0.07 % y 0.1/0.08 % de CS/TPP formaron microcápsulas las cuales fueron identificadas mediante microscopio óptico con el lente de 40X.
- Se cuantificó la eficiencia de encapsulación de quercetina mediante espectrometría UV a una longitud de onda de 272 nm, encontrándose que a un tiempo de agitación de 15 min, una velocidad de agitación de 250 rpm y una proporción CS/TPP 0.1/0.08 %, presentó la mayor eficiencia de encapsulación con un porcentaje promedio de 77.434%.

RECOMENDACIONES

- Analizar el tamaño de la microcápsula mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)
- Determinar la capacidad de carga de las microcápsulas con el fin de llevarlas a una forma farmacéutica de administración oral.
- Continuar con el estudio de la microcápsula de quercetina realizando ensayos de liberación in vitro del principio activo.
- Estudiar la influencia del pH de las soluciones de quitosán y tripolifosfato sobre la formación y el tamaño de las microcápsulas.
- Adquirir equipos de laboratorio que permitan desarrollar de mejor manera los ensayos propuestos: HPLC, microbalanzas, liofilizador, centrifugas.
- Mejorar el sistema eléctrico de los laboratorios con el fin de evitar variaciones en el voltaje que comprometan los resultados de los ensayos.
- Solicitar a las autoridades de la facultad que se entregue material de laboratorio suficiente a los tesisistas para llevar a cabo las investigaciones de una manera más rápida y eficaz.

GLOSARIO

Estrés Oxidativo: desequilibrio entre la producción de radicales libres y una disminución de antioxidantes.

Radicales libre: especie química caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados, es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo y de vida muy corta.

Antioxidante: Sustancia que impide la formación de óxidos.

Actividad antiinflamatoria: mecanismo por el cual se inhibe la biosíntesis de agentes mediadores de la inflamación, principalmente los denominados eicosanoides o derivados del ácido araquidónico.

Proteínas p-21 ras: conjunto de interruptores-reguladores moleculares muy importantes en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos entre ellos la proliferación celular y la apoptosis.

Solubilidad: capacidad de una sustancia o un cuerpo para disolverse al mezclarse con un líquido.

Glucósidos: moléculas compuestas por un glúcido (generalmente monosacárido) y un compuesto no glucídico.

Polímero: son macromoléculas generalmente orgánicas formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros.

Reticulación: vínculo que une una cadena de polímero a otro, pueden ser enlaces covalentes o enlaces iónicos.

CS: Quitosan.

TPP: Tripolifosfato de sodio.

%EE: Porcentaje eficiencia de encapsulación

%EEP: Porcentaje eficiencia de encapsulación promedio.

nm: nanómetro.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] AGOSTINI-COSTA, Tania, et al. "Chromatography and Its applications". *Intech*, vol. 4, (2012) p. 131
- [2] AULTON, M. FARMACIA, *La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. s.l. : Segunda edición. Leicester, Reino Unido: Elsevier España, 2004, pp. 222-232.
- [3] BIO-INREN. *Transferencia de conocimiento Universidad empresa* [En línea]. Salamanca, España: Junta de Castilla y León, 2014. [Consulta: 15 febrero 2016.]. Disponible en: <http://www.redinnocyl.es/index.php/inicio/noticias/185-bio-inren-recibe-el-tercer-premio-del-desafio-universidad-empresa-2014>
- [4] CALVO, P, et al. "Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers". *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 63, n° 1 (1997). (Compostela, España) pp. 125-132.
- [5] CARTAYA, O y REYNALDO, O. "Flavonoides: Características químicas y aplicaciones". *Cultivos Tropicales*, vol. 22, n° 2 (2001), (La Habana, Cuba) pp. 5-14.
- [6] CASTELLANO, G, TENA, J y TORRENS, F. "Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia oceanica* (L.) Delile". *Communications in mathematical and in computer chemistry*, vol. 67, (2012), (Valencia, España) pp. 231-350.
- [7] DAY, A, et al. "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase". *FEBS Letters*, vol. 468, n° (2-3) (2000), (United kingdom) pp. 166-170.
- [8] DELGADO, L, BETANZOS, C y SUMAYA, M. "Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo". *Redalyc*, vol. 18, n° 50 (2010), (Aguas calientes, México), pp. 10-15.
- [9] ESCAMILLA, C, CUEVAS, E Y FONSECA, J "Flavonoides y sus acciones antioxidantes". *Revista Facultad de Medicina UNAM*, vol. 52, n° 2 (2009), (D.F, México) pp. 73-75
- [10] ESMAEILZADEH, F, et al. "Effect of quercetin supplementation on blood pressure in patients with a history of ischemic stroke". *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, vol. 2013-3-17. (2013), (Tehran, Irán) pp. 1963-1966.

- [11] FLORES - BELMONT, I y JIMÉNEZ - MUNGUÍA, M. "Microencapsulación de compuestos activos con quitosano". *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, vol. 7, n° 1 (2013), (Puebla, México) pp. 48-56.
- [12] GAONKAR, A, et al. *Microencapsulation in the food industry*. First edition. San diego - California : ELSEVIER, 2014. págs. 557-569.
- [13] GHARSALLAOUI, A, et al. "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients". *Food Research International*, vol. 40, n° 9 (2007), (Dijon,France) pp. 1107-1121.
- [14] GUIRADO, O. "Expresión de las proteínas p21 Ras y Cáncer". *Medicentro*, vol. 11, n° 1 (2007). (Cuba) pp 1-6.
- [15] HEIM, K, TAGLIAFERRO, A y BOBILYA, D. "Flavonoid, antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships". *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, n° 10 (2002), (United States of America) pp. 572-584.
- [16] HELGERUD, T, et al. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. First edition. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. , 2010, pp. 48-67.
- [17] HENDRICH, A.B. "Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds" . *Acta Pharma*, vol. 27, n° 1 (2006), (Polonia) pp. 27-40.
- [18] HERTOOG, MG y HOLLMAN, PC. "Potencial health effects of the dietary flavonol quercetin". *Europe Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 50, n° 2 (1996), (The Netherlands) pp. 63-71.
- [19] HOLLMAN, P, et al. "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers". *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 62, n° 6 (1995), (Wageningen, Netherlands) pp. 1276-1282.
- [20] JÄGER, A y SAABY, L. "Flavonoids and the CNS". *Molecules*, vol. 16, n° 2 (2011), (Copenhague, Dinamarca) pp. 1471-1485.
- [21] KUMAR, S y PANDEY, A. "Chemistry and biological Activities of Flavonoids: An overview". *The scientific world journal*, vol. 2013, (2013), (Allahabad, India) pp. 1-16.
- [22] KWAK, Hae-Soo. 2014. *Nano- and Microencapsulation for Foods*. First edition. Seoul : Jihn Wiley and sons, Ltd., 2014. pp. 57-63.
- [23] LÓPEZ, T. "Flavonoides". *Fitoterapia*: vol. 21, n°4 (2002), pp.108-113

- [24] MALDONADO, O, et al. “Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas”. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, vol. 10, n° 2 (2010), (Veracruz, México) pp. 31-39.
- [25] MARMOL, Z, et al. “Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones”. *Revista Tecnocientífica URU*, n° 1 (2011), (Venezuela) págs. 53-58.
- [26] MARTÍNEZ, S, et al. “Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes”. *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 17, n° 6 (2002), (España) pp. 271-278.
- [27] MICHALAK, A. “Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress”. *Polish journal of environmental studies*, vol. 15, n° 4 (2006). (Polonia) pp. 523-530.
- [28] MOHAMMADPOURDOUNIGHI, Naser, et al. “Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom”. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 6, n° 1 (2010), (Irán) pp. 137-143.
- [29] MORETTI, Elena, et al. “Effect of quercetin-loaded liposomes on induced oxidative stress in human spermatozoa”. *Reproductive Toxicology*, vol. 60, (2016), (Siena, Italy) pp. 140-147.
- [30] MURILLO, M, et al. “Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas”. *Revista Médica Universidad de Navarra*, vol. 45, n° 4 (2001), (Navarra, España) pp. 19-34.
- [31] PARZANESE, Magali. “Microencapsulación”. *Tecnologías para la Industria Alimentaria*, vol. 20, (2008) (Argentina) pp. 1-12.
- [32] PÉREZ - DÍAZ, M, et al. “Anti biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts”. *Material Science & Engineering: C*, vol. 60, 2015, (D.F., México) pp. 317-323.
- [33] QIN, H, et al. “Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles loaded with isoniazid”. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 381, (2015), (Jiangsu, China) pp. 120-126.
- [34] RANELLETTI, F, et al. “Quercetin inhibits p21-ras expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors”. *International Union Against Cancer*, vol. 85, n° 3 (2000), (Roma, Italy) pp. 438-445.
- [35] REYES, Luis. *Optimización y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisfericina refinada* [En línea](Tesis). (Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Unidad

Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México (D.F.). 2010. pp 8-19. [Consulta: 2016-02-26]. Disponible en:

<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8448/37.pdf?sequence=1>

[36] SARASIN, A. “An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis”. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol 544, n° 2-3 (2003), (Villejuif, France) pp. 99-106.

[37] SCALIA, S y MEZZENA, M. “Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo - and chemical – stability”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 49, n° 1 (2008) pp. 90-94.

[38] SOHRABI, M y DARABI, G. “The application of continuous wavelet transform and least squares support vector machine for the simultaneous quantitative spectrophotometric determination of Myricetin, Kaempferol and Quercetin as flavonoids in pharmaceutical plants”. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 152, (2016), (Tehran, Iran) pp. 443-452.

[39] SUÑE, J. *Formación Continuada para Farmacéuticos de Hospital*, Segunda edición. Barcelona, España: Ferrer Grupo, 2001, pp. 31-35.

[40] VAN DER WOUDE, H, et al. “Consequences of quercetin methylation for its covalent glutathione and DNA adduct formation”. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, n° 3 (2012), (Netherlands) pp. 193-203.

[41] VICENTE-VICENTE, L, PRIETO, M y MORALES, A. “Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio”. *Revista de Toxicología*, Vol. 30, n° 2 (2013), (Pamplona, España) pp. 171-181.

[42] VILA JATO, José. *Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid-España : Síntesis, S.A., 2008. pp. 577-582.

[43] WALKER, S y LOCKYER, P. “Visualizing Ras signalling in real time”. *Journal of cell Science*, vol. 117, n° 14 (2004), (Cambridge, United Kingdom) pp. 2879-2886.

[44] ZAMORA, J. “Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud”. 1, 2007, *Revista chilena de nutrición* [en línea], 2007, (Santiago, Chile) 34(1), pp. 17-26. [Consulta: 03 marzo 2016]. ISSN 0717-7518. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100002&lng=es&nrm=iso

ANEXOS

Anexo A: Diseño Robusto de taguchi. Número de experimentos realizados

Ensayo	Tiempo de agitación	Velocidad de Agitación	Ratio CS/TPP
1	15min	250rpm	0.1/0.06
2	15min	250rpm	0.1/0.07
3	15min	250rpm	0.1/0.08
4	15min	500rpm	0.1/0.06
5	15min	500rpm	0.1/0.07
6	15min	500rpm	0.1/0.08
7	15min	1000rpm	0.1/0.06
8	15min	1000rpm	0.1/0.07
9	15min	1000rpm	0.1/0.08

Ensayo	Tiempo de agitación	Velocidad de Agitación	Ratio CS/TPP
10	30min	250rpm	0.1/0.06
11	30min	250rpm	0.1/0.07
12	30min	250rpm	0.1/0.08
13	30min	500rpm	0.1/0.06
14	30min	500rpm	0.1/0.07
15	30min	500rpm	0.1/0.08
16	30min	1000rpm	0.1/0.06
17	30min	1000rpm	0.1/0.07
18	30min	1000rpm	0.1/0.08

Ensayo	Tiempo de agitación	Velocidad de Agitación	Ratio CS/TPP
19	60min	250rpm	0.1/0.06
20	60min	250rpm	0.1/0.07
21	60min	250rpm	0.1/0.08
22	60min	500rpm	0.1/0.06
23	60min	500rpm	0.1/0.07
24	60min	500rpm	0.1/0.08
25	60min	1000rpm	0.1/0.06
26	60min	1000rpm	0.1/0.07
27	60min	1000rpm	0.1/0.08

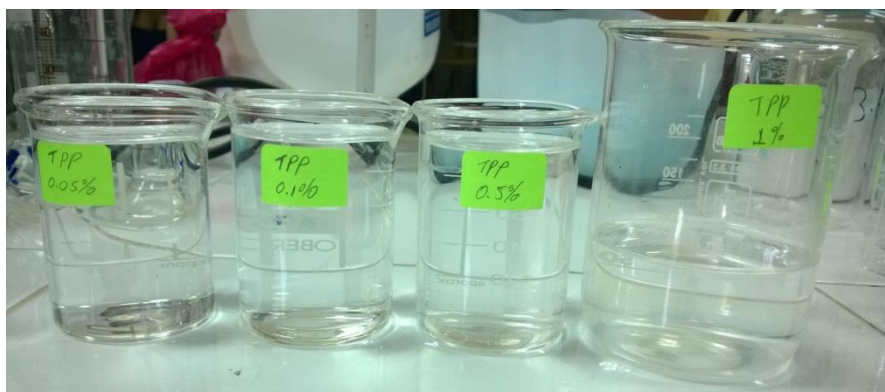
Anexo B: Soluciones de quercetina en mezclas etanol-agua (20/80, 30/70, 40/60, 50/50) y etanol puro.



Anexo C: Soluciones de quitosán (CS) en concentraciones 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%.



Anexo D: Soluciones de tripolifosfato (TPP) en concentraciones 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%.



Anexo E: Determinación de las concentraciones de quitosano y tripolifosfato (CS/TPP) para la formación de microcápsulas paso 1.



CS/TPP 0.05%

5/0.25 mL; 5 /1 mL; 5/2 mL; 5/2.5 mL; 5/3 mL

CS/TPP 0.1%

5/0.25 mL; 5 /1 mL; 5/2 mL; 5/2.5 mL; 5/3 mL



CS/TPP 0.5%

5/0.25 mL; 5 /1 mL; 5/2 mL; 5/2.5 mL; 5/3 mL



CS/TPP 1%

5/0.25 mL; 5 /1 mL; 5/2 mL; 5/2.5 mL; 5/3 mL



CS/TPP

0.1%/2 mL; 0.1%/2.5 mL; 0.1%/3 mL; 0.5%/0.25 mL



Anexo F: Determinación de las concentraciones de quitosano y tripolifosfato (CS/TPP) para la formación de microcápsulas paso 2.



% CS/ TPP

5 mL/2 mL

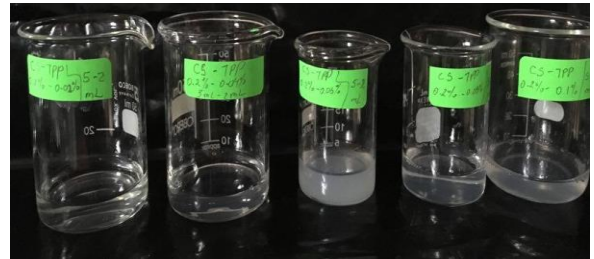
0.1/0.02; 0.1/0.04; 0.1/0.06; 0.1/0.06; 0.1/0.1



% CS/TPP

5 mL/2 mL

0.2/0.02; 0.2/0.04; 0.2/0.06; 0.2/0.06; 0.2/0.1



%CS/TPP

5 mL/2 mL

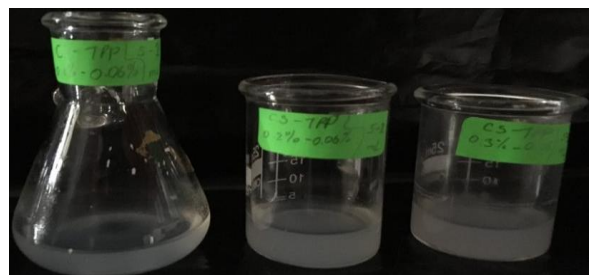
0.3/0.02; 0.3/0.04; 0.3/0.06; 0.3/0.06; 0.3/0.1



%CS/TPP

5 mL/2 mL

0.1/0.06; 0.2/0.06; 0.3/0.06



Anexo G: Determinación de la eficiencia de encapsulación

1. Soluciones utilizadas para la determinación



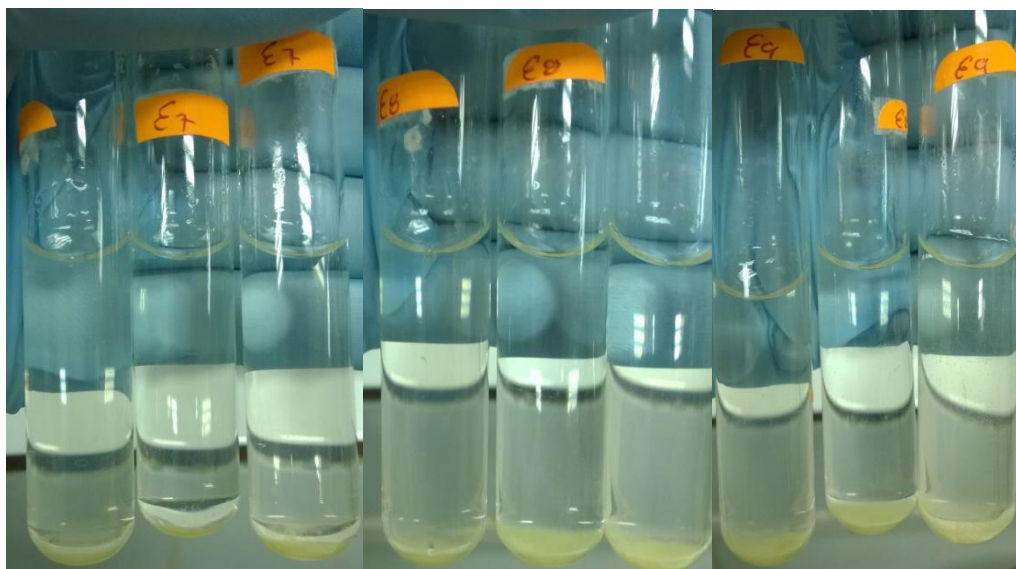
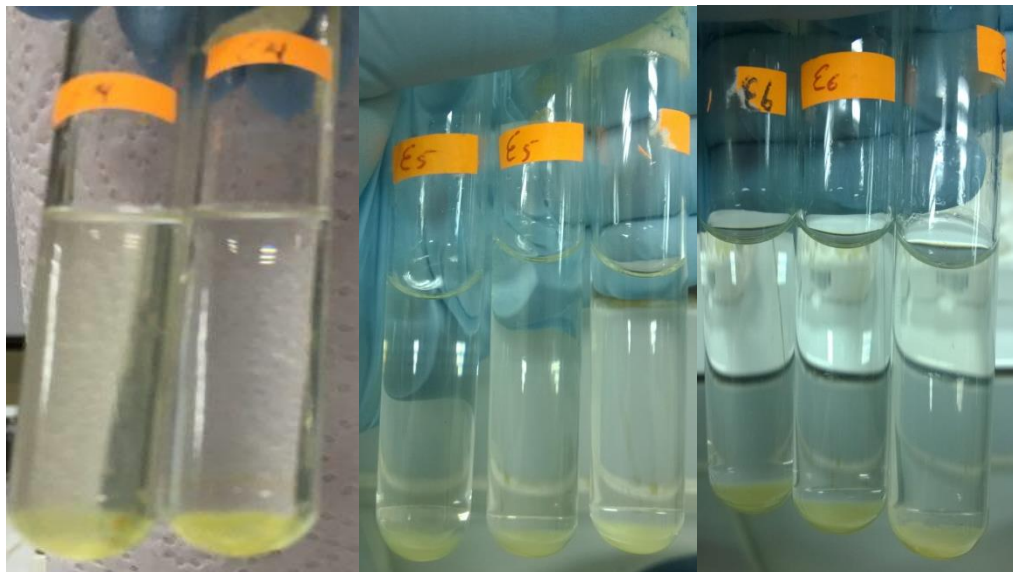
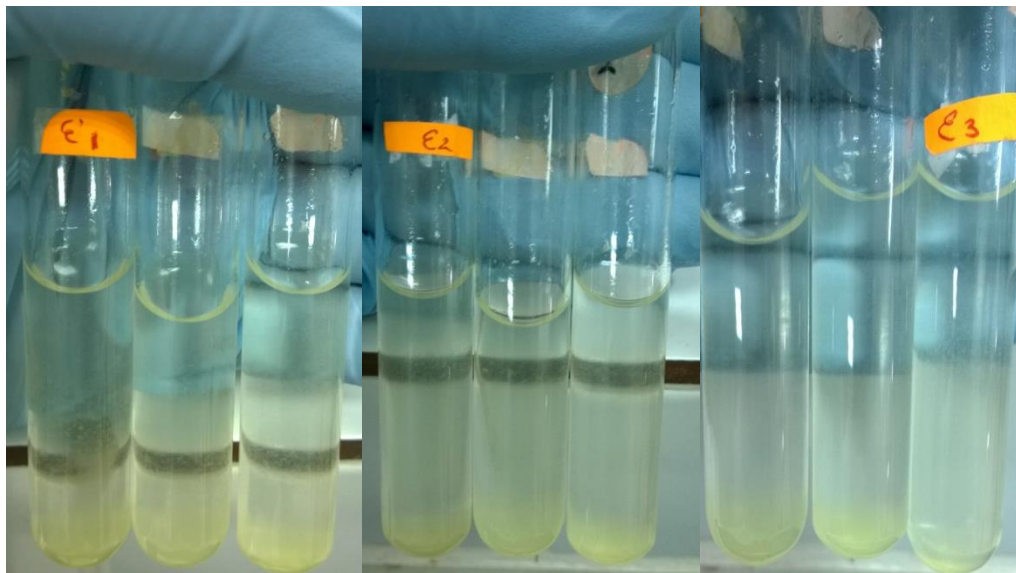
2. Vasos con 5 mL de: quitosan 0.1%, quercetina, etanol-agua 30/70 y ácido acético



3. Agitación magnética de la mezcla quitosan 5 mL - TPP 2 mL de acuerdo a la metodología propuesta



4. Tubos centrifugados, se observan microcápsulas al fondo.



Anexo H: Identificación de las microcápsulas de quercetina mediante microscopio óptico.

Lente de 40X

%CS/TPP

0.1/0.06



%CS/TPP

0.1/0.08



Anexo I: Concentración de quercetina libre

Tiempo de agitación	Velocidad de agitación	Proporción CS/TPP	Abs1	Abs2	Abs3	Quercetina libre, ppm 1	Quercetina libre, ppm 2	Quercetina libre, ppm 3
15min	250rpm	0.1/0.06	0.812	0.809	0.813	38.02173913	37.8043478	38.0942029
15min	250rpm	0.1/0.07	0.668	0.69	0.683	27.58695652	29.1811594	28.673913
15min	250rpm	0.1/0.08	0.438	0.442	0.449	10.92028986	11.2101449	11.7173913
15min	500rpm	0.1/0.06	0.603	0.58	0.591	22.87681159	21.2101449	22.0072464
15min	500rpm	0.1/0.07	0.68	0.707	0.691	28.45652174	30.4130435	29.2536232
15min	500rpm	0.1/0.08	0.713	0.725	0.721	30.84782609	31.7173913	31.4275362
15min	1000rpm	0.1/0.06	0.619	0.613	0.62	24.03623188	23.6014493	24.1086957
15min	1000rpm	0.1/0.07	0.629	0.643	0.635	24.76086957	25.7753623	25.1956522
15min	1000rpm	0.1/0.08	0.757	0.721	0.734	34.03623188	31.4275362	32.3695652
30min	250rpm	0.1/0.06	0.573	0.59	0.583	20.70289855	21.9347826	21.4275362
30min	250rpm	0.1/0.07	0.584	0.586	0.581	21.5	21.6449275	21.2826087
30min	250rpm	0.1/0.08	0.481	0.492	0.487	14.03623188	14.8333333	14.4710145
30min	500rpm	0.1/0.06	0.68	0.687	0.682	28.45652174	28.9637681	28.6014493
30min	500rpm	0.1/0.07	0.535	0.579	0.557	17.94927536	21.1376812	19.5434783
30min	500rpm	0.1/0.08	0.48	0.46	0.467	13.6812	12.5144928	13.0217391
30min	1000rpm	0.1/0.06	0.689	0.678	0.686	29.10869565	28.3115942	28.8913043
30min	1000rpm	0.1/0.07	0.795	0.815	0.809	36.78985507	38.2391304	37.8043478
30min	1000rpm	0.1/0.08	0.742	0.688	0.709	32.94927536	29.0362319	30.557971
60min	250rpm	0.1/0.06	0.565	0.538	0.554	20.12318841	18.1666667	19.326087
60min	250rpm	0.1/0.07	0.693	0.715	0.704	29.39855072	30.9927536	30.1956522
60min	250rpm	0.1/0.08	0.461	0.483	0.479	12.58695652	14.1811594	13.8913043
60min	500rpm	0.1/0.06	0.609	0.6	0.603	23.3115942	22.6594203	22.8768116
60min	500rpm	0.1/0.07	0.662	0.674	0.669	27.15217391	28.0217391	27.6594203
60min	500rpm	0.1/0.08	0.7	0.695	0.692	29.9057971	29.5434783	29.326087
60min	1000rpm	0.1/0.06	0.599	0.569	0.582	22.58695652	20.4130435	21.3550725
60min	1000rpm	0.1/0.07	0.613	0.622	0.625	23.60144928	24.2536232	24.4710145
60min	1000rpm	0.1/0.08	0.708	0.716	0.714	30.48550725	31.0652174	30.9202899

Anexo J: Porcentaje eficiencia de encapsulación de quercetina.

Tiempo Agitación	Velocidad agitación	Proporción CS/TPP	%EE1	%EE2	%EE3	%EEP
15min	250rpm	0.1/0.06	23.9565217	24.3913043	23.8115942	24.0531401
15min	250rpm	0.1/0.07	44.826087	41.6376812	42.6521739	43.03864734
15min	250rpm	0.1/0.08	78.1594203	77.5797101	76.5652174	77.43478261
15min	500rpm	0.1/0.06	54.2463768	57.5797101	55.9855072	55.93719807
15min	500rpm	0.1/0.07	43.0869565	39.173913	41.4927536	41.25120773
15min	500rpm	0.1/0.08	38.3043478	36.5652174	37.1449275	37.33816425
15min	1000rpm	0.1/0.06	51.9275362	52.7971014	51.7826087	52.16908213
15min	1000rpm	0.1/0.07	50.4782609	48.4492754	49.6086957	49.51207729
15min	1000rpm	0.1/0.08	31.9275362	37.1449275	35.2608696	34.77777778
30min	250rpm	0.1/0.06	58.5942029	56.1304348	57.1449275	57.28985507
30min	250rpm	0.1/0.07	57	56.7101449	57.4347826	57.04830918
30min	250rpm	0.1/0.08	71.9275362	70.3333333	71.057971	71.10628019
30min	500rpm	0.1/0.06	43.0869565	42.0724638	42.7971014	42.65217391
30min	500rpm	0.1/0.07	64.1014493	57.7246377	60.9130435	60.91304348
30min	500rpm	0.1/0.08	72.0724638	74.9710145	73.9565217	73.66666667
30min	1000rpm	0.1/0.06	41.7826087	43.3768116	42.2173913	42.4589372
30min	1000rpm	0.1/0.07	26.4202899	23.5217391	24.3913043	24.77777778
30min	1000rpm	0.1/0.08	34.1014493	41.9275362	38.884058	38.30434783
60min	250rpm	0.1/0.06	59.7536232	63.6666667	61.3478261	61.58937198
60min	250rpm	0.1/0.07	41.2028986	38.0144928	39.6086957	39.60869565
60min	250rpm	0.1/0.08	74.826087	71.6376812	72.2173913	72.89371981
60min	500rpm	0.1/0.06	53.3768116	54.6811594	54.2463768	54.10144928
60min	500rpm	0.1/0.07	45.6956522	43.9565217	44.6811594	44.77777778
60min	500rpm	0.1/0.08	40.1884058	40.9130435	41.3478261	40.81642512
60min	1000rpm	0.1/0.06	54.826087	59.173913	57.2898551	57.09661836
60min	1000rpm	0.1/0.07	52.7971014	51.4927536	51.057971	51.7826087
60min	1000rpm	0.1/0.08	39.0289855	37.8695652	38.1594203	38.352657