

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Contribución al desarrollo de una formulación
líquida de administración oral para un extracto de
hojas de *Passiflora quadrangularis* L aplicando los
conceptos del enfoque de calidad basada en el
diseño (QbD)**

David Orlando Porras Gaviria

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2019

Contribución al desarrollo de una formulación líquida de administración oral para un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis* L aplicando los conceptos del enfoque de calidad basada en el diseño (QbD)

David Orlando Porras Gaviria

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Ph.D. Yolima Baena Aristizábal

Profesora Titular

Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de productos fitofarmacéuticos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales – TECPRONA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2019

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, por permitirme crecer personal y profesionalmente.

A Colciencias que otorgó la financiación a la Red Nacional para la Bioprospección de Especies Tropicales (RIFRUTBIO), de la que hace parte este trabajo de investigación.

A mi directora de tesis, la profesora Yolima Baena por sus enseñanzas, su calidad humana y su apoyo incondicional, que fue fundamental para finalizar esta etapa.

De manera especial quiero agradecer a la profesora Claudia Mora por sus enseñanzas, su disposición, su orientación y su paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis padres y a mi hermana porque este logro es gracias a ustedes.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Lina, Juan José, Marcel, Laura, Alejandro y Jors, quienes hicieron más enriquecedora esta experiencia.

A la señora Patricia y don Jorge gracias por su colaboración.

Resumen

El enfoque de calidad basado en el diseño (QbD) tiene como punto de partida unos objetivos previamente definidos que permiten asegurar la calidad, seguridad y eficacia del producto. El presente trabajo de investigación ejemplifica la implementación de algunos principios de QbD en el desarrollo de una formulación líquida a partir de un extracto hidroalcohólico de hojas de *Passiflora quadrangularis*, específicamente aquellos que aplican hasta la propuesta de la formulación y del proceso de fabricación. En su primera fase se determinó el perfil del producto, el perfil de calidad del producto y los atributos críticos de calidad, mediante entrevista a profesionales de la salud y revisión de la literatura científica. Esta información orientó las demás etapas del trabajo. Así, en los ensayos de preformulación se evaluó el efecto de la temperatura, la luz, la concentración de etanol y el tipo de poliol sobre variables respuesta como pH, color, cantidad de precipitado y cuantificación de marcadores. La luz fue la única variable que tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la estabilidad del extracto. La prueba de eficacia antimicrobiana evidenció la capacidad de autopreservación del extracto de *P. quadrangularis*. Esta información permitió proponer un prototipo de formulación y el proceso de fabricación correspondiente, cuyo análisis del riesgo (matriz RAM y matriz FMEA) facilitó el diseño de propuestas respecto a las estrategias de control.

Palabras clave: Calidad basada en el diseño, gestión del riesgo, formulación, extracto natural, *Passiflora quadrangularis*.

Abstract

Objectives previously defined are the starting point of Quality by design (QbD) to ensure the quality, safety and efficacy of the product. This research was focused on the exemplifies of some QbD principles in the development of a liquid formulation from a hydroalcoholic extract of leaves of *Passiflora quadrangularis*, specifically those that affect the formulation proposal and the manufacturing process. In the first stage Target Product Profile, Quality Target Product Profile and Critical Quality Attributes were determined through interviews to health professionals and reviewing the scientific literature. This information guided the other process stages. In the preformulation tests, the effect of temperature, light, ethanol concentration and the effect of a polyol on response variables such as pH, color, amount of precipitate and quantification of markers was evaluated. Light was the only variable having a statistically significant effect on stability of the extract. The antimicrobial efficacy test demonstrates the self-preserved capacity of *P. quadrangularis*. This information will propose a prototype formulation and the corresponding manufacturing process, our risk analysis (RAM Matrix and FMEA matrix) will facilitate the design of proposals regarding control strategies.

Keywords: Quality by design, risk management, formulation, herbal product, *Passiflora quadrangularis*.

Contenido

1. Aspectos generales.....	5
1.1 Calidad desde el diseño (QbD)	5
1.2 Tratamientos para la ansiedad.....	10
1.3 <i>Passiflora quadrangularis</i> Linn.....	14
Objetivos.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos	19
2. Metodología	20
2.1 Materiales	20
2.2 Definición del perfil del producto (TPP).....	21
2.3 Etapas de preformulación y formulación para el desarrollo del producto	22
2.3.1 Caracterización del extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	23
• Recolección del material vegetal	23
• Extracción.....	23
• Caracterización.....	24
2.3.2 Estudio de estabilidad del extracto de <i>P. quadrangularis</i>	25
2.3.2.1 Influencia de la temperatura, la concentración de etanol y el tipo de poliol. ...	25
2.3.2.2 Influencia de la luz, la concentración de etanol y el tipo de poliol	27
2.3.2.3 Variables respuesta evaluadas	28
2.3.2.4 Análisis estadístico	30
2.4 Análisis microbiológico extracto de <i>P. quadrangularis</i>	30
2.4.1 Ensayo en medios de cultivo diferenciales.....	30
2.4.2 Prueba de eficacia antimicrobiana	31
2.5 Propuesta de la formulación del producto y de su proceso de fabricación	34
2.6 Evaluación de la estabilidad de la formulación seleccionada y fabricada bajo las condiciones establecidas para el proceso	36

3. Resultados y discusión	38
3.1 Consideraciones iniciales	40
3.1.1 Información del paciente y profesionales de la salud	41
3.1.2 Actividad farmacológica	42
3.1.3 Necesidades del fabricante.....	46
3.2 Perfil del producto objetivo (TPP).....	47
3.3 Perfil de calidad del producto (QTPP) y definición de los atributos críticos de calidad (CQAs)	48
3.4 Preformulación y formulación para el desarrollo del producto	50
3.4.1 Caracterización del extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	51
3.5 Estudio de estabilidad del extracto.....	54
3.5.1 Influencia de la temperatura, la concentración de etanol y el tipo de poliol. ...	55
3.5.2 Influencia de la luz, la concentración de etanol y el tipo de poliol.....	68
3.6 Estudio microbiológico	75
3.6.1 Ensayo en medios de cultivo diferenciales.....	75
3.6.2 Desafío microbiano.....	77
3.7 Propuesta de la formulación del producto y del proceso de fabricación	82
3.7.1 Formulación del producto	82
3.7.2 Proceso de fabricación	84
3.8 Análisis de riesgos para la formulación y el proceso de fabricación.	85
3.9 Evaluación de la estabilidad de la formulación seleccionada y elaborado a escala laboratorio bajo las condiciones establecidas para el proceso	94
4. Conclusiones.....	96
5. Recomendaciones.....	98

Lista de figuras

Figura 1-1 Principales etapas del enfoque de calidad basado en el diseño para el desarrollo de los productos y sus procesos de fabricación	8
Figura 1-2. Fotografía de las hojas, frutos y flor de <i>Passiflora quadrangularis</i> L.	16
Figura 1-3. Componentes responsables de la actividad sedante de <i>Passiflora quadrangularis</i> A) Vitexina-2-O-xilósido, B) Vitexina-2-O-glucósido C) Orientin-2-O-xilósido D) Orientin-2-O-glucósido.	17
Figura 2-1. Cámara de fotoestabilidad. Tomado de Herrera 2016.	28
Figura 3-1. Esquema metodología QbD. Adaptado de Pramod 2016.	38
Figura 3-2. Elementos considerados para la definición del perfil del producto y sus interrelaciones (Elaboración propia).	40
Figura 3-3. Extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora quadrangularis</i>	50
Figura 3-4. Perfil cromatográfico del extracto de <i>Passiflora quadrangularis</i>	51
Figura 3-5. Comportamiento del pH a los diferentes tiempos, para los ensayos con el extracto de <i>Passiflora quadrangularis</i>	56
Figura 3-6. Mecanismo de degradación flavonoides en medio básico.	57
Figura 3-7. Mecanismo de degradación flavonoides en medio ácido.	58
Figura 3-8. Fotografía de muestras de concentración de: A) 30% etanol-A30G y B) 50% etanol-A50G.	59
Figura 3-9. Fotografía de muestras almacenadas a 40 °C, utilizando 30% etanol y sorbitol como poliol. A) Tiempo cero y B) Tiempo 90 días.	60
Figura 3-10. Comparación de la cantidad de precipitado a los diferentes tiempos de muestreo para las muestras evaluadas.	61
Figura 3-11. Efecto de la concentración de extracto, la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de A) Orientina-2-O-glucósido B) Vitexina en función del tiempo.	63
Figura 3-12. Efecto de la concentración de extracto, la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de flavonoides presentes en las formulaciones de <i>P. quadrangularis</i> en función del tiempo. A) Orientina-2O-glucósido B) Orientina-2O-xilósido C) Vitexina-2O-glucósido D) Vitexina-2O-xilósido E) Vitexina.	64
Figura 3-13. Diagrama de Pareto estandarizado para vitexina 2 ^o -O-glucósido (V2OG) en el estudio de estabilidad.	67

Figura 3-14. Comparación del pH a los diferentes tiempos, para las diferentes composiciones el extracto de <i>Passiflora quadrangularis</i> , en presencia y ausencia de luz.	70
Figura 3-15. Comparación de los diferentes flavonoides presentes en el extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i> a cero días y 90 días para las muestras evaluadas en el ensayo de fotoestabilidad. A) Orientina-2O-glucósido B) Orientina-2O-xilósido C) Vitexina-2O-glucósido D) Vitexina-2O-xilósido E) Vitexina.	71
Figura 3-16. Diagrama de Pareto estandarizado para vitexina 2 ^o -O-glucósido (V2OG) en el estudio de fotoestabilidad.	74
Figura 3-17. Resultados microbiológicos para extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i> . A) Agar rojo cristal violeta B) Agar BHI C) Agar Sabouraud oxitetraciclina D) Agar plate count.	76
Figura 3-18. Crecimiento microbiano en un medio con extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i> . A) <i>S. Aureus</i> B) <i>E. Coli</i> C) <i>P. aeruginosa</i> D) <i>C. albicans</i> E) <i>A. brasiliensis</i>	79
Figura 3-19. Diagrama del proceso para la preparación de gotas orales de extracto de <i>P. quadrangularis</i>	85
Figura 3-20. Diagrama del proceso con los puntos críticos y las estrategias de control para la obtención de gotas orales de extracto de <i>P. quadrangularis</i>	93
Figura 3-21. Comparación del porcentaje de extracto remanente para cada uno de los seis marcadores seleccionados vitexina-2-O-xilósido (Vi-O-Xil), vitexina-2-O-glucósido (Vi-O-Glc), orientina-2-O-xilósido (Or-O-Xil) y orientina-2-O-glucósido (Or-O-Glc), vitexina (Vi) e iso-vitexina (Iso-Vi) a una concentración de 25µL/mL, a tiempo cero y 30 días.	95

Lista de tablas

Tabla 1-1. Estudios en productos naturales utilizando el enfoque de QbD.	10
Tabla 1-2. Estudios de evaluación del tratamiento de la ansiedad empleando extractos obtenidos de especies vegetales.....	12
Tabla 1-3. Especies vegetales reportadas en el Vademécum colombiano de plantas medicinales con actividad ansiolítica.....	12
Tabla 1-4. Uso en la medicina tradicional de algunas especies del género <i>Passiflora</i> ...125	
Tabla 2-1. Condiciones para el estudio de estabilidad frente a temperatura del extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	26
Tabla 2-2. Condiciones para el estudio de fotoestabilidad del extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	27
Tabla 2-3. Microorganismos y condiciones evaluadas para la prueba de eficacia microbiana.....	32
Tabla 2-4. Composición de los ensayos evaluados microbiológicamente.	34
Tabla 3-1. Estudios clínicos de extractos de especies de la familia Passifloraceae.	43
Tabla 3-2. Fitoterapéuticos en formulaciones líquidas a partir de extractos de especies de la familia Passifloraceae.....	45
Tabla 3-3. Definición de los objetivos de calidad asociados al perfil del producto para el desarrollo del fitoterapéutico a partir de extracto de <i>P. quadrangularis</i>	48
Tabla 3-4. Atributos críticos de calidad para el producto gotas orales de extracto de <i>P. quadrangularis</i>	50
Tabla 3-5. Concentración y cantidades relativas de los flavonoides presentes en el extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	52
Tabla 3-6. Características fisicoquímicas del extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	53
Tabla 3-7. Resultados de la evaluación de pH de cada una de los ensayos a los cuatro tiempos de muestreo estudiados.	55
Tabla 3-8. Resultados de la evaluación de la tonalidad del extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i> a tiempos 0 y 90 días.	59
Tabla 3-9. Prueba de t student evaluando los cambios de concentración de los flavonoides a 90 días.....	66
Tabla 3-10. Interpretación de los resultados del DEE respecto a las condiciones de temperatura, porcentaje de etanol y naturaleza del poliol, que favorecen la estabilidad del extracto de <i>P. quadrangularis</i>	68
Tabla 3-11. Resultados de la evaluación cuali-cuantitativa del color en el extracto de <i>P. quadrangularis</i> en el ensayo de fotoestabilidad.....	69

Tabla 3-12. Condiciones que favorecen la fotoestabilidad del extracto de <i>P. quadrangularis</i>	75
Tabla 3-13. Conteo de microorganismos evaluados en los medios de cultivo diferenciales.....	77
Tabla 3-14. Relación de medida de la densidad óptica con las UFC para cada uno de los microorganismos evaluados.....	77
Tabla 3-15. Crecimiento de los microorganismos a las condiciones propuestas.....	78
Tabla 3-16. Resultados de la prueba de eficacia microbiana para el extracto fluido de <i>P. quadrangularis</i>	80
Tabla 3-17. Resultado prueba de eficacia microbiana en los ensayos evaluados.....	80
Tabla 3-18. Condiciones favorables para la estabilidad, derivadas de los estudios realizados frente a la temperatura y la luz, para cada una de las variables respuesta estudiadas.....	83
Tabla 3-19. Formulación cuali-cuantitativa de las gotas orales a partir del extracto hidroalcohólico de <i>P. quadrangularis</i>	84
Tabla 3-20. Matriz RAMM para el análisis de la criticidad de cada uno de los componentes de la formulación gotas orales a partir de extracto de <i>P. quadrangularis</i>	87
Tabla 3-21. Matriz RAMM para el análisis de la criticidad de cada una de las etapas del proceso de fabricación de gotas orales a partir de extracto de <i>P. quadrangularis</i>	87
Tabla 3-22. Análisis de riesgo para el proceso de fabricación del producto gotas orales de <i>Passiflora quadrangularis</i>	88
Tabla 3-23. Criterios para la estimación de la gravedad de los riesgos identificados para el proceso de fabricación del producto gotas orales de <i>Passiflora quadrangularis</i>	91
Tabla 3-24. Características fisicoquímicas de la formulación de gotas de <i>P. quadrangularis</i>	95

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
<i>cm</i>	Centímetro.
°C	Grado Celsius.
<i>g</i>	Gramo.
<i>h</i>	Hora.
<i>HR</i>	Humedad relativa.
<i>L</i>	Litro
<i>m</i>	Metro.
<i>min</i>	Minuto
<i>mL</i>	Mililitro.
η	Viscosidad.
ρ	Densidad.
<i>t</i>	Tiempo.
<i>T</i>	Temperatura.
μm	Micrómetro.

Abreviaturas

Abreviatura Término

ANOVA	Análisis de varianza.
ATCC	<i>Colección americana de cultivos tipo, por sus siglas en inglés.</i>
BHI	Agar infusión cerebro corazón.
BPM	Buenas prácticas de manufactura.
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
CMA	Atributos críticos del material.
CPP	Parámetros críticos del proceso.
CQAs	Atributos críticos de calidad.
DO	Densidad óptica.
DEE	Diseño estadístico experimental.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés.
FMEA	Análisis de modos de fallas y efectos, por sus siglas en inglés.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
ICH	Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano, por sus siglas en inglés.
IR	Índice de refracción.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAT	Tecnología analítica de procesos.
PDA	Agar papa dextrosa, por sus siglas en inglés.
QbD	Calidad basada en el diseño, por sus siglas en inglés.
QTPP	Perfil de calidad del producto objetivo, por sus siglas en inglés.
RAMM	Matriz de análisis y mitigación del riesgo, por sus siglas en inglés.
TSA	Agar tripticasa de soja.
SDB	Caldo Sabouraud dextrosa, por sus siglas en inglés.
UV-VIS	Ultravioleta Visible.
UFC	Unidad formadora de colonias.
USP	Farmacopea de Estados Unidos, por sus siglas en inglés.

Introducción

Durante miles de años los seres humanos se han apoyado en la naturaleza para poder satisfacer sus necesidades básicas, entre estos recursos se pueden destacar las plantas, que aparte de ser una de las principales fuentes de alimento, también se han utilizado en la obtención de agentes terapéuticos para el tratamiento de distintas enfermedades. Los primeros escritos de la aplicación medicinal de las plantas son de alrededor de los años 2900 A.C en la cultura Mesopotámica, que presentaba un sistema de salud sofisticado para su época, entre otros, por ejemplo, poseían un compendio con alrededor de 1000 derivados de plantas con potencial farmacéutico (1). Pero no solamente en la antigüedad el uso de las plantas ha desempeñado un papel importante. En la actualidad, los medicamentos a base de productos naturales constituyen una parte fundamental del mercado farmacéutico mundial (2).

La búsqueda moderna de nuevos fármacos está enfocada a identificar y sintetizar ligandos selectivos que actúen sobre dianas específicas, esto con el fin de obtener fármacos eficaces y seguros. Sin embargo, el uso de esta metodología por la industria en los últimos años ha tenido un notable déficit en la innovación. Esto se evidencia con la disminución en el número de nuevos fármacos aprobados por la FDA, que para el año 1990 fue de 45, en contraste, con los 21 nuevos fármacos aprobados en el 2010 (3). Esto ha llevado al resurgimiento en las últimas décadas, de la investigación dirigida a la búsqueda de nuevos fármacos a partir de fuentes naturales, la que se ha dado principalmente en plantas debido a su capacidad de producir diversas y complejas estructuras químicas, en muchos casos difíciles de simular en una síntesis. Se considera que solamente un 6 % del total de especies existentes de plantas han sido investigadas farmacológicamente (2,4).

De otro lado, además del aislamiento de moléculas puras obtenidas de fuentes naturales, la investigación está dando un vuelco hacia el uso de extractos estandarizados para la elaboración de nuevos medicamentos. Se ha establecido que muchas de las enfermedades tienen un origen multifactorial; esto hace que los medicamentos diseñados para actuar sobre dianas moleculares específicas no sean tan efectivos. El uso de extractos naturales presenta una ventaja debido a que es un sistema multicomponente que permite un efecto terapéutico integral atribuido a los sinergismos que pueden presentar los diversos componentes o a la interacción frente a otras dianas moleculares. Entre tales sinergismos se encuentra la protección de una sustancia activa frente la degradación en el organismo, la modificación del transporte a través de membranas, la prevención de diferentes mecanismos de resistencia, entre otros (2).

Además del cambio en el enfoque que se está dando en la búsqueda de nuevos principios activos, el desarrollo de medicamentos también ha evolucionado en su forma de abordarse. En este sentido se hace énfasis en un enfoque pensado en la calidad del producto desde el mismo momento en que éste se diseña, conocido como QbD, por sus siglas en inglés *Quality by Design*. El enfoque de QbD puede ser definido como un acercamiento sistemático al diseño y desarrollo de un producto farmacéutico, que parte de unos objetivos previamente definidos los que permiten satisfacer las necesidades del cliente. La aplicación de esta metodología contribuye al aseguramiento de la calidad de un producto, como por ejemplo un fitoterapéutico, para que sea seguro y eficaz (5).

El presente trabajo hace parte del programa de investigación RIFRUTBIO (Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales), el que busca que las frutas tropicales tengan un futuro promisorio como fuente de sustancias con actividad sensorial, bioactivas o nutricionales para uso en diferentes industrias basadas en la bioprospección. En uno de los proyectos, se propone el desarrollo de un fitoterapéutico a partir de *Passiflora quadrangularis*, como gotas de administración oral y con la realización de esta tesis, se buscó aparte de formular el producto en mención, contribuir con la aplicación del enfoque QbD al desarrollo del producto de este tipo. De esta manera, se busca dar herramientas que sean útiles para el sector de la industria de fitoterapéuticos facilitando la implementación de tendencias de aseguramiento de la calidad que podrían ser útiles en la transformación de la cadena productiva asociada.

Sobre esta base, el presente estudio busca contribuir al desarrollo de una formulación líquida de administración oral a partir de un extracto estandarizado de hojas de *Passiflora quadrangularis* L, al cual se le ha atribuido una actividad ansiolítica, aplicando los conceptos y estrategias del enfoque QbD.

Así, este trabajo presenta un ejemplo de aplicación de la metodología de QbD en el campo del diseño de productos fitoterapéuticos, teniendo en cuenta la necesidad del sector industrial farmacéutico especialmente en Colombia, de robustecer la aplicación de estos nuevos conceptos de calidad.

Es importante tener en cuenta que este trabajo está basado en los lineamientos establecidos por la ISPE para la implementación de QbD en el desarrollo de producto-proceso en el ámbito farmacéutico (6) y tiene un alcance hasta la etapa de formulación a escala laboratorio. En este sentido la primera etapa estuvo enfocada a la determinación del perfil de calidad del producto (QTPP) y los atributos críticos de calidad (CQAs). Se continuó con la realización de los estudios de preformulación y formulación para el extracto de *P. quadrangularis*, haciendo uso de herramientas como el diseño estadístico experimental. Para aplicar los elementos de la gestión del riesgo y las estrategias de control del proceso se utilizó una proyección a la primera etapa del escalamiento, que sería la fabricación de lotes piloto, tomando como referente la planta del Laboratorio de Farmacia Industrial.

1. Aspectos Generales

1.1 Calidad desde el diseño (QbD)

Debido a la criticidad de los productos que maneja la industria farmacéutica, se le ha considerado como una de las más exigentes frente al cumplimiento de estándares de calidad. Sin embargo, con relativa frecuencia se presentan eventos en los que se ve comprometida la calidad de los productos, algunos de ellos asociados al diseño tanto del producto como de su proceso de fabricación (5).

La seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos es algo que ha estado en la mira de los organismos reguladores a través del tiempo, debido a su impacto sobre la salud pública. Un referente conocido es el dado por los Estados Unidos, en el cual su primer hecho fue la promulgación de la Ley Federal de Alimentos y Medicamentos en el año de 1906, donde se buscaba penalizar la fabricación y envío de medicamentos adulterados. Posterior a esto en el año de 1938 se añadió como un requisito para la comercialización de medicamentos la pre-aprobación por parte del ente regulador (7). A raíz de una serie de problemas y reclamos que se venían presentando constantemente sobre la calidad de los medicamentos, en el año de 1962 se realizaron enmiendas que agregaron como requisito pruebas que demostraran su eficacia y seguridad de sus productos, cambiando por completo la forma de aprobación y regulación de medicamentos (8).

En busca del mejoramiento continuo la industria farmacéutica evolucionó al enfoque tradicional de calidad por ensayo (Quality by Test), orientado a comprobar la calidad del producto mediante el cumplimiento de especificaciones, evaluados al final de la cadena de producción. Pero aún seguían presentándose problemas con la calidad de los productos, debido entre otros, a la gran variabilidad propia del escalamiento del proceso desde el

laboratorio hasta su escala industrial, lo que genera incumplimiento en las especificaciones previamente determinadas. Esto conlleva a inconvenientes como el re-trabajo del lote o incluso el rechazo del mismo, generando un costo económico y una carga regulatoria adicional, dado que se debe solicitar al ente regulador el cambio en especificaciones del producto (9). Esto demuestra que la falta de entendimiento de las bases que soportan el desarrollo del producto y del proceso dificulta la fabricación a nivel industrial y el cumplimiento de los estándares de calidad establecidos.

A partir de los acontecimientos anteriores surgieron las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), las que pretendían definir los lineamientos para asegurar los procedimientos de producción y mantener la eficacia y seguridad del producto (8). Con lo anterior, surge en el informe 32 de la OMS, en el que se estableció que las BPM "Son una parte de la función de garantía de calidad de una empresa dedicada a la elaboración de productos farmacéuticos, que asegura que dichos productos se fabriquen de manera uniforme y controlada, de acuerdo con las normas adecuadas al uso que se les pretende dar y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización" (10). Es importante resaltar que los requisitos propuestos por las BPM, al no partir de bases sólidas desde el diseño del producto y el proceso, han generado pérdidas económicas especialmente en lo que se refiere al cumplimiento las exigencias de validación (11).

El concepto de QbD fue propuesto inicialmente por la FDA en el año 2003, como parte de las iniciativas para el aseguramiento de calidad y se enfoca en construir la calidad de productos desde el momento en el que estos son diseñados y su proceso de manufactura es determinado (5). Desde la mirada de la *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), QbD puede ser definido como un acercamiento sistemático al diseño y desarrollo de un producto farmacéutico, que parte de unos objetivos previamente definidos (12). Cuya estrategia está basada en el conocimiento del producto a desarrollar y del proceso de manufactura que se va a utilizar (gestión del conocimiento), así como en la toma de decisiones en función de la gestión del riesgo de calidad (5).

Se han determinado cuatro etapas fundamentales para la realización de la gestión del riesgo: la primera de ellas consiste en valoración de los riesgos de calidad, la segunda en disponer de estrategias que permitan controlar estos riesgos, la tercera etapa está

enfocada a la difusión de la información obtenida en las etapas anteriores entre aquellas personas implicadas y por último se debe realizar una revisión permanente que permita un mejoramiento continuo (13).

Teniendo en cuenta el gran aporte que representa la implementación de QbD, principalmente frente a la garantía de calidad del producto, éste se constituyó en parte integral de las guías ICH Q8, Q9 y Q10, permitiendo que los productos y procesos diseñados cumplan las necesidades de los consumidores, los requerimientos de carácter legal y las expectativas de la empresa. Pero también QbD es una herramienta que permite el mejoramiento continuo de los procesos ya implementados (9). Varias herramientas han sido utilizadas para facilitar su aplicación en el campo farmacéutico entre las que se encuentran: el diseño estadístico experimental (DEE), matrices para la evaluación del riesgo (RAMM, FMEA) y tecnología analítica de procesos (PAT) (14).

El esquema de la Figura 1-1 sintetiza los pasos para la implementación de QbD. Se destaca el componente de mejoramiento continuo que caracteriza a QbD en el que se integra la gestión del conocimiento para mejorar los productos satisfaciendo las necesidades del cliente.

Como se puede observar en la Figura 1-1 la metodología QbD para el desarrollo de productos tiene como una primera etapa la definición del perfil del producto (*Target Product Profile-TPP*), que hace referencia a la recopilación de las necesidades del paciente, los requerimientos de los profesionales de la salud y las expectativas del fabricante. Luego se determina el perfil de calidad del producto objetivo (*Target Product Quality Profile-QTPP*). Esta etapa hace referencia a la definición de los atributos cuali-cuantitativos que permitan lograr la eficacia y seguridad deseada para el medicamento. Como ejemplo, algunos de los componentes principales son los aspectos farmacológicos, la dosis, la vía de administración y la forma de presentación, entre otros (5,15).

Figura 1-1 Principales etapas del enfoque de calidad basado en el diseño para el desarrollo de los productos y sus procesos de fabricación (5).



La segunda etapa consiste en determinar los atributos críticos de calidad (*Critical Quality Attributes* - CQAs). Estos pueden ser identificados mediante análisis de riesgos, que permite conocer cuáles son las características de calidad claves para el producto; estas propiedades ya sean físicas, químicas, microbiológicas o biológicas deben encontrarse dentro de un rango establecido para poder garantizar la calidad del mismo (9).

La siguiente etapa consiste en el desarrollo del producto planteado y de su proceso de fabricación, normalmente se realiza un plan experimental que permita correlacionar los atributos críticos de calidad con las posibles fuentes de variación asociadas a los componentes de la formulación, y así lograr establecer un prototipo de formulación. También, mediante la disponibilidad de líneas de producción, seleccionar un proceso preliminar de manufactura en el que se detallen sus operaciones unitarias y su articulación con los componentes de la formulación (12). Esta etapa deben identificarse los parámetros críticos del proceso (*Critical Process Parameter-CPP*), lo que constituye el punto de partida para la generación de espacios de diseño a partir del estudio sobre cómo las variables de entrada (características de los materiales de partida y condiciones del proceso) pueden presentar variaciones sin afectar el cumplimiento de las características de calidad del producto (9).

Por último, se establecen estrategias de control que permiten identificar de manera oportuna factores que afecten la calidad del producto, ya sea mediante controles de los materiales de partida, monitorización de los parámetros críticos del proceso o incluso realización de pruebas al producto terminado. Durante el desarrollo de esta etapa suelen integrarse herramientas como la tecnología analítica de procesos (PAT), que permite la evaluación de atributos críticos de calidad durante las etapas de manufactura y realizar ajustes de manera inmediata, para lograr obtener el perfil de calidad del producto objetivo deseado (16).

QbD ha sido utilizado en las diferentes áreas del sector farmacéutico, entre las que se incluye: el desarrollo de medicamentos, metodologías analíticas y procedimientos de limpieza (12). Como se evidencia en la Tabla 1-1, en el campo de los productos naturales encontramos algunos estudios enfocados al desarrollo de metodologías analíticas y de formulaciones de producto. En el campo de fitoterapéuticos se destaca el trabajo realizado por Yan (2014), acerca del proceso de precipitación de etanol para la purificación de fitoterapéuticos, mostrando como principales dificultades la variación en la calidad de las materias primas y la dificultad para definir los rangos aceptables en los atributos críticos de calidad (17). Por esta razón, es importante continuar reportando casos de estudio sobre como implementar QbD al desarrollo de productos a partir de fuentes naturales (18).

El diseño de un medicamento a partir de un extracto de origen vegetal representa un reto a la hora de garantizar su seguridad y eficacia. En el caso particular de esta investigación, el desarrollo de un fitoterapéutico a partir de *P. quadrangularis* L supone una alta variabilidad en su composición, debido a factores asociados al material vegetal (forma de cultivo, almacenamiento, método de recolección, lugar de recolección y época de recolección, entre otros), proceso de manufactura, atributos de los excipientes, técnicas para el control de calidad, entre otros (19). Esta alta variabilidad dificulta el cumplimiento de estándares y la reproducibilidad entre lotes a escala industrial, lo que puede llegar a comprometer la eficacia y seguridad del producto. Se desea aportar en la implementación de QbD como un enfoque que contribuya a garantizar la calidad del fitoterapéutico, generando una formulación cualicuantitativa y un proceso robusto (a escala laboratorio) para su fabricación.

Tabla 1-1. Estudios en productos naturales utilizando el enfoque de QbD.

Autor	Año	Especie	Tema
Yan B. y col (17).	2014	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Estudio del proceso precipitación de etanol para la purificación de <i>S. miltiorrhiza</i> . Se establecieron estrategias de control para el proceso de precipitación de etanol, manteniendo los atributos de calidad del material vegetal.
Shereen A. y col (20).	2019	<i>Curcuma longa</i> (Curcumina)	Desarrollo de formulaciones tipo nanoemulsiones, teniendo como objetivo mejorar el suministro de curcumina a la piel para el tratamiento de psoriasis y cáncer de piel.
Carrizo C. y col (21).	2019	<i>Quercus suber</i> L.	Producción de emulsiones de Pickering, utilizando partículas sólidas de <i>Quercus suber</i> como biomaterial para estabilizarlas.
Deepika T. y col (22).	2016	Antocianinas	Desarrollo de una metodología analítica por RP-HPLC para evaluar la estabilidad de la cianidina-3-O-glucósido.
Radhika S y col (23).	2015	<i>Tamarindus indica</i> L.	Extracción de pectina de pulpa de <i>Tamarindus indica</i> L. empleando descriptores de pureza como indicador.

1.2 Tratamientos para la ansiedad

El concepto de salud de la OMS, sugiere que es “un estado completo de bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades” (24). En este contexto, podemos ver la importancia de la salud mental ya que esta es determinante en la capacidad de interactuar con el medio para lograr su bienestar y el de la comunidad. Según la OMS, la ansiedad se encuentra entre los trastornos psiquiátricos de mayor prevalencia, presenta elevada relevancia clínica y de salud pública debido a los altos costos generados por la incapacidad y disminución de la productividad (25). A nivel mundial aproximadamente el 10 % de las personas desarrollan síntomas de ansiedad y el 30 % sufren de insomnio.

El Ministerio de Salud y Protección Social, siguiendo principios como “no hay salud sin salud mental”, determinó que los problemas y trastornos mentales son considerados problemas de salud pública en Colombia, dado que son la segunda causa de enfermedad,

superada solamente por la hipertensión arterial (26). La Encuesta Nacional de Salud Mental 2015, que busca la generación de información sobre esta temática en la población colombiana, determinó que la ansiedad es una de las principales patologías que afecta la salud mental de adultos y jóvenes, después del consumo de alcohol, consecuencias psicológicas por exposición a eventos traumáticos y la depresión. Sobre esta base, el país definió la intervención en salud mental como una “megameta” para los próximos años, debido a que no solamente tiene un impacto importante en la salud de la población sino también notables costos en el ausentismo laboral y en la disminución de la productividad (26).

La década de 1950 fue conocida como “la revolución de la psicofarmacología” debido a la introducción de los tres principales grupos farmacológicos (antidepresivos, antipsicóticos y ansiolíticos) para el tratamiento de trastornos mentales (27). Para el manejo de la ansiedad antes de la década de 1950 era muy limitado el arsenal farmacológico, siendo los más utilizados los alcaloides de opio, el alcohol, los bromuros y principalmente los barbitúricos. Actualmente las benzodiazepinas (agonistas de los receptores GABA_a) y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina son los fármacos de elección para el tratamiento de este trastorno. Sin embargo, el uso crónico de benzodiazepinas puede ocasionar tolerancia, lo que disminuye la efectividad del tratamiento y causa dependencia y somnolencia, entre otros (28). Por eso la búsqueda de nuevos compuestos ansiolíticos con menor potencial de producir efectos adversos está siendo estudiada, encontrando una de las posibles soluciones, la obtención de compuestos o extractos a partir fuentes naturales.

Condiciones psiquiátricas como la ansiedad y trastornos del sueño han sido tratados con medicinas botánicas desde la antigüedad (29). Las sociedades tradicionales africanas han utilizado las plantas para promover su salud desde hace aproximadamente 4000 años, mucho antes de la llegada de las prácticas médicas convencionales (30). En publicaciones científicas se encuentran estudios disponibles de extractos vegetales con actividad ansiolítica; a manera de resumen en la Tabla 1-2 se menciona algunos de los estudios clínicos por vía de administración oral.

Tabla 1-2. Estudios de evaluación del tratamiento de la ansiedad empleando extractos obtenidos de especies vegetales.

Especie	Tipo de extracto	Órgano de la planta	Región	Dosis (mg/Kg)	Referencia
<i>Dichrocephala integrifolia</i>	Extracto acuoso	Hojas	Camerún	50	(30)
<i>Brickellia cavanillesii</i>	Extracto metanólico	Partes aéreas	México	100	(31)
<i>Calotropis gigantea</i>	Extracto etanólico	Hojas	Bangladesh	400	(32)
<i>Carica papaya</i>	Extracto hidroalcohólico	Frutos	Etiopía	100	(33)
<i>Telfairia occidentalis</i>	Extracto hidroalcohólico	Hojas	Nigeria	50-100	(29)
<i>Passiflora foetida</i>	Extracto hidroalcohólico	Hojas	Brasil	200	(34)
<i>Montanoa tomentosa</i>	Extracto acuoso	Hojas	México	12	(35)

Adicionalmente en la Tabla 1-3, se presentan diferentes plantas medicinales que se encuentran reportadas con actividad ansiolítica en el Vademécum colombiano de plantas medicinales. Entre estas, se destaca *P. incarnata* perteneciente a la familia Passifloraceae.

Colombia es considerado el país que posee la mayor diversidad de especies de la familia Passifloraceae en el mundo, con registro de aproximadamente 167 especies, seguido de países como Brasil, Perú y Venezuela. Se estima que de dicho número de especies, el 50 % tienen un potencial económico y comercial (36). De acuerdo a la clasificación para frutas tropicales dada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el grupo que incluye frutos de especies de *Passiflora* ocupa el segundo puesto debido a su importancia económica, detrás de frutas como la piña, la papaya, el aguacate y el mango (37).

Tabla 1-3. Especies vegetales reportadas en el Vademécum colombiano de plantas medicinales con actividad ansiolítica.

Especie	Nombre común	Tipo de extracto	Órgano de la planta	Dosis (mg/Kg)
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	Gotu Kola, hidrocotile.	Extracto metanólico	Partes aéreas	Extracto fluido (1:1): 10-30 gotas. Tintura (1:10): 50 gotas cada 8 h.
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hierba de San Juan.	Extracto hidroalcohólico	Sumidades floridas	Infusión: 2-4 g de la planta en 240 mL de agua.
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Maracuyá, flor de la pasión.	Extracto metanólico	Hojas	Infusión: 2.5 g de material vegetal al día Tintura 1:8 en alcohol de 45 %: 0.5-2 mL al día.
<i>Lippia alba</i> (Mill)	Falsa melissa, pronto alivio.	Extracto hidroalcohólico	Partes aéreas	Decocción: 30-50 g de las partes aéreas en un litro de agua. Infusión: 30 g de las partes aéreas en medio litro de agua
<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil.	Extracto acuoso	Tallos y hojas	Extracto (1:1 en alcohol de 45 %): 2-4 mL. Tintura (1:5 en alcohol de 45 %) 2-6 mL.
<i>Cecropia mutisiana</i> Mildbr	Yarumo.	Extracto etanólico	Hojas	Tintura (1:10 en alcohol): 1-2 mL, una a tres veces al día.

1.3 *Passiflora quadrangularis* Linn

La familia Passifloraceae cuenta con alrededor de 18 géneros diferentes y con un aproximado de 630 especies, dentro de las que se destaca el género *Passiflora* que posee más del 80 % del total y con esto, la mayor diversidad (38). Se estima que cuenta con un total de 520 especies distribuidas en las regiones templadas y tropicales de América Latina, y también en zonas de Asia, Europa y África tropical, aunque con menor frecuencia. Se dice que tiene la mayor importancia económica entre los géneros de la familia Passifloraceae ya que algunas especies son cultivadas para el consumo masivo de sus frutos o para el uso ornamental de sus flores (39). Las plantas de este género crecen generalmente en climas tropicales y subtropicales, a alturas inferiores a los 2500 msnm, son arbustos o plantas herbáceas generalmente enredaderas y raramente arborescentes, pueden ser bisexuales o unisexuales y tienen una estructura floral diferencial (40).

Es importante resaltar que Colombia es el país donde se encuentra la mayor riqueza de especies pertenecientes a la familia Passifloraceae, tanto en formas cultivadas como silvestres, esto debido a la diversidad en hábitats, climas y fauna asociada. En el país se dispone de 154 especies inventariadas de las cuales 48 son endémicas, 28 se encuentran amenazadas y cinco ya se consideran extintas (38).

El uso de especies pertenecientes al género *Passiflora* tiene miles de años de antigüedad, en América del norte se han encontrado semillas de este género mediante expediciones arqueológicas, lo que demuestra su uso desde la prehistoria. Los primeros viajeros europeos observaron el consumo de frutos por parte de los indios pertenecientes a las comunidades latinoamericanas nativas y los adaptaron a sus costumbres debido principalmente a su sabor y valor nutricional (39).

Muchas de estas plantas han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de varios países. A manera de ejemplo, en la Tabla 1-4 se incluyen algunos de estos usos, destacándose su aplicación en el tratamiento de enfermedades tales como la ansiedad, la hipertensión, y en problemas del sueño, por lo que resulta un interesante material de estudio con el fin de lograr el desarrollo de productos fitoterapéuticos.

Tabla 1-4. Uso en la medicina tradicional de algunas especies del género *Passiflora*.

Especie	Uso Tradicional	Región	Referencia
<i>Passiflora alata</i>	Ansiolítico, sedante, diurético y analgésico.	Brasil.	(41)
<i>Passiflora bogotensis</i>	Propiedades sedantes y tranquilizantes.	Región Andina-Colombia.	(39)
<i>Passiflora caerulea</i>	Sedante y ansiolítico antiespasmódico, diurético, agentes antimicrobianos.	Brasil, introducida en Inglaterra, Uruguay, Argentina.	(42)
<i>Passiflora capsularis</i>	Emenagogo.	Latinoamérica.	(43)
<i>Passiflora edulis</i>	Sedante, diurético, antihelmíntico, antidiarreico, también en el tratamiento de la hipertensión, síntomas de la menopausia.	América del Sur.	(44)
<i>Passiflora foetida</i>	Tratamiento de la histeria y el insomnio, emético, antiinflamatorio.	Nigeria, Brasil.	(34)
<i>Passiflora quadrangularis</i> Linn.	Sedante y analgésico.	Caribe Latinoamérica.	(45)
<i>Passiflora incarnata</i>	Tratamiento de la epilepsia, para el insomnio, la ansiedad, analgésico, antiespasmódico, el asma.	Norteamérica, Europa, Brasil.	(46)

Una de las especies interesantes de este género es *P. quadrangularis*, conocida popularmente como badea, maracuyá gigante o tumbo gigante (39). Como se observa en la Figura 1-2, es una planta trepadora que se extiende de 10 a 20 m, sus hojas son lanceoladas de color verde claro de entre 10 y 25 cm de largo y 7 a 15 cm de ancho. Su fruto es característico dado que es el más grande de las todas las *Passifloras*, con un tamaño de 20 a 30 cm de largo y de 12 cm aproximadamente de diámetro. La pulpa presenta un aroma agradable y refrescante, utilizada localmente para la preparación de diferentes bebidas. Presenta flores solitarias de 8 a 12 cm y pétalos color violáceo, blanco rosado por el lado externo (47). Esta especie es utilizada en medicina tradicional para la preparación de tranquilizantes (39).

Figura 1-2. Fotografía de las hojas, frutos y flor de *Passiflora quadrangularis* L. (27).



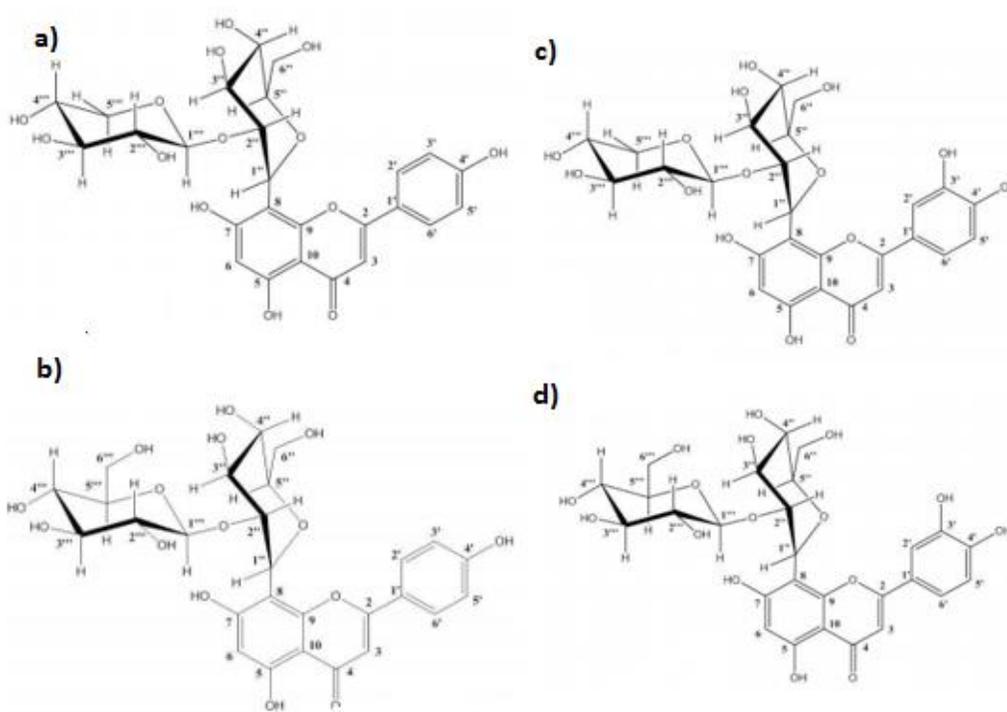
Aunque a la fecha se han realizado pocos estudios fitoquímicos para la identificación de los compuestos presentes en esta especie, principalmente se han reportado flavonoides y saponinas. Así, en un estudio químico de los frutos de *P. quadrangularis* fueron encontrados cuatro monoterpenoides oxigenados y sus respectivos compuestos glicoconjugados, importantes en la generación de compuestos volátiles y por lo tanto considerados como los precursores del aroma característico de las bebidas preparadas con frutos de *Passiflora* (48).

Desde hace tiempo se había demostrado la actividad sedante de *P. incarnata* y sus propiedades neurofarmacológicas habían sido atribuidas principalmente a flavonoides glicosilados de apigenina y luteolina (49). Basados en esto y en la similitud taxonómica, se realizó un estudio que evidencia la actividad sedante de un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* después de la administración oral en ratones; se realizó un fraccionamiento bioguiado en el cual se identificaron cuatro componentes responsables de la actividad vitexina-2-O-xilósido, vitexina-2-O-glucósido, orientin-2-O-xilósido y orientin-2-O-glucósido (Figura 1-3), siendo vitexina-2-O-xilósido el constituyente principal responsable de la actividad sedante del extracto (49). Las estructuras de los flavonoides que presentaban la actividad ansiolítica incluían las dos agliconas: apigenina y luteolina, como en los estudios realizados para *P. incarnata*.

El mecanismo por el cual los flavonoides presentan una actividad ansiolítica no está totalmente claro, pero se sabe que existe una relación directa entre los niveles de

apigenina y el efecto sedante (50). Sobre esta base, se investigó la actividad administrando la apigenina sola en cantidades similares a las encontradas en los extractos de *P. quadrangularis* y en este caso no se evidenció actividad ansiolítica, lo que indica que el efecto del extracto no sólo depende de la apigenina sino también de otros compuestos presentes en él (51).

Figura 1-3. Componentes responsables de la actividad sedante de *Passiflora quadrangularis* A) Vitexina-2-O-xilósido, B) Vitexina-2-O-glucósido C) Orientin-2-O-xilósido D) Orientin-2-O-glucósido (49).



De otro lado, el mecanismo de acción se ha relacionado con la modulación de los receptores GABA_a, que es el mismo mecanismo de acción de las benzodiazepinas; lo que fue evidenciado mediante el bloqueo del efecto ansiolítico mediante la administración de un antagonista de los receptores GABA (flumazil) (49). Adicionalmente, se evaluó esta actividad mediante experimentos *in vitro* basados en el posible efecto que tendrían la

apigenina y la luteolina sobre las subunidades α_1 , β_2 y γ_{2s} de los receptores GABA_a que son reportadas en la literatura como las involucradas en la actividad sedante. Estas agliconas por sí solas no presentaron ninguna actividad, aunque al adicionar un modulador de GABA_a (diazepam) a dichas agliconas, se logra un sinergismo en la actividad. Que la actividad ansiolítica del extracto se demostrara “*in vivo*” y no “*in vitro*” puede ser explicado de tres formas: la primera consiste en que los flavonoides pueden actuar como un segundo modulador sobre otros compuestos presentes en el extracto y que actúan sobre los receptores GABA_a. En segundo lugar, mediante el metabolismo se podrían producir los compuestos que realmente son responsables de la actividad y por último, podría existir un sinergismo entre los diferentes compuestos del extracto que permite lograr actividad (51).

De acuerdo con lo anterior, la actividad ansiolítica del extracto de *P. quadrangularis* no puede ser atribuida a un sólo componente, por lo que en el diseño de un fitoterapéutico eficaz es recomendable el uso de un extracto estandarizado y no de compuestos aislados.

Específicamente con *P. quadrangularis*, en la literatura científica, se encuentran los siguientes estudios desarrollados en trabajos previos dentro del grupo de investigación de Tecnología de Productos Naturales-TECPRONA:

- Desarrollo y validación de una metodología analítica para la caracterización del extracto de *P. quadrangularis* basado en la cuantificación de flavonoides totales y vitexina; se incluyen ensayos preliminares para la evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de *P. quadrangularis* en condiciones de estrés, como hidrólisis ácida, hidrólisis básica, hidrólisis a pH neutro y oxidación (40).
- Estudio para la evaluación de la solubilidad de flavonoides totales presentes en un extracto hidro-alcohólico de *P. quadrangularis* en algunos solventes de uso farmacéutico como agua, etanol 98 %, glicerina USP y propilenglicol (47).
- Evaluación de la compatibilidad del extracto hidro-alcohólico de *P. quadrangularis* frente a algunos excipientes usados comúnmente para formulaciones líquidas, tales como polietilenglicol 600, ácido cítrico, sorbitol, polisorbato 40 y metil celulosa (52).

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al desarrollo de una formulación líquida oral para un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis* L. aplicando los conceptos del enfoque de calidad basada en el diseño (QbD).

Objetivos específicos

- Establecer el perfil del producto para una formulación líquida oral de *Passiflora quadrangularis*, a partir de las necesidades del cliente, tanto interno como externo y los requerimientos regulatorios que debe cumplir el producto.
- Realizar actividades de preformulación y formulación que satisfagan las expectativas del perfil del producto, teniendo en cuenta el enfoque basado en riesgo.

2. Metodología

Se desarrolló una formulación líquida oral teniendo como ingrediente activo un extracto de *P. quadrangularis*, para lo cual se aplicó el enfoque QbD. Inicialmente se recopiló información mediante diferentes mecanismos (bibliográficos, entrevistas, entre otros), la que permitió definir el perfil de calidad y establecer los atributos críticos para el producto. Posteriormente, se realizaron estudios de preformulación que suministraron información sobre la estabilidad frente a la temperatura, la fotoestabilidad y el comportamiento microbiano del extracto, cuyo análisis estadístico permitió realizar una primera aproximación a la formulación. En una siguiente etapa, se identificaron los aspectos críticos de los materiales de partida y del proceso mediante análisis del riesgo (Matriz RAMM - Risk Analysis and Mitigation Matrix y matriz FMEA - Failure Mode Analysis and Effects). Se preparó la formulación a escala laboratorio en las condiciones establecidas para el proceso y se evaluó su estabilidad a condiciones aceleradas. A partir de los resultados de los análisis de riesgo y la experiencia ganada en la preparación del producto, se propusieron las estrategias de control a ser consideradas para ser implementadas en una futura transferencia de tecnología. A continuación, se detalla la metodología de cada una de estas etapas.

2.1 Materiales

Los solventes utilizados para el proceso de extracción fueron etanol (grado analítico, lote 5678, Ciacomeq S.A.S, Colombia) y agua destilada obtenida a través del equipo Direct-Q System (Millipore®).

Los solventes usados para la cuantificación mediante CLAE (Cromatografía líquida de alta eficiencia) fueron: acetonitrilo y metanol (grado CLAE, lote 4BA3E – 5wr567

respectivamente, J.T. Baker, US®), agua grado CLAE obtenida a través del equipo Direct-Q System (Millipore®) y ácido acético glacial (grado analítico, Scharlau®).

Para los estudios de estabilidad se utilizaron: etanol (grado analítico, lote 5678, Ciacomeq S.A.S, Colombia), sorbitol (grado analítico, lote 457, Ciacomeq S.A.S, Colombia) y glicerina (grado analítico, lote 389, Ciacomeq S.A.S, Colombia).

En el estudio microbiológico se utilizaron los medios diferenciales agar digerido de caseína y soja, agar Sabouraud dextrosa deshidratado, agar rojo cristal violeta, agar Sabouraud oxitetraciclina, agar plate count y agar infusión cerebro corazón (BHI), todos marca Scharlau®.

2.2 Definición del perfil del producto (TPP)

Para la definición del perfil del producto se realizó la búsqueda de información de las necesidades del paciente, requerimientos de los profesionales de la salud y expectativas del fabricante que deben ser tenidos en cuenta para el desarrollo de un fitoterapéutico, en este caso a partir de un extracto de *P. quadrangularis*, y así determinar los atributos cuali-cuantitativos que tendrían impacto sobre su calidad, seguridad y eficacia. Para esto, se llevaron a cabo entrevistas a un profesional de la salud en el campo de la neurología y a un profesional en el uso de medicinas alternativas. Las preguntas profundizaron en los requerimientos tanto del producto fitoterapéutico para el tratamiento de la ansiedad y problemas del sueño, como de la persona que lo prescribe, así como indagar, desde su perspectiva, acerca de las expectativas del paciente.

Por otra parte, se tuvo en cuenta la literatura científica disponible acerca de la dosis que podría emplearse para el extracto. Se consultaron las bases de datos Scopus y PubMed, empleando como palabras clave: *Passiflora*, “*Passiflora* and clinic studies”, “*Passiflora* and Pharmacokinetics”, “*Passiflora* and dose”, encontrando 52 artículos relacionados con el tema; de estos se seleccionaron seis, que contenían información asociada con el tipo de

extracto a partir del género *Passiflora*, tipo de estudio clínico realizado (condiciones y resultados) y dosis empleada.

Otros aspectos considerados fueron las características fisicoquímicas y farmacotécnicas del extracto de partida, así como las líneas de producción disponibles en el Laboratorio de Farmacia Industrial del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, para la fabricación de formulaciones líquidas orales a partir de extractos.

Adicionalmente, se consideraron los aspectos regulatorios que deben cumplirse a nivel nacional para la comercialización de fitoterapéuticos (Decreto 1156 de 2018), requerimientos legales para la fabricación e información acerca de los productos fitoterapéuticos con actividad ansiolítica a partir de especies de la familia Passifloraceae comercializados en Colombia, consultada en la base de datos del INVIMA en el año 2019.

A partir de esta revisión se definieron el perfil del producto, el perfil de calidad del producto y los atributos críticos de calidad. Así, el perfil de calidad del producto se construyó a partir de las necesidades evidenciadas en el perfil del producto. Estas necesidades se tradujeron en atributos cuali-cuantitativos que orientarían las etapas siguientes del desarrollo del fitoterapéutico. Aquellos atributos, que podrían tener impacto en los materiales de partida y en el proceso, se les evaluó el nivel de criticidad asignándoles una puntuación (que a su vez se relaciona con un color), de 1 (verde), 3 (amarillo) o 9 (rojo), teniendo en cuenta la importancia de cada uno de ellos en la calidad, seguridad y eficacia del producto.

2.3 Preformulación y formulación

Los estudios de preformulación fueron diseñados para dar cumplimiento a los atributos definidos en el perfil de calidad del producto, propuesto en el apartado anterior.

Se tomó como punto de partida el extracto fluido de *P. quadrangularis*, obtenido siguiendo la metodología planteada por Echeverry (53). Debido a que no se encontraron reportes en la literatura sobre el comportamiento de este extracto, la primera parte se enfocó en la caracterización del extracto fluido en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas: pH, índice de refracción, densidad, viscosidad y cuantificación de marcadores.

2.3.1 Caracterización del extracto fluido de *P. quadrangularis*

- **Recolección del material vegetal**

Las hojas de *P. quadrangularis* fueron colectadas en Rivera (Longitud: 75° 13" 94.938; Latitud: 2° 45" 41.899), departamento del Huila, Colombia. Un espécimen completo de la planta fue identificado y clasificado por el Herbario Nacional de Colombia–Universidad Nacional de Colombia y una muestra quedó depositada en sus archivos como referencia (N.º Col. 589241).

- **Extracción**

Para la obtención del extracto fluido (con un contenido de sólidos totales de máximo 10% P/P), se pesaron 8 kg de hojas de *P. quadrangularis* previamente seleccionadas, las que fueron puestas en un horno de secado con aire circulante durante 72 h a una temperatura de 50 ± 2 °C. El material seco fue pulverizado en un molino de aspas utilizando una malla No 2 y luego separado en una batería de tamices (tamices de prueba estándar de EE. UU No 20, 40, 60 y 80 marca VWR Científica Productos®), durante 10 min por cada 100 g de material. El material de cada tamiz fue recolectado por separado y aquel material depositado en los tamices 40 y 60 fue mezclado en una proporción 70:30, respectivamente.

La etapa de extracción fue realizada mediante percolación, para lo que se tomaron 50 g de material vegetal previamente humectado con 50 mL de EtOH:H₂O (1:1). Dicho material fue transferido a un percolador, al que se le adicionaron 375 mL de la solución de EtOH:H₂O (1:1), se protegió de la luz y luego de 24 h se dejó gotear lentamente con una velocidad aproximada de 100 gotas/min; se procedió a la adición de 375 mL más de la misma solución y después de 24 h, nuevamente se dejó gotear a las condiciones anteriores. Por último, el extracto fue mezclado y almacenado en frasco ámbar a 4 °C.

• Caracterización

La determinación del contenido de flavonoides totales contenidos en el extracto se realizó de acuerdo con la metodología de CLAE, reportada por Medina (40). Los análisis fueron realizados en un equipo de cromatografía líquida Shimadzu® con desgasificador DGU-20, dos bombas binarias LC-6AD, sistema detector de arreglo de diodos SPD M20-A, horno para columna CTO-20A, automuestreador SIL-20A HT y módulo de comunicación CMB-20A. El software utilizado para el procesamiento de datos fue *LabSolutions LC*.

Como fase móvil se trabajó un gradiente de elución, donde la fase móvil A correspondió a H₂O:ACN: CH₃COOH (90:10:1) y la fase móvil B fue ACN:H₂O:CH₃COOH (90:10:1), con flujo de 1.0 mL/min. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm i.d.; 5 µm), con una temperatura del horno de 30 ± 3 °C y detección a 340 nm. Se inyectaron 10 µL del extracto fluido disuelto en MeOH:H₂O (1:1) en una concentración de 1 mg/mL, previamente filtrado a través de membrana PVDA (0.22 µm), marca Millipore®. La cuantificación de flavonoides totales fue realizada por el método del estándar externo utilizando vitexina como compuesto de referencia (Fluka®, 96 %).

El pH del extracto fue determinado en un potenciómetro marca CONSORT® a una temperatura de 18 ± 2 °C. El potenciómetro fue previamente calibrado.

Para la medición del índice de refracción se utilizó un refractómetro digital Mettler Toledo 30PX.

La determinación de la densidad fue realizada por el método del picnómetro para el cual se usó la Ecuación 2-1. Se utilizó agua destilada a 18 °C como sustancia de referencia.

$$\rho_{extracto} = \frac{m_{p+e} - m_p}{m_{p+w} - m_p} * \rho_w \quad \text{Ecuación 2-1}$$

Donde:

$\rho_{extracto}$: densidad del extracto.

m_{p+e} : masa del picnómetro con extracto.

m_{p+w} : masa del picnómetro con agua.

m_p : masa del picnómetro vacío.

ρ_w : densidad del agua a 18 °C.

Para la medición de la viscosidad se empleó un viscosímetro de Ostwald sumergido en un baño termostataado marca Lauda® a 25 °C. Para su determinación se empleó la ecuación 2-2.

$$\eta_{extracto} = \eta_w * \frac{\rho_{extracto} * t'}{\rho_w * t} \quad \text{Ecuación 2-2}$$

Donde:

$\eta_{extracto}$: viscosidad del extracto.

η_w : viscosidad del agua.

$\rho_{extracto}$: densidad del extracto.

ρ_w : densidad del agua.

t' : tiempo en fluir el extracto.

t : tiempo en fluir el agua.

Para pH, viscosidad, densidad e índice de refracción se hicieron cinco mediciones y el resultado se presentó como la media de las observaciones \pm el error estándar.

2.3.2 Estudio de estabilidad del extracto de *P. quadrangularis*.

2.3.2.1 Influencia de la temperatura, la concentración de etanol y el tipo de poliol.

Para la evaluación de la estabilidad del extracto se utilizó un diseño estadístico experimental (DEE) factorial completo 2^3 , en el que se estudiaron tres factores a dos niveles. Los factores fueron la temperatura de almacenamiento, la concentración de etanol en la formulación y el efecto de dos polioles. En la Tabla 2-1 se describen las condiciones

que se utilizaron en cada uno de los experimentos realizados y la nomenclatura empleada para identificarlos.

Tabla 2-1. Condiciones para el estudio de estabilidad frente a la temperatura del extracto fluido de *P. quadrangularis*.

Ensayo	Temperatura	[Etanol]	Poliol
A50G	40°C	50%	Glicerina
A50S	40°C	50%	Sorbitol
A30G	40°C	30%	Glicerina
A30S	40°C	30%	Sorbitol
B50G	30°C	50%	Glicerina
B50S	30°C	50%	Sorbitol
B30G	30°C	30%	Glicerina
B30S	30°C	30%	Sorbitol

A30G: 40°C, 30% EtOH y Glicerina **A50G:** 40°C, 50% EtOH y Glicerina **A30S:** 40°C, 30% EtOH y Sorbitol
A50S: 40°C, 50% EtOH y Sorbitol **B30G:** 30°C, 30% EtOH y Glicerina **B50G:** 30°C, 50% EtOH y Glicerina
B30S: 30°C, 30% EtOH y Sorbitol **B50S:** 30°C, 50% EtOH y Sorbitol.

Con el fin de observar los cambios en función del tiempo se escogieron cuatro tiempos de muestreo para la evaluación de cada una de las variables respuesta; a tiempo cero, 15 días, 1 mes y 3 meses.

Para la preparación de las muestras, se tomó como punto de partida el extracto fluido y la concentración de etanol fue ajustada con agua destilada según lo previsto para cada uno de los ensayos propuestos en la Tabla 2-1. Se adicionó un 5 % p/p del poliol correspondiente, con agitación magnética durante 10 min. Las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio tipo I de 20 mL, cerradas con tapón de caucho y agrafe y colocadas en la cámara de estabilidad (cámara climática Memmert®) a la temperatura correspondiente. Para el almacenamiento de las muestras se utilizaron condiciones aceleradas (40 °C ± 2 °C/75 % HR ± 5 % HR) y condiciones de envejecimiento natural (30 °C ± 2 °C/65 % HR ± 5 % HR). Todos los experimentos fueron preparados por triplicado.

2.3.2.2 Influencia de la luz, la concentración de etanol y el tipo de poliol

Para la evaluación de la fotoestabilidad del extracto, de manera similar al estudio anterior, se empleó un DEE factorial completo 2^3 , en el que se cambió el factor temperatura de almacenamiento por exposición a la luz, manteniendo constante los otros dos factores (concentración de etanol y tipo de poliol). En la Tabla 2-2 se describen las condiciones que se utilizaron en cada uno de los experimentos y la nomenclatura empleada para identificar cada ensayo. Las variables respuesta se evaluaron a diferentes tiempos: cero, 15 días, 1 mes y 3 meses.

Tabla 2-2. Condiciones para el estudio de fotoestabilidad del extracto fluido de *P. quadrangularis*.

Ensayo	Luz	[Etanol]	Poliol
C50G	Presencia	50%	Glicerina
C50S	Presencia	50%	Sorbitol
C30G	Presencia	30%	Glicerina
C30S	Presencia	30%	Sorbitol
D50G	Ausencia	50%	Glicerina
D50S	Ausencia	50%	Sorbitol
D30G	Ausencia	30%	Glicerina
D30S	Ausencia	30%	Sorbitol

C30G: Luz, 30% EtOH y Glicerina; **C50G:** Luz, 50% EtOH y Glicerina; **C30S:** Luz, 30% EtOH y Sorbitol; **C50S:** Luz, 50% EtOH y Sorbitol; **D30G:** No luz, 30% EtOH y Glicerina; **D50G:** No luz, 50% EtOH y Glicerina; **D30S:** No luz, 30% EtOH y Sorbitol; **D50S:** No luz, 50% EtOH y Sorbitol.

La preparación de las muestras se realizó de manera similar a las del estudio anterior, con la diferencia de que para aquellas muestras expuestas a la condición ausencia de luz el envase fue recubierto totalmente con papel aluminio. Ambos tipos de muestras, recubiertas o no, se colocaron en una cámara de fotoestabilidad. En la Figura 2-1, se muestra el prototipo de la cámara empleada en este estudio y desarrollada en el grupo de investigación de Sistemas de Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas, que cuenta con una fuente de luz compuesta por una lámpara halógena y una fluorescente; con emisión de radiación a unas longitudes de onda entre 300 nm – 900 nm, con poca

capacidad de emitir en la zona del infrarrojo y con valor de exposición de 118,2 Klux*h. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Figura 2-1. Cámara de fotoestabilidad. Tomado de Herrera 2016 (54).



2.3.2.3 Variables respuesta evaluadas

Para los dos DEE se evaluaron las propiedades pH, color, cuantificación de precipitado y concentración de los marcadores farmacológicos, como indicadores de que el extracto mantiene sus características de calidad.

✓ **Medición de pH**

La evaluación del pH se realizó por triplicado, según se describió anteriormente para la determinación del pH del extracto, en un potenciómetro (CONSORT®).

✓ Evaluación del color

Los cambios que las muestras pudieran presentar frente a su color fueron evaluados mediante registro fotográfico. Posterior a la toma de fotografías cada una de las muestras fue clasificada en una escala semicuantitativa establecida arbitrariamente a partir de la comparación entre ellas. La escala se estableció en función de la opacidad evaluada, en un rango de 1 a 10, donde 1 eran las muestras más claras y 10 las más opacas.

✓ Cuantificación de marcadores farmacológicos

La cuantificación de los flavonoides se realizó mediante el método de estándar externo utilizando vitexina como compuesto de referencia y haciendo uso de la Ecuación 2-3 previamente descrita en la validación de la metodología analítica por Medina (40).

$$y = 16856x + 535.1 \quad \text{Ecuación 2-3}$$

Donde “y” corresponde al área de las señales cromatográficas de cada uno de los flavonoides: orientina 2”-O-glucósido, orientina 2”-O-xilósido, orientina, vitexina 2”-O-glucósido, vitexina 2”-O-xilósido y vitexina. Para la cuantificación de flavonoides totales se utilizó “y” como la sumatoria de las señales cromatográficas mencionadas anteriormente. Adicionalmente, se utilizó la Ecuación 2-4 para expresar la cantidad relativa de cada uno de los flavonoides evaluados.

$$Cantidad\ relativa_x = \frac{\text{Área de señal cromatográfica } x}{\text{Área total de las señales cromatográficas}} * 100 \quad \text{Ecuación 2-4}$$

✓ Cuantificación del precipitado

La determinación del material precipitado se realizó por filtración al vacío por membrana de 0,45 µm (Millipore®). Se pesó de manera preliminar la membrana limpia y se filtraron 5 mL de la muestra a evaluar. Luego, la membrana fue puesta a secar hasta peso constante en una estufa a 25 °C. Este ensayo no fue realizado con las muestras de fotoestabilidad, debido a que se manejaron volúmenes menores que no permitieron la cuantificación del

precipitado, pero visualmente se detectó precipitación principalmente en las muestras expuestas a la luz.

2.3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados derivados del DEE (ANOVA con un nivel de confianza del 95 %, efectos principales e interacciones de dos factores) fue realizado mediante el software Statgraphics XVII ®, con el que se analizaron los cambios en cada una de las variables respuesta (cuantificación de flavonoides, cantidad de precipitado, cambios de color, cambios de pH) entre tiempo cero y 3 meses.

2.4 Análisis microbiológico extracto de *P. quadrangularis*

Para el desarrollo de la formulación a partir del extracto de *P. quadrangularis* es necesario conocer cuál es su comportamiento microbiano y sobre esta base, definir el sistema preservante más adecuado para el producto. Este ensayo fue realizado en dos etapas: la primera, un ensayo preliminar en medios de cultivo diferenciales y la segunda, la prueba de eficacia antimicrobiana reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos (55).

2.4.1 Ensayo en medios de cultivo diferenciales

Para este ensayo se evaluó el extracto fluido de *P. quadrangularis* y los tres productos fitoterapéuticos (soluciones orales) que se encuentran actualmente disponibles en el mercado colombiano.

Para la cuantificación de microorganismos se utilizó el método de recuento en fondo, en los medios diferenciales agar rojo cristal violeta, agar Sabouraud oxitetraciclina, agar plate count y agar infusión cerebro corazón. Para el ensayo se tomó 1 mL del producto a evaluar, se realizaron tres diluciones en serie de 1:10 con agua peptonada al 0,1. Luego, se tomó 1 mL de cada una de las diluciones, se colocaron en el fondo de las cajas de Petri,

se agregó el agar correspondiente a una temperatura de 50 °C y se homogenizaron antes de la gelificación.

Las muestras fueron incubadas para el caso de agar rojo cristal violeta, agar plate count y agar infusión cerebro corazón a 37 °C por 48 h y para agar Sabouraud oxitetraciclina a 25 °C por 5 días. Posterior al tiempo de incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

2.4.2 Prueba de eficacia antimicrobiana

Para el desarrollo de este ensayo se siguieron las etapas de preparación de las cepas de prueba, promoción del crecimiento de los medios, aptitud del método de recuento en presencia del producto y prueba al producto (extracto fluido de *P. quadrangularis* y a los ensayos propuestos en el estudio de estabilidad).

✓ Preparación de las cepas de prueba

Las cepas seleccionadas fueron: *Escherichia coli* (ATCC N° 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N° 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC N° 10231), *Candida albicans* (ATCC N°10231) y *Aspergillus brasiliensis* (ATCC N°16404). La concentración de microorganismos que se adicionó se encontraba en un rango entre $0,75 \times 10^8$ UFC y $1,25 \times 10^8$ UFC.

Para la estandarización del inóculo inicial con bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) se hizo una curva de crecimiento exploratoria. Para ello, se realizó la reactivación en superficie de la cepa ATCC correspondiente, en agar tripticasa de soja (TSA) y se incubó a 37 °C por 24 h. Se tomó con un aza estéril una cantidad del microorganismo y se suspendió en 15 mL de caldo Mueller-Hinton hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,045. Se realizó la lectura de DO a 590 nm en un lector de absorbancia de microplacas de 96 pozos iMark™ (Biorad®), con 110 µl de muestra. De esta dispersión se tomó 1 mL y se diluyó en serie 1:10 hasta una dilución -8. Las últimas cuatro diluciones (-5, -6, -7 y -8) fueron sembradas en fondo en agar TSA e incubadas por 24 h. Al finalizar este tiempo se realizó el conteo de los microorganismos. De nuevo, la suspensión se incubó a 37 °C y cada hora se tomó una muestra, repitiendo el procedimiento anteriormente descrito.

A lo largo del estudio, se manejó un control negativo (sin la adición de microorganismos), para asegurar la esterilidad del caldo y del agar.

La concentración del inóculo inicial en hongos y levaduras (*C. albicans*, *A. brasiliensis*) fue determinada *in-situ* por medio de una cámara de Neubauer y correspondió a una concentración final de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

✓ Promoción del crecimiento de los medios

A los medios de cultivo preparados a partir de agar digerido de caseína y soja y agar Sabouraud dextrosa deshidratados, se les adicionó 1 mL de suspensión de los microorganismos a una concentración aproximada de 100 UFC/mL. En la Tabla 2-3 se presentan las condiciones de crecimiento para cada uno de los microorganismos evaluados. Después de los respectivos tiempos de incubación se realizó el recuento en placa.

Tabla 2-3. Microorganismos y condiciones evaluadas para la prueba de eficacia microbiana.

Microorganismo	Medio de cultivo	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
<i>E. coli</i>	Agar digerido de caseína y soja	18 - 24 h	37 ± 2 °C
<i>P. aeruginosa</i>	Agar digerido de caseína y soja	18 - 24 h	37 ± 2 °C
<i>S. aureus</i>	Agar digerido de caseína y soja	18 - 24 h	37 ± 2 °C
<i>C. albicans</i>	Agar Sabouraud dextrosa	5 días	25 ± 2 °C
<i>A. brasiliensis</i>	Agar Sabouraud dextrosa	5 días	25 ± 2 °C

✓ **Aptitud del método de recuento en presencia del producto**

Se siguió la metodología para la preparación de muestras de productos solubles en agua que propone la Farmacopea de los Estados Unidos (55). Se realizaron las diluciones del extracto estandarizado de *P. quadrangularis* en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2; este extracto fue previamente inoculado con los microorganismos de prueba en una concentración final de 1×10^6 UFC/mL. Las condiciones de crecimiento fueron las establecidas en la Tabla 2-3 y al finalizar el tiempo de incubación se realizó el recuento en placa. Considerando que la principal sustancia de interferencia es el etanol, se seleccionó el método de dilución para neutralizar el efecto de este agente. Adicionalmente, se utilizó como blanco positivo una muestra sin la adición del extracto.

✓ **Prueba al producto**

Para la realización de la prueba se utilizaron 10 mL de cada una de las muestras. En la Tabla 2-4, se detalla su composición y nomenclatura correspondiente, relacionados con los ensayos de estabilidad propuestos anteriormente. A cada una de ellas se les agregó 1 mL de suspensión de microorganismos a una concentración previamente estandarizada de $1 \pm 0.25 \times 10^8$ UFC/mL. Los microorganismos adicionados corresponden a los presentados en la Tabla 3-3. Los productos se almacenaron a 25 °C y fueron muestreados a tiempo cero, 14 días y 28 días. A cada uno de los tiempos de muestreo, se realizaron las diluciones con una solución amortiguadora de fosfato pH 7.2 y sembrados en los medios y condiciones definidas en la Tabla 2-3. Después del periodo de incubación se realizó el recuento en placa.

Tabla 2-4. Composición de los ensayos evaluados microbiológicamente.

Ensayos	Flavonoides (%)	Etanol (%)	Poliol	Agua
E1	4 – 5	50		csp 70 mL
F30G	4 – 5	30	Glicerina (5%)	csp 70 mL
F30S	4 – 5	30	Sorbitol (5%)	csp 70 mL
F50G	4 – 5	50	Glicerina (5%)	csp 70 mL
F50S	4 – 5	50	Sorbitol (5%)	csp 70 mL

***E1**: Extracto fluido *P. quadrangularis* **F30G**: Flavonoides 4%- 5%, Etanol 30% y Glicerina 5%; **F50G**: Flavonoides 4%- 5%, Etanol 30% y Glicerina 5%; **F30S**: Flavonoides 4%- 5%, Etanol 30% y Sorbitol 5%; **F50S**: Flavonoides 4%- 5%, Etanol 30% y Sorbitol 5%.

2.5 Propuesta de la formulación del producto y del proceso de fabricación

2.5.1 Formulación del producto

Para esta etapa se consideraron los resultados de los ensayos realizados en la preformulación, que incluyeron los estudios de estabilidad frente a la temperatura y a la luz, en presencia de dos polioles y dos concentraciones de etanol. Se elaboró una matriz de análisis que incluía las variables respuesta de los estudios de estabilidad y su porcentaje de influencia en el perfil de calidad del producto. Con los resultados de los análisis estadísticos asociados a los DEE propuestos para los estudios de estabilidad y los aspectos microbiológicos evaluados, se definió un prototipo de formulación.

2.5.2 Proceso de fabricación

Este fue propuesto teniendo en cuenta la forma farmacéutica y los componentes del prototipo de formulación. Además, considerando una futura transferencia, se tuvieron en

cuenta los equipos y las áreas de fabricación del laboratorio de Farmacia industrial del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

2.5.3 Análisis de riesgos asociados a la formulación del producto y al proceso de fabricación

En esta etapa se analizó la influencia tanto de los componentes de la formulación como de cada una de las etapas del proceso, en la calidad, seguridad y eficacia del producto. Así, en una primera aproximación para identificar la criticidad de cada una de las variables estudiadas, se empleó la matriz de Análisis de Riesgos y Mitigación – RAMM (56). Posteriormente fue llevado a cabo el análisis de riesgos detallado para las variables consideradas críticas utilizando el método de Análisis de Fallas y Efectos - FMEA (57).

Para el diligenciamiento de las matrices RAMM se empleó una escala de ponderación en la que se asigna un valor de 1, 3 o 9 a cada aspecto a evaluar o etapa del proceso, dependiendo de la importancia que tiene cada componente de la formulación en cada uno de los atributos de calidad. El valor ponderado corresponde a la sumatoria del producto entre el valor que se le asignó y el valor de criticidad asignado a cada atributo de calidad, este valor es el que determina la criticidad del material de partida o de la etapa de fabricación. Para facilitar la interpretación, se utilizó un código de colores en el cual los componentes de alta criticidad están de color rojo, los de mediana criticidad de color amarillo y los de baja criticidad de color verde.

Para elaborar las matrices FMEA, cada una de las operaciones unitarias del proceso de fabricación fueron divididas en subetapas. Se realizó la identificación del riesgo basado en las matrices RAMM de cada una de las etapas del proceso de fabricación. Luego se procedió a la valoración del riesgo, en el cual se identificaron las posibles causas y las actividades de control al realizar una posible preparación en el Laboratorio de Farmacia Industrial. La ocurrencia fue calificada en una escala de 1, 3 y 9, según la estimación de que un evento no ocurra, ocurra esporádicamente u ocurra con frecuencia. La severidad fue calificada en una escala de 1, 3 y 9, según si se estima un impacto bajo, medio o elevado para la calidad del producto o para el desempeño eficiente de la línea de

producción. Por último, la detectabilidad calificada en una escala 1, 3 y 9 según sí podrían existir controles del proceso que funcionan eficientemente, si los controles posibles no resultan adecuados o si no se cuenta con mecanismos de control. A partir del análisis anterior se calculó el número prioritario de riesgo y se evaluó el riesgo. Para aquellas subetapas en las que su evaluación del riesgo no fue aceptable se procedió a plantear posibles estrategias de mitigación.

2.6 Evaluación de la estabilidad de la formulación seleccionada y elaborada bajo las condiciones establecidas para el proceso

Se elaboró la formulación definida de acuerdo con las etapas previas, en las condiciones establecidas para el proceso. Luego, muestras del producto fueron sometidas a estudio de estabilidad en condiciones aceleradas ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\text{ \% HR} \pm 5\text{ \% HR}$). Se realizó la comparación entre el contenido de flavonoides a tiempo 0 y 30 días para verificar la estabilidad del producto. La formulación fue preparada por triplicado, partiendo de extractos obtenidos mediante el mismo protocolo de extracción y a partir del mismo material vegetal.

El análisis de las muestras se realizó por CLAE siguiendo la metodología propuesta por Medina (40), descrito previamente para la cuantificación de flavonoides totales contenidos en el extracto de *P. quadrangularis*. Se evaluaron cada uno de los seis flavonoides identificados (vitexina-2-O-xilósido, vitexina-2-O-glucósido, orientina-2-O-xilósido, orientina-2-O-glucósido, vitexina e isovitexina).

Para este estudio se realizó la comparación estadística mediante la prueba de similitud f_2 , empleando la Ecuación 2-5, buscando evidenciar si existe diferencia entre los perfiles fitoquímicos de 0 días y 30 días. Cuando f_2 está comprendido entre 50 y 100, los dos perfiles se consideran similares estadísticamente, ya que este rango indica que no hay una

diferencia media de punto a punto de más del 10 %. Si el valor de f_2 es menor a 50 se considera que existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos formulaciones.

Ecuación 2-5. Ecuación de Factor de similitud f_2 .

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Donde:

f_2 : es el factor de similitud

R_t : Los porcentajes del marcador de interés (de cada uno de los flavonoides evaluados) de referencia. Se toma como referencia la formulación evaluada a los 0 días

T_t : Los porcentajes del marcador de interés (de cada uno de los flavonoides evaluados) de prueba

n : Es el número de compuestos fitoquímicos evaluados.

El pH de la formulación final fue determinado en un potenciómetro marca CONSORT® a una temperatura de 18 ± 2 °C. El potenciómetro fue previamente calibrado. Para la medición del índice de refracción se utilizó un refractómetro digital Mettler Toledo 30PX. La determinación de la densidad fue realizada por el método del picnómetro para el cual se usó la Ecuación 2-1, utilizando agua destilada a 18 °C como sustancia de referencia.

3. Resultados y discusión

Como se presenta en la Figura 3-1, la primera etapa de QbD es la definición del perfil del producto (TPP, por sus siglas en inglés), ésta corresponde a la planificación que permite describir las características fundamentales del producto deseado en función de lo que quiere la empresa, las necesidades del cliente y los aspectos regulatorios.

Figura 3-1. Esquema metodología QbD. Adaptado de Pramod, 2016 (58).



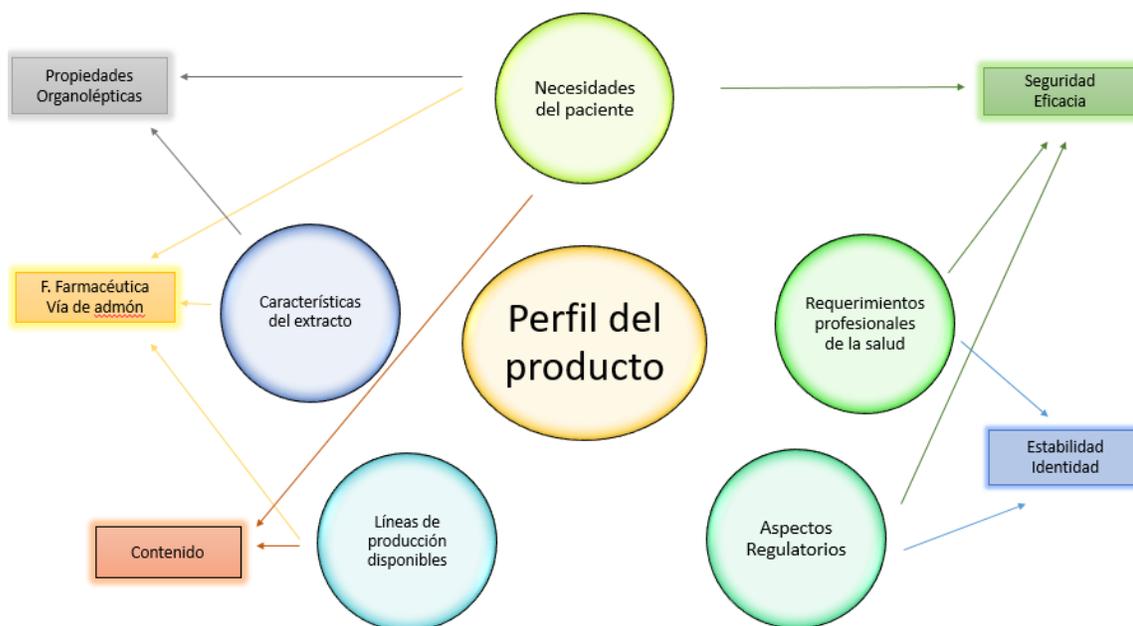
*QbD: Calidad basada en el diseño, QTPP: perfil de calidad del producto objetivo y CQAs: Atributos críticos de calidad.

Como se menciona en la guía de orientación para la industria y personal de revisión sobre el perfil de producto objetivo, publicada en 2007 por la FDA (59), el TPP plasma el objetivo del producto, el cual guía las demás etapas del desarrollo del producto. Se debe tener en cuenta que el TPP es un concepto dinámico, es decir, que cambia a medida que se avanza el conocimiento del producto farmacéutico, por lo que si se considera pertinente, debe actualizarse durante las diferentes etapas del ciclo de vida del medicamento (59).

En la presente tesis, el primer paso para el desarrollo del fitoterapéutico a partir del extracto de *P. quadrangularis* definieron los atributos cuali-cuantitativos fundamentales para garantizar la calidad del producto. La Figura 3-2 ilustra la interacción de cinco elementos que se consideraron con este propósito, i.e., las necesidades del paciente, los requerimientos de los profesionales de la salud, las características fisicoquímicas y farmacotécnicas del extracto, las líneas de producción disponibles en el Laboratorio de Farmacia Industrial del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y los aspectos regulatorios. Como se observa, cada uno de estos elementos guarda relación con algunos de los atributos de calidad del producto a diseñar. Por ejemplo, se conoce que la eficacia y seguridad del fitoterapéutico son una necesidad del paciente, pero estas también son controladas desde el punto de vista regulatorio y además se convierte en un requerimiento por parte de los profesionales de salud.

A continuación, se presentan las consideraciones iniciales para el diseño del producto, evidenciadas a partir del análisis de cada uno de los elementos ilustrados en la Figura 3-2. Para facilitar la interpretación, dichos elementos fueron agrupados en tres categorías: necesidades del paciente, necesidades del profesional de salud y las necesidades del fabricante (que incluye los aspectos regulatorios y las líneas de producción).

Figura 3-2. Elementos considerados para la definición del perfil del producto y sus interrelaciones (Elaboración propia).



3.1 Consideraciones iniciales

Los trastornos del sueño, problemas de ansiedad y depresión, entre otros, son enfermedades que están relacionadas con el sistema nervioso central, pero culturalmente han sido agrupados en un término que se conoce como “nervios”, “nerviosismo” o “alteración de los nervios”. Los nervios, a diferencia de las patologías anteriormente mencionadas, están referidos más a una enfermedad popular (síndromes ligados a la cultura); pueden ser definidos como una amplia gama de expresiones de sentimientos negativos que son resultado de situaciones estresantes (60). Tradicionalmente las terapias han sido principalmente enfocadas a recuperar la salud mediante la administración de plantas preparadas como infusiones, decocciones, etc, que se administran por vía oral. En otros casos se usan también preparados naturales mediante inhalaciones o baños a base de plantas aromáticas.

El tratamiento de este tipo de patologías tradicionalmente busca el empleo de plantas y preparaciones líquidas, lo que está asociado a una percepción de acción rápida y mayor aceptabilidad por parte del paciente. La idea de disponer de un producto fitoterapéutico para el tratamiento de la ansiedad, elaborado a partir de extractos de plantas y en una forma farmacéutica líquida homogénea de administración oral, podría asemejarse a la terapia tradicional. Las soluciones orales, clasificadas como formas farmacéuticas líquidas homogéneas, presentan ventajas derivadas de la alta biodisponibilidad del activo. Adicionalmente, facilitan la ingestión, garantizan la distribución uniforme del principio activo, tienen una menor variabilidad de dosis y pueden emplearse en pacientes con problemas de deglución, tanto en niños como en adultos mayores. Entre sus desventajas sobresalen el elevado riesgo de contaminación microbiana, la mayor posibilidad de interacciones químicas y problemas de estabilidad de las sustancias activas (61).

3.1.1 Información del paciente y profesionales de la salud

A partir de la información obtenida mediante entrevista a profesionales de la salud, es deseable que los componentes del producto sean en su gran mayoría de origen natural (por ejemplo, excipientes de origen natural), que el producto sea fácil de dosificar, pero que permita un adecuado control de la dosis. Igualmente, es recomendable un sabor amargo (considerando el sabor característico de los extractos vegetales), que no cause adicción, que sea de acción inmediata y que tenga efecto durante toda la noche.

El profesional de la salud desea prescribir un producto que tenga estudios desarrollados sobre la base de investigaciones que demuestren su seguridad y eficacia, esto debido a que se conoce el uso de extractos con poca o ninguna evidencia de sus propiedades farmacológicas, toxicológicas o de su mecanismo de acción (62). Además, el aumento en el uso de plantas en la medicina ya sea como coadyuvante o como alternativa al tratamiento convencional, debido a factores como el bajo costo y el fácil acceso a las especies naturales, ha llevado a que exista una gran diversidad de productos sin los estudios suficientes (63). También, se han encontrado productos herbales que interactúan o interfieren con la farmacología normal de algunos fármacos con consecuencias desfavorables (64–66). El conocimiento de estas propiedades es indispensable para comprobar el uso terapéutico seguro y efectivo de las fuentes herbales (67).

El profesional de la salud igualmente manifiesta que el producto a diseñar debe demostrar su seguridad y estabilidad, y que su calidad se encuentre valorada a través de marcadores analíticos o farmacológicos, que tenga un balance costo/beneficio positivo, que su precio esté al alcance del paciente y que se encuentre disponible en el mercado.

3.1.2 Actividad farmacológica

Para la definición de la dosis del fitoterapéutico, se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de los estudios clínicos que tuvieran como ingrediente activo extracto de alguna especie de la familia Passifloraceae. Como se observa en la Tabla 3-1 aunque existen estudios para extractos de *P. incarnata*, en ninguno de ellos se define la cantidad de marcadores analíticos que deben estar presentes. Tener el control en estos marcadores permite que factores como la época y el lugar de colecta del material vegetal y el método de extracción, no afecten la potencia.

De manera complementaria, en la Tabla 3-2 se reportan las dosis de los productos disponibles en el mercado que contienen *P. incarnata* en formulaciones líquidas. Existe consenso por parte las agencias regulatorias, respecto a un contenido mínimo de 2 % de flavonoides, expresados como vitexina.

Actualmente, en Colombia se encuentran 24 productos con registro sanitario vigente a base de especies de la familia Passifloraceae (68), de los cuales en forma farmacéuticas líquidas se encuentran 11 soluciones orales, una suspensión oral, un elixir y un jarabe. Además, nueve productos son a partir de extractos de *P. mollissima* y cinco de *P. incarnata*; para los demás no se especifica la especie.

Tabla 3-1. Estudios clínicos de extractos de especies de la familia Passifloraceae

Tipo de estudio	Muestra de la población	Edad	Tratamiento	Control	Duración	Resultados	Referencia
Aleatorizado doble ciego; grupo paralelo.	36 pacientes ambulatorios diagnosticados con GAD ¹ .	Entre 19 y 47 años.	45 gotas diarias de extracto de <i>Passiflora incarnata</i> .	Oxazepam 30 mg / día más gotas de placebo.	4 semanas.	Disminución en HAMA ² . No hay diferencia significativa entre los dos tratamientos.	(69)
Aleatorizado doble ciego; grupo paralelo.	60 pacientes sometidos a herniografía inguinal.	Entre 25 y 45 años.	500 mg <i>Passiflora incarnata</i> , vía oral.	Placebo.	Como premedicación 90 min antes de la cirugía.	Las puntuaciones de ansiedad NRS ³ fueron significativamente más bajas en el grupo de pasionaria.	(70)
Aleatorizado doble ciego; grupo paralelo.	Voluntarios sanos, número de participantes 12.	Promedio de edad 53.77 ± 5.6 años.	1200 mg extracto de <i>Passiflora incarnata</i> .	Placebo.	Una única administración.	Cambios en qEEG ⁴ consistente con efectos sedantes.	(71)
Estudio doble ciego, con diseño de medidas repetidas.	Voluntarios sanos, número de participantes 41.	Promedio de edad 22.73 ± 6.22.	Bolsas de té (2 g secos de partes aéreas de plantas).	Placebo.	Dos semanas.	Mejora de la calidad del sueño.	(72)
Aleatorizado doble ciego; grupo paralelo.	31 pacientes ambulatorios estado de ánimo ansioso.	No específica.	<i>Passiflora incarnata</i> (40 mg).	Placebo	28 días.	Mejora respecto al control.	(73)

¹ GAD. Trastorno de ansiedad generalizada

² HAMA. Escala de ansiedad Hamilton

³ NRS. Escala de calificación numérica

⁴ qEEG. Electroencefalografía cuantitativa

Tabla 3-2. Fitoterapéuticos en formulaciones líquidas a partir de extractos de especies de la familia Passifloraceae (74).

Preparación	Forma de dosificación	País	Periodo de uso medicinal
Triturado de sustancia herbal.	Bolsas de té (1-2 g material vegetal en 150 mL agua).	Austria.	Registrado en 2009.
Extracción líquida 1:6 solvente etanol 60% V/V.	0,89 g de la preparación herbal.	Austria.	En el mercado desde 1981.
Extracción líquida 1:8 solvente etanol 54% V/V, glicerina 4%, agua 60%.	0,3 a 0,4 mL preparación herbal, que corresponde a 0,456 mg. 5 veces al día	Austria.	En el mercado desde 1963.
Extracción líquida 1:1 Solvente etanol 70% V/V.	2 mL 3 veces al día.	Alemania.	Al menos desde 1978.
Extracción líquida 1:1 Solvente etanol 37% V/V.	1,9 mL 3 veces al día.	Alemania.	En el mercado desde 1992.

Como se evidenció a partir de la literatura científica, no existe una dosis definida para el tratamiento de la ansiedad y/o problemas del sueño en formulaciones líquidas a partir de un extracto de *P. incarnata*. Estas dosis varían dependiendo del método y los solventes utilizados en el proceso de extracción, tal como se ve en la Tabla 3-2, a pesar de que ha sido ampliamente reportado que factores propios del material vegetal (época de colecta, lugar de colecta, etc.) pueden afectar la concentración de los compuestos responsables de la actividad (75).

Para la definición de la dosis del producto fitoterapéutico a desarrollar, se decidió tener en cuenta la información de *P. incarnata* de la monografía de la OMS sobre plantas medicinales y de la monografía comunitaria a base de hierbas de la Agencia Europea de Medicamentos, en las que, para preparados herbales a partir de partes aéreas de *P. incarnata*, extraídos con una relación droga:solvente de 1:8 (utilizando como solvente etanol), se recomienda una dosis entre 1,0 mL y 4,0 mL, tres a cuatro veces al día. Adicionalmente, el fitoterapéutico debe tener un contenido mínimo del 2 % de flavonoides expresados en vitexina, esto con el fin de asegurar la efectividad del producto. Es importante destacar que no se cuenta con información acerca de la seguridad del extracto

de *P. quadrangularis*, por lo cual se siguen las recomendaciones de posología para *P. incarnata* mencionadas anteriormente.

3.1.3 Necesidades del fabricante

Uno de los requisitos para la fabricación de un fitoterapéutico es disponer de una metodología que permita la identificación del material vegetal que es utilizado como materia prima en el proceso de producción. Aunque es difícil conocer la combinación exacta de sustancias químicas que producen el efecto biológico, debido a que un fitoterapéutico contiene una gran cantidad de compuestos químicos (ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, saponinas y otras más), se debe tener una metodología que permita identificar y cuantificar el ingrediente o ingredientes que sean responsables o participen en la actividad farmacológica. De esta forma, tal como lo propone Bent (2008), esto es importante para obtener un producto seguro, eficaz y que mantenga su calidad durante todo el proceso de fabricación (76).

Otro requisito importante es conocer la estabilidad del fitoterapéutico debido a que es un sistema multicomponente y que existe una mayor probabilidad de sufrir degradación al estar presentado como una formulación líquida, ya que las moléculas activas están disponibles en el medio a nivel molecular o coloidal (51). Es así como resulta necesario evaluar la estabilidad del extracto en solución frente a factores externos (luz, temperatura, oxígeno, etc) e internos (vehículo, pH, constante dieléctrica, etc), así como la estabilidad de la formulación completa. Desde el punto de vista microbiológico y físicoquímico es fundamental garantizar la composición adecuada de la formulación que asegure estabilidad durante la vida útil del producto (61). No menos importante es la consideración de los aspectos asociados a la vía de administración, tanto los relacionados con la corrección organoléptica como aquellos asociados a los parámetros biofarmacéutico (77).

Desde el punto de vista regulatorio el producto debe cumplir con los requisitos para la comercialización en Colombia, expuestos en el decreto 1156 de 2018 del Ministerio De Salud y Protección Social (78), entre los que se destacan:

- Forma farmacéutica y presentación comercial, especificando material de envase y empaque.
- Fórmula cuali-cuantitativa del producto, expresando la cantidad de planta medicinal, nombre científico y nombre común, género, especie, variedad, parte de la planta utilizada, solvente utilizado, proporción en peso de la planta medicinal, el volumen de solvente utilizado, entre otras.
- Formulación, expresada por cada mL.
- Certificado de inscripción y clasificación botánica de la planta medicinal.
- Certificado de análisis del patrón de referencia, marcador cromatográfico utilizado para el control de calidad del material de la planta medicinal.
- Fórmula del lote estandarizado de fabricación.
- Descripción detallada del proceso de fabricación del producto.

Otro factor de interés para el fabricante es la línea de producción disponible, en este caso en el Laboratorio de Farmacia Industrial del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los equipos con los que se cuenta son: una llenadora y dosificadora marca ERWEKA® FDS N° 23797, un agitador eléctrico EKATO-WERK® N° 61/04309 y un tanque de acero inoxidable de 8 L.

En esencia, el fabricante busca que el producto sea elaborado con los equipos disponibles en sus instalaciones, que sea estable a lo largo de la línea de producción y que se cumplan las exigencias de Buenas Prácticas de Manufactura que le aplican (Decreto 549 de 2001) (79). Además, que el producto tenga la facilidad de rotar en el mercado, con una ganancia económica favorable, que cumpla con los requerimientos legales para su comercialización.

3.2 Perfil del producto objetivo (TPP)

De acuerdo con la información anterior, el producto fitoterapéutico que se pretende diseñar corresponde a una forma farmacéutica en gotas, indicada como coadyuvante en el tratamiento de trastornos del sueño y problemas de ansiedad en pacientes adultos; de acción rápida sin generar dependencia. Como ingrediente activo se utilizará un extracto

hidroalcohólico estandarizado de hojas de *P. quadrangularis*. Vía de administración oral, en multidosis, con propiedades organolépticas aceptables. Se considera importante la selección del material de envase con el fin de mantener de la estabilidad física, química y microbiológica del producto.

3.3 Perfil de calidad del producto (QTPP) y definición de los atributos críticos de calidad (CQAs)

Como se ha mencionado anteriormente, a partir del perfil del producto y la información recopilada acerca de los requerimientos farmacológicos, de uso y regulatorios esperados, se define el Perfil de Calidad del Producto (QTPP). La Tabla 3-3 sintetiza el QTPP para el fitoterapéutico que se pretende desarrollar en esta investigación. Como resultado se obtienen los atributos de calidad del producto, que en la Tabla 3-4 son evaluados respecto a su criticidad utilizando una puntuación de 1, 3 o 9 según la importancia de cada uno de ellos en la calidad, seguridad y eficacia del producto.

Tabla 3-3. Definición de los objetivos de calidad asociados al perfil del producto para el desarrollo del fitoterapéutico a partir de extracto de *P. quadrangularis*.

Atributos del producto	Objetivo	Atributos de calidad	
		Prueba	Criterios de aceptación
Forma de dosificación	Solución oral.	-	Gotas orales.
Identidad	Positivo para ingredientes activos.	CLAE-DAD.	Cromatograma coincide con estándar de referencia para los 5 marcadores analíticos.
Potencia	Tintura 1- 4 mL (1:8,5 extracción con etanol al 50% V/V).	CLAE-DAD	Contenido mínimo de flavonoides 2,0 % expresados en vitexina.

Modo de administración	Oral.	-	Tres administraciones diarias.
Contenido	Requerido para un tratamiento máximo de 2 semanas.	-	70 mL.
Sabor	-	-	Palatable
Edad	Pacientes adultos.	-	Mayores de 18 años.
Estabilidad	Conservar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y la potencia del extracto durante al menos 24 meses.	CLAE-DAD. pH. Color. Índice de refracción. Prueba de recuento microbiano.	Los ensayos de estabilidad demuestran el cumplimiento de especificaciones.
Propiedades fisicoquímicas	Mantener las propiedades que aseguran la calidad del fitoterapéutico.	pH. Viscosidad. Índice de refracción.	Pruebas fisicoquímicas cumplan especificaciones*: pH 4.7-5.2 viscosidad: 1,504 – 2,015 cP a17°C IR: 1,364±0,012
Limites microbiológicos	Cumple con los requisitos de la Farmacopea de los Estados Unidos.	Prueba de recuento microbiano.	Recuento total de microorganismos aerobios <10 ³ . Recuento total combinado de hongos y levaduras < 10 ² .

*Definidos experimentalmente a partir de la evaluación de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Passiflora quadrangularis* en ensayos previos.

Otras consideraciones a tener en cuenta		
	Objetivo	Criterios de aceptación
Utilización línea de producción	Proyectar el uso de las líneas de producción disponibles en el Departamento de Farmacia.	Uso del 80 % de las líneas de producción disponibles en el Departamento de Farmacia.
Producción	Tener una producción acorde con la rotación del producto en el mercado.	Producción de 3000 unidades por mes.

Como se observa en la Tabla 3-4, los mayores puntajes fueron para la identidad, la potencia, la estabilidad y el aspecto del producto. Estos atributos se consideraron críticos debido a que tienen un impacto directo en la seguridad y eficacia del producto.

Tabla 3-4. Atributos críticos de calidad para el producto gotas orales de extracto de *P. quadrangularis*.

Propiedades organolépticas			Propiedades fisicoquímicas			Identidad	Potencia	Calidad microbiológica	Estabilidad
Aspecto	Color	Sabor	Viscosidad	pH	I. Refracción				
9	3	1	1	3	1	9	9	3	9

Estos atributos de calidad junto con el perfil de calidad del producto, guiaron las demás etapas del desarrollo del fitoterapéutico.

3.4 Preformulación y formulación

El extracto hidroalcohólico fue obtenido a partir de las hojas de *P. quadrangularis*, siguiendo la metodología previamente definida. Corresponde a un líquido de color marrón oscuro, con olor característico y sabor amargo (Figura 3-3).

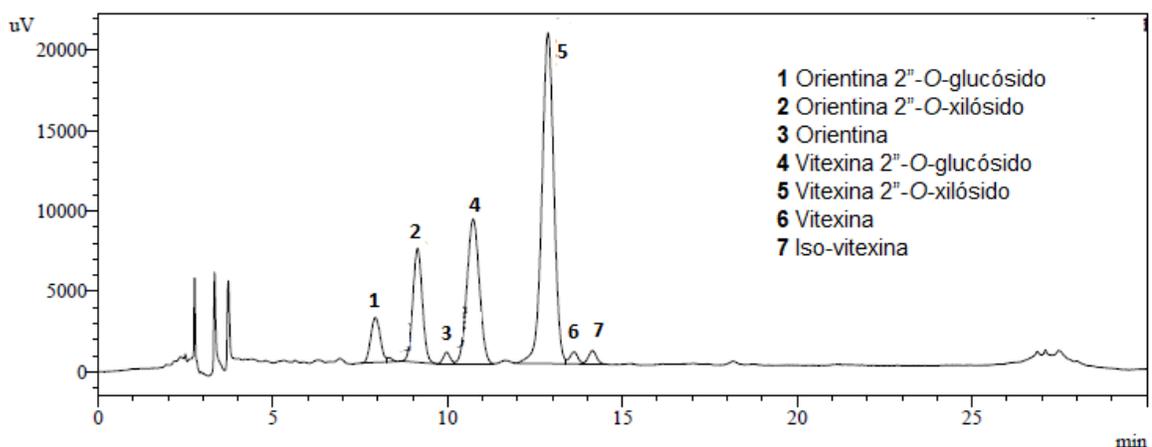
Figura 3-3. Extracto hidroalcohólico de *Passiflora quadrangularis*.



3.4.1 Caracterización del extracto fluido de *P. quadrangularis*

Como se mencionó en la metodología, el extracto fluido de *P. quadrangularis* fue caracterizado respecto al perfil cromatográfico, la cantidad de marcadores farmacológicos y algunas características fisicoquímicas. El perfil cromatográfico del extracto se muestra en la Figura 3-4 y coincide con lo reportado por Modesti (2013), Medina (2014) y Echeverry (2017) (40,53,80). En este sentido, incluye los flavonoides diglicosilados: vitexina 2''-O-glucósido, vitexina 2''-O-xilósido, orientina 2''-O-glucósido, orientina 2''-O-xilósido y, por otro lado, los monoglicósidos vitexina y orientina.

Figura 3-4. Perfil cromatográfico del extracto de *Passiflora quadrangularis*.



Los productos fitoterapéuticos normalmente están compuestos de varias sustancias que son responsables de la actividad farmacológica. Dada la complejidad química, muchos de los medicamentos disponibles en el mercado son estandarizados cuantitativamente respecto al contenido de algunos marcadores para garantizar la actividad farmacológica del extracto. En la Tabla 3-5 se presenta la concentración y la cantidad relativa de cada uno de los flavonoides contenidos en el extracto fluido de *P. quadrangularis* obtenido en la presente investigación. Para el caso de los flavonoides totales, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Echeverry (2017), $65,3 \pm 2,1$ mg-equivalentes de vitexina/g

de extracto (53). El contenido similar de los flavonoides se debe a que en ambos casos se empleó el mismo protocolo de extracción; la diferencia de un 4,3 % es propia de las características intrínsecas del material vegetal. Al comparar con la literatura se encuentra reportado un contenido de flavonoides de 55,1 mg/g de extracto para un extracto de hojas secas de *P. quadrangularis* obtenido por infusión acuosa, en la proporción planta:disolvente de 1:10 (m/v) a 95 °C, durante 10 min (80).

Tabla 3-5. Concentración y cantidades relativas de los flavonoides presentes en el extracto fluido de *P. quadrangularis*.

Marcador	Concentración (mg/mL)*	Cantidad relativa (%)
<i>Orientina 2"-O-glucósido</i>	3,50 ± 0,40	5,73 ± 0,23
<i>Orientina 2"-O-xilósido</i>	8,81 ± 0,66	14,46 ± 0,17
<i>Orientina</i>	0,52 ± 0,11	0,86 ± 0,16
<i>Vitexina 2"-O-glucósido</i>	14,62 ± 1,10	24,00 ± 0,20
<i>Vitexina 2"-O-xilósido</i>	32,10 ± 2,46	52,69 ± 0,29
<i>Vitexina</i>	0,62 ± 0,13	1,02 ± 0,13
<i>Iso-Vitexina</i>	0,77 ± 0,18	1,25 ± 0,20
Flavonoides Totales	60,95 ± 4,92	100,00

*La concentración de flavonoides es expresada como mg-equivalente de vitexina/mL extracto. Número de réplicas analíticas n=6. Los datos se presentan como la media de las observaciones ± error estándar.

De otro lado, las características fisicoquímicas del extracto se reportan en la Tabla 3-6. La importancia de la medición del pH, de acuerdo con lo reportado en la literatura, es que su variación respecto a su característica inicial puede ser un indicativo de que los flavonoides presentes en el extracto de *P. quadrangularis* sufrieron hidrólisis ácida o básica (40,53,81).

Tabla 3-6. Características fisicoquímicas del extracto fluido de *P. quadrangularis*

Propiedad fisicoquímica	Resultado
Densidad (g/mL)	0,995 ± 0,002
Viscosidad (Cp)	1,902 ± 0,078
pH	4,99 ± 0,020
Índice de refracción	1,3632 – 1,3654

* Número de réplicas analíticas n=5. Los datos se presentan como la media de las observaciones ± error estándar.

La caracterización fisicoquímica inicial del extracto fluido de *P. quadrangularis* es el punto de referencia a la hora de garantizar la seguridad y la eficacia del producto. Sin embargo, estos valores pueden variar en el tiempo debido a la influencia de factores como la temperatura, la humedad, la luz, el tipo de solvente empleado, etc.

Debido a que en la literatura no se encuentra información relacionada con la estabilidad del extracto fluido de *P. quadrangularis* frente a los factores anteriormente mencionados (se encuentra información correspondiente al extracto seco) (40,53), se hace necesario el desarrollo de los estudios de estabilidad pertinentes.

En este sentido, además de los factores ambientales, se busca conocer la influencia en la estabilidad del extracto de los cambios en la concentración de etanol, esto debido a que se tomó como punto de partida un extracto hidroalcohólico cuya concentración inicial de etanol en el extracto es del 50 %. Igualmente se investigó la influencia del tipo de poliol (glicerina o sorbitol), teniendo en cuenta que la presencia de polioles en este tipo de formulaciones resulta fundamental para regular la pérdida de solvente y evitar inconvenientes futuros de concentración de los componentes del extracto en el producto final.

Se seleccionó sorbitol, ya que en preparaciones líquidas es utilizado como vehículo, estabilizador de algunos principios activos (al variar la polaridad del vehículo), además de regulador de la evaporación, genera aumento en la viscosidad, contribuye en la preservación y es edulcorante. El sorbitol (D-glucitol) es un alcohol con seis radicales

hidroxilos, tiene un poder edulcorante del 50 % – 60 % respecto a la sacarosa. Es un polvo cristalino, inodoro y con una elevada higroscopicidad. Se han identificado cuatro polimorfos y una forma amorfa (82). Se recomienda la identificación del polimorfo, debido a que los diferentes polimorfos tienen diferentes velocidades de disolución que pueden afectar el tiempo de mezcla. Se recomienda que su almacenamiento se realice a humedades relativas inferiores al 60 % a 25 °C.

La glicerina, de manera similar al sorbitol, es utilizada en formulaciones orales como cosolvente, al modificar la polaridad del vehículo puede estabilizar el activo, es edulcorante (0,6 veces más dulce que la sacarosa), sinergiza la acción del conservante antimicrobiano, contribuye al aumento en la viscosidad, además de regulador de la evaporación. Es un líquido transparente, incoloro, inodoro y viscoso, es altamente higroscópico por lo que es necesario almacenarlo correctamente teniendo en cuenta que a bajas temperaturas puede cristalizar. No se recomienda el calentamiento debido que la temperatura facilita la generación de acroleína un producto de degradación tóxico (83).

3.5 Estudio de estabilidad del extracto

Factores como la temperatura, la luz, la polaridad del medio y la concentración de etanol, entre otros, podrían afectar de manera directa la estabilidad de los componentes presentes en el extracto de *P. quadrangularis*. Por tal razón, en la presente investigación se llevaron a cabo estudios de estabilidad durante tres meses, para evaluar el efecto de la temperatura y la luz sobre composiciones de muestra en las que también se varían la concentración de etanol y el tipo de poliol empleado.

3.5.1 Influencia de la temperatura, la concentración de etanol y el tipo de poliol.

A continuación, se explica la influencia de los factores estudiados en las variables respuesta medidas.

- **Evaluación del pH**

Los valores de pH obtenidos en el estudio de estabilidad a los cuatro tiempos de muestreo para cada una de las formulaciones evaluadas, se presentan en la Tabla 3-7. Con estos resultados se realizaron las comparaciones estadísticas mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %, para establecer si las formulaciones tenían diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo. El $F_{\text{experimental}}$ de 0,219 inferior al $F_{\text{crítico}}$, permite aceptar la hipótesis nula de la prueba, indicando que no se detecta diferencia estadísticamente significativa de las muestras en los diferentes tiempos evaluados.

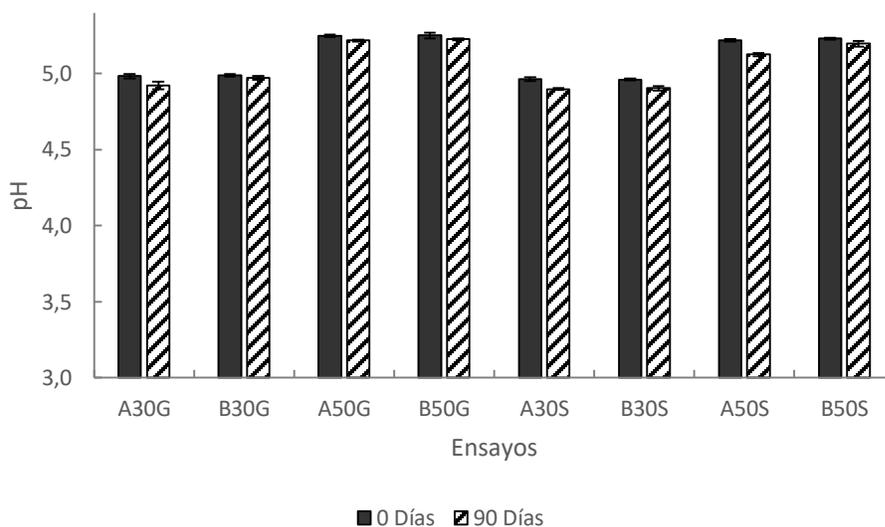
Tabla 3-7. Resultados de la evaluación de pH de cada uno de los ensayos a los cuatro tiempos de muestreo estudiados.

Muestra	0 días	15 días	30 días	90 días
A30G	4,98 ± 0,04	4,96 ± 0,01	4,94 ± 0,02	4,92 ± 0,02
B30G	4,99 ± 0,02	4,97 ± 0,02	4,96 ± 0,02	4,97 ± 0,01
A50G	5,25 ± 0,01	5,24 ± 0,01	5,21 ± 0,01	5,22 ± 0,01
B50G	5,25 ± 0,01	5,25 ± 0,02	5,22 ± 0,01	5,23 ± 0,01
A30S	4,96 ± 0,02	4,92 ± 0,01	4,89 ± 0,02	4,90 ± 0,01
B30S	4,96 ± 0,01	4,94 ± 0,01	4,90 ± 0,02	4,90 ± 0,02
A50S	5,22 ± 0,01	5,22 ± 0,01	5,16 ± 0,03	5,12 ± 0,01
B50S	5,23 ± 0,01	5,24 ± 0,01	5,18 ± 0,01	5,20 ± 0,02

* Número de réplicas analíticas $n=9$. Los datos se presentan como la media de las observaciones \pm error Estándar. **A30G**: 40°C, 30% EtOH y Glicerina **A50G**: 40°C, 50% EtOH y Glicerina **A30S**: 40°C, 30% EtOH y Sorbitol **A50S**: 40°C, 50% EtOH y Sorbitol **B30G**: 30°C, 30% EtOH y Glicerina **B50G**: 30°C, 50% EtOH y Glicerina **B30S**: 30°C, 30% EtOH y Sorbitol **B50S**: 30°C, 50% EtOH y Sorbitol.

Como se observa en la Figura 3-5, la temperatura no presenta efecto significativo sobre el pH del producto, entre el análisis inicial (cero días) y el análisis después de 90 días. No obstante, es posible que ocurran reacciones de degradación en las que no sean evidentes cambios en el pH debido al tipo o a la cantidad de subproducto formado.

Figura 3-5. Comportamiento del pH a los diferentes tiempos, para los ensayos con el extracto de *Passiflora quadrangularis*.



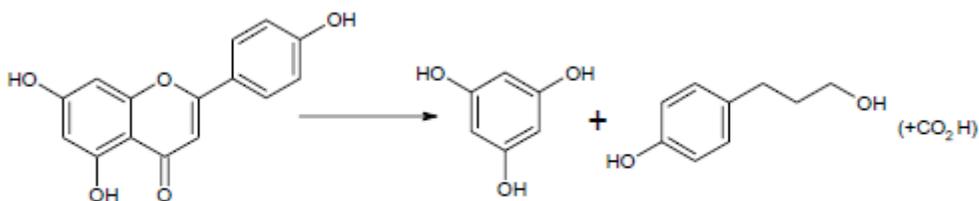
* Número de réplicas analíticas $n=9$. Los datos se presentan como la media de las observaciones \pm error Estándar. **A30G**: 40°C, 30% EtOH y Glicerina **A50G**: 40°C, 50% EtOH y Glicerina **A30S**: 40°C, 30% EtOH y Sorbitol **A50S**: 40°C, 50% EtOH y Sorbitol **B30G**: 30°C, 30% EtOH y Glicerina **B50G**: 30°C, 50% EtOH y Glicerina **B30S**: 30°C, 30% EtOH y Sorbitol **B50S**: 30°C, 50% EtOH y Sorbitol.

Se observan diferencias en los valores de pH entre las muestras que tienen un 50 % de etanol (A50G, A50S, B50G y B50S) y aquellas que tienen un 30 % (A30G, A30S, B30G y B30S), posiblemente debido a la variación en la proporción de la mezcla cosolvente que conlleva a un cambio de la constante dieléctrica del medio y por consiguiente, en el equilibrio de disociación de ácidos y bases, modificando la capacidad de solvatación y estabilización de las especies iónicas. Puesto que el etanol presenta una menor constante dieléctrica que la del agua, en los ensayos preparados con una mayor concentración (50 %) de etanol, se presenta una menor capacidad de estabilizar las especies iónicas, en consecuencia, la ionización sería menor en estas muestras.

El pH es un factor que debe ser tenido en cuenta debido a que en la literatura se encuentra ampliamente documentado que los cambios en el pH son indicativos de la degradación de los extractos naturales. Sin embargo, en este caso, los posibles productos de degradación formados son débilmente dissociables al ser en su mayoría OH fenólicos, lo que no evidenciaría modificaciones importantes en el pH. En este sentido, la siguiente es la información disponible en el grupo de investigación TECPRONA acerca de estudios de degradación del extracto seco de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés:

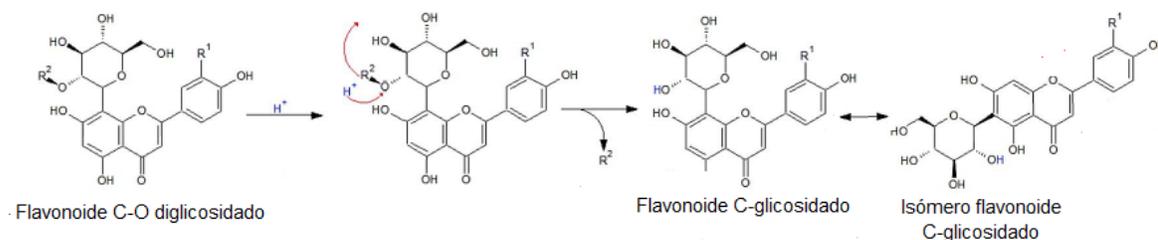
Para la hidrólisis básica, Medina (2017) y Echeverry (2018), clasificaron el extracto seco como lábil bajo condiciones alcalinas de estrés, disminuyendo la concentración de los flavonoides C-glicosilados y los C-O diglicosilados en estas condiciones (81). Esto se explica debido a que el medio básico favorece la apertura del anillo C de los flavonoides, produciendo dos fragmentos como se muestra en la Figura 3-6 (84).

Figura 3-6. Mecanismo de degradación flavonoides en medio básico.



En medio ácido el extracto de *P. quadrangularis* también fue considerado como lábil bajo condiciones de estrés. Esto se evidenció en un aumento de la concentración de los flavonoides C-glicosilados, así como de sus isómeros, debido a la degradación de los flavonoides C-O diglicosilados de acuerdo al mecanismo presentado en la Figura 3-7. No se presenta degradación de los flavonoides C-glicosilados dado que son estables a la hidrólisis ácida del glicósido debido a la unión carbono-carbono entre el azúcar y el núcleo fundamental (85).

Figura 3-7. Mecanismo de degradación flavonoides en medio ácido.



Sobre esta base, aunque no se evidenciaron cambios importantes en el pH durante los tres meses del estudio, no significa que la degradación no se diera. Se espera una lenta velocidad de degradación debido a que las condiciones del estudio realizado son menos drásticas que aquellas de estrés mencionadas en la literatura. Según lo reportado en los estudios previos, es necesario realizar un control del pH, al pensar posteriormente en una formulación, puesto que la degradación de los flavonoides en las condiciones extremas de pH, pueden conllevar a una pérdida en la actividad ansiolítica (51).

• Evaluación del color

Los cambios de color en la formulación pueden ser indicativos de la inestabilidad o degradación de algunos compuestos dentro del extracto; un ejemplo de esto son los compuestos fenólicos entre los que encontramos derivados de ácidos fenólicos y flavonoides, los que al degradarse presentan cambios en la tonalidad (86). También, se ha demostrado que las antocianinas monoméricas pertenecientes al grupo de los flavonoides, pueden degradarse con facilidad formando compuestos marrones o incoloros por factores como la temperatura, el pH, la luz y la presencia de iones metálicos, entre otros (87,88).

La medición del color se realizó mediante una escala semicuantitativa establecida en función del grado de opacidad al comparar las fotografías tomadas de cada muestra (siendo 10 el mayor grado de opacidad). En la Tabla 3-8 se pueden ver los resultados a tiempo cero y después de 90 días y en la Figura 3-8, a manera de ejemplo, se presentan las fotografías de unas muestras preparadas a concentraciones del 50 % (A50G) y del 30 % de etanol (A30G), a tiempo 0. Como se observa, existe diferencia en la coloración debido

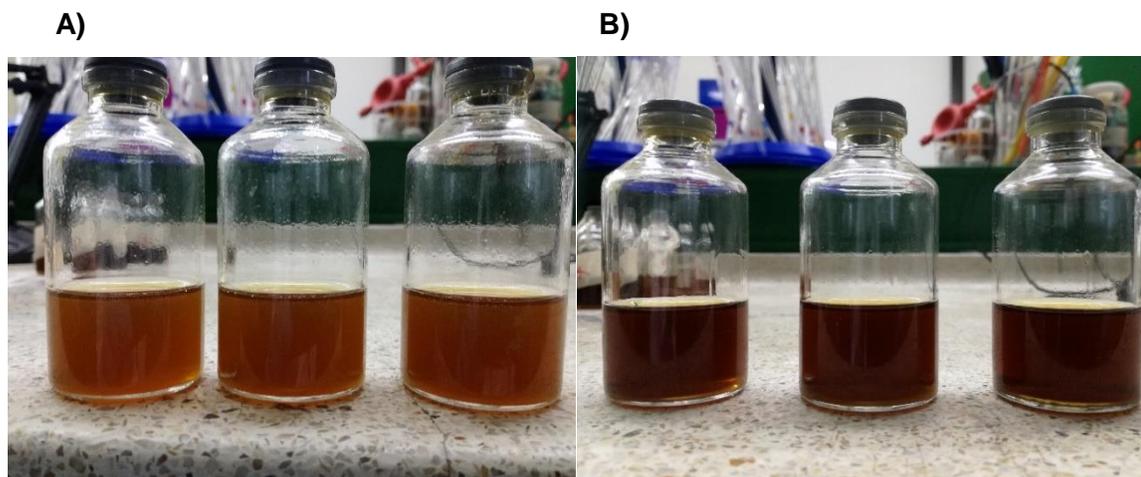
al cambio en la proporción de mezcla cosolvente, que aparentemente influye en la solubilidad diferencial de algunos componentes del extracto. Esto ocurrió en todas las muestras independientemente del poliol presente.

Tabla 3-8. Resultados de la evaluación de la tonalidad del extracto fluido de *P. quadrangularis* a tiempos 0 y 90 días.

Tiempo	Muestras evaluadas							
	A30G	B30G	A50G	B50G	A30S	B30S	A50S	B50S
Cero días	5	5	3	3	5	5	7	7
90 días	7	5	5	3	7	5	10	6

* **A30G:** 40°C, 30% EtOH – Glicerina; **A50G:** 40°C, 50% EtOH – Glicerina; **A30S:** 40°C, 30% EtOH – Sorbitol; **A50S:** 40°C, 50% EtOH – Sorbitol; **B30G:** 30°C, 30% EtOH – Glicerina; **B50G:** 30°C, 50% EtOH – Glicerina; **B30S:** 30°C, 30% EtOH – Sorbitol; **B50S:** 30°C, 50% EtOH – Sorbitol.

Figura 3-8. Fotografía de muestras de concentración de: A) 30% etanol-A30G y B) 50% etanol-A50G.



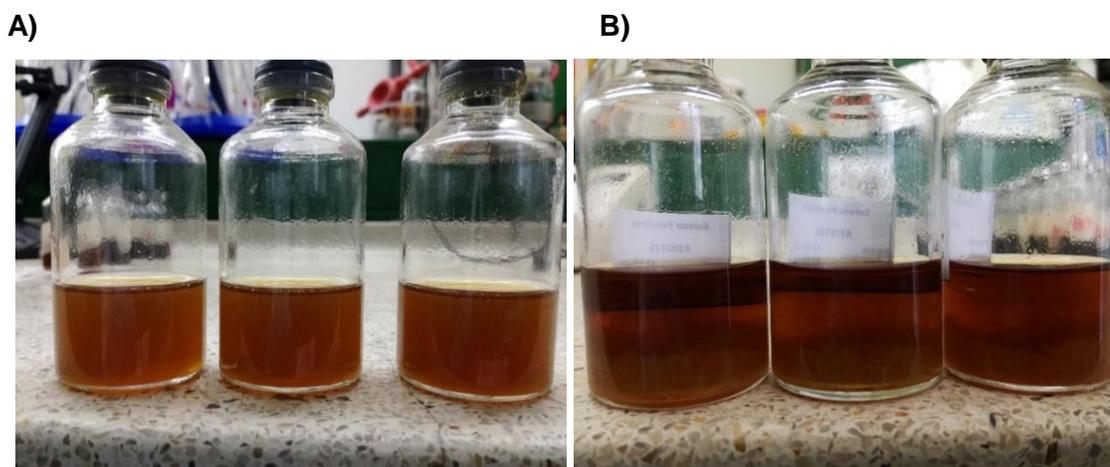
* **A30G:** 40°C, 30% EtOH – Glicerina; **A50G:** 40°C, 50% EtOH – Glicerina

Después de 90 días se observa que las muestras con un 30 % de etanol presentan la mayor variación en el color. Igualmente, como en el caso de la concentración de etanol, a manera de ejemplo en la Figura 3-9 se ilustra el comportamiento de la muestra A30S almacenada a 40 °C, 30 % etanol y sorbitol como poliol, en las que se observa un color más opaco respecto al tiempo inicial y la presencia de un precipitado en el fondo. Esto puede ser explicado debido a que variaciones en la constante dieléctrica tienen efecto

sobre la solubilidad de algunos de los componentes, llevando a un cambio en la apariencia física. Un comportamiento similar fue observado en un estudio realizado por Ortmann (2013) en un extracto acuoso de *Cecropia glaziovii*, también rico en flavonoides glicosilados, en el que después de la exposición a la temperatura, se observó oscurecimiento (89).

Adicional a esto, algunos flavonoides como las antocianinas pueden adoptar diferentes estructuras dependiendo del medio y del pH. En consecuencia, exhiben diferentes tonalidades. Las formas principales en las antocianinas son: catión flavilio (rojo), pseudobase carbinol (incoloro), base quinonoidal (violeta), base quinonoidal aniónica (azul) y chalcona (incoloro). A pHs entre 3 y 5, rango en el que se encuentra el extracto, hay mezclas de cuatro formas: pseudobase carbinol, catión flavilio, chalcona y base quinonoidal (90). Debido a que estas especies se encuentran en diferentes proporciones dependiendo del valor de pH, cambios en el pH o en la proporción de la mezcla cosolvente pueden modificar la tonalidad.

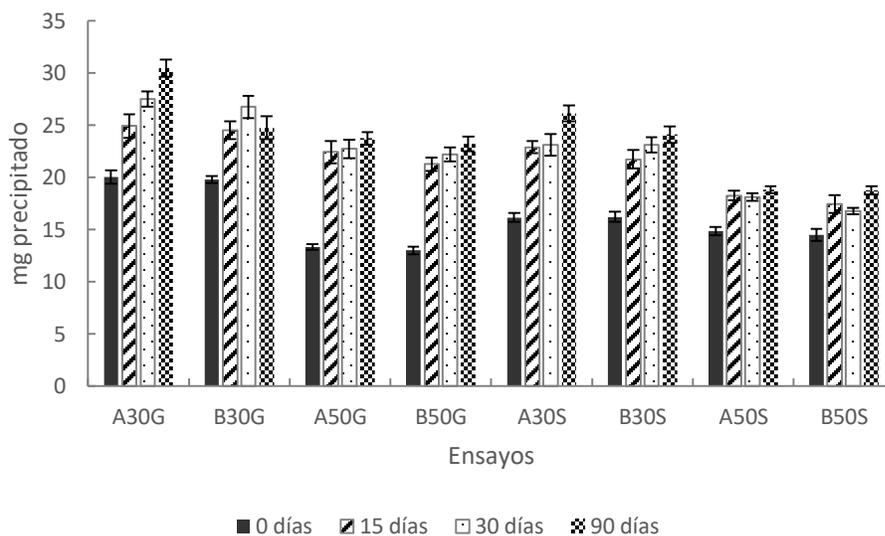
Figura 3-9. Fotografía de muestras almacenadas a 40 °C, utilizando 30 % etanol y sorbitol como poliol. A) Tiempo cero y B) Tiempo 90 días.



• Cuantificación del precipitado

En la Figura 3-10 se presentan los resultados de la cantidad de precipitado a los diferentes tiempos evaluados, mostrando que en todos los casos con el paso del tiempo hay un aumento en la cantidad de sólido formado.

Figura 3-10. Comparación de la cantidad de precipitado a los diferentes tiempos de muestreo para las muestras evaluadas.



* **A30G:** 40°C, 30% EtOH – Glicerina; **A50G:** 40°C, 50% EtOH – Glicerina; **A30S:** 40°C, 30% EtOH – Sorbitol; **A50S:** 40°C, 50% EtOH – Sorbitol; **B30G:** 30°C, 30% EtOH – Glicerina; **B50G:** 30°C, 50% EtOH – Glicerina; **B30S:** 30°C, 30% EtOH – Sorbitol; **B50S:** 30°C, 50% EtOH – Sorbitol.

De manera similar a lo realizado para el pH, se compararon los resultados mediante ANOVA con un nivel de confianza del 95 %. En este caso se obtuvo un valor de $F_{\text{experimental}}$ de 8,880, que es superior al $F_{\text{crítico}}$, por lo que la hipótesis nula de la prueba fue rechazada, es decir, que existe una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de precipitado dependiendo del tiempo de muestreo.

Para conocer cuáles eran las muestras diferentes se aplicó la prueba HSD (Honestly significant difference) de Tukey con 95 % de confianza, con la cual se estableció como

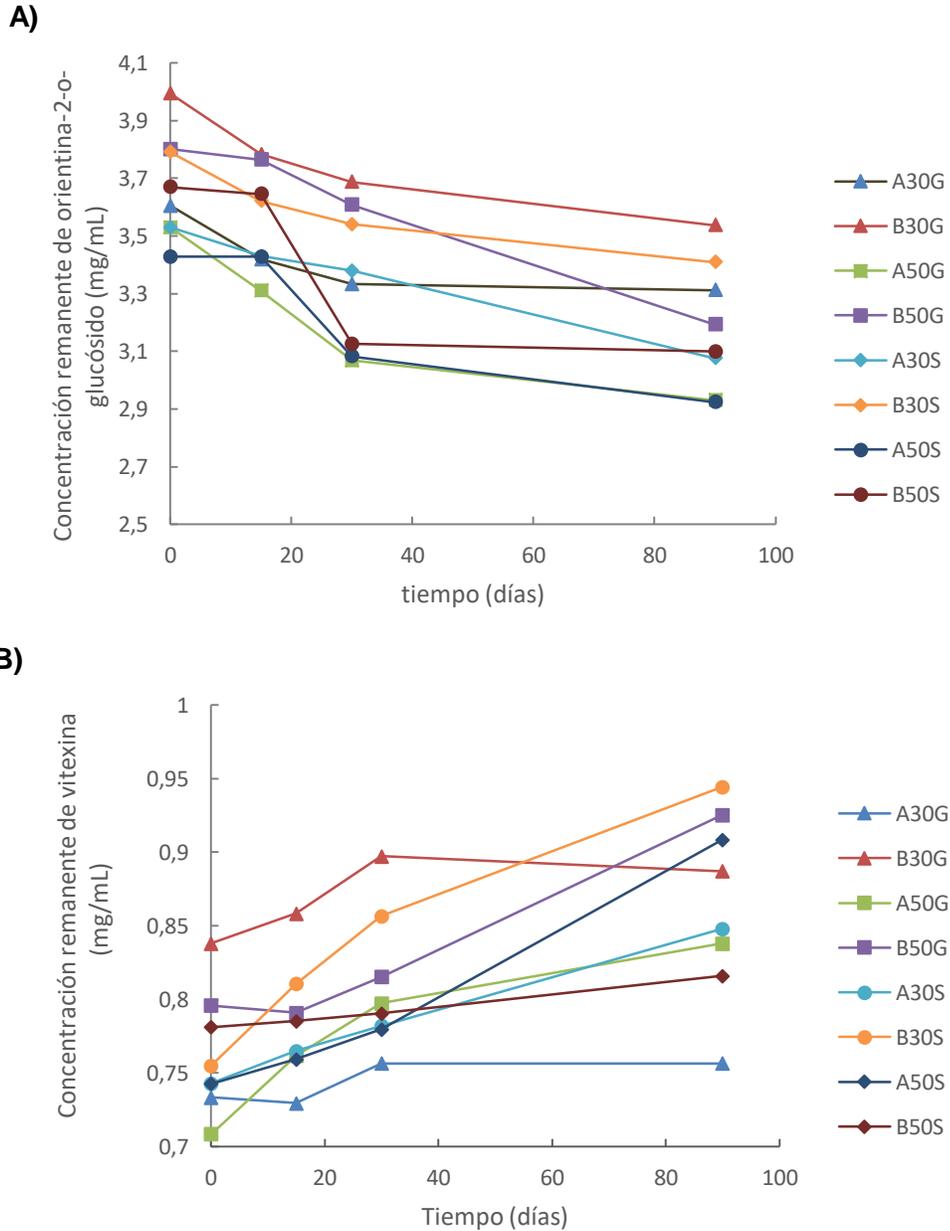
umbral un HSD de $\pm 4,437$. Se encontró que solamente hay diferencia estadísticamente significativa entre 15 y cero días, lo que demuestra que la inestabilización (representada por la precipitación) ocurre dentro de los primeros 15 días y posterior a este tiempo no hay un aumento significativo en el precipitado.

Un factor importante que se debe tener en cuenta para el diseño de una forma farmacéutica líquida homogénea es la solubilidad de los ingredientes activos, dado que determina el vehículo correcto para la formulación (91). Sin embargo, dicha solubilidad puede verse afectada a la hora de elaborar un medicamento por factores como la temperatura, la polaridad del vehículo, el pH y la naturaleza del soluto (92). Así, la presencia de precipitado es una clara evidencia de una inestabilidad que puede ser originada por procesos de insolubilización de algunos componentes del extracto ocasionados por cambios en la proporción de la mezcla cosolvente o por la aparición de productos de degradación que son insolubles en el medio (93).

- **Cuantificación de flavonoides**

Como se ha mencionado, los flavonoides diglicosilados vitexina 2"-O-glucósido, vitexina 2"-O-xilósido, orientina 2"-O-glucósido, orientina 2"-O-xilósido son responsables en gran medida de la actividad ansiolítica que presenta el extracto de *P. quadrangularis* y el monoglicósido vitexina es indicador de la degradación de los anteriores flavonoides. Como se observa en la Figura 3-11, en la que se presentan los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad en función de la temperatura, los flavonoides diglicosilados tuvieron una tendencia a disminuir su concentración (Orientina-2-O-glucósido), mientras que el flavonoide monoglicósido presenta una tendencia a aumentar (Vitexina). Esto nos indica, de manera preliminar, que las condiciones evaluadas (temperatura, etanol y poliol) tienen influencia en la estabilidad del extracto, siendo más marcado en las muestras expuestas a 40 °C (A30G, A50G, A30S y A50S). También se observa en todos los ensayos un aumento de vitexina después de los 90 días.

Figura 3-11. Efecto de la concentración de extracto, la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de A) Orientina-2-O-glucósido B) Vitexina en función del tiempo.

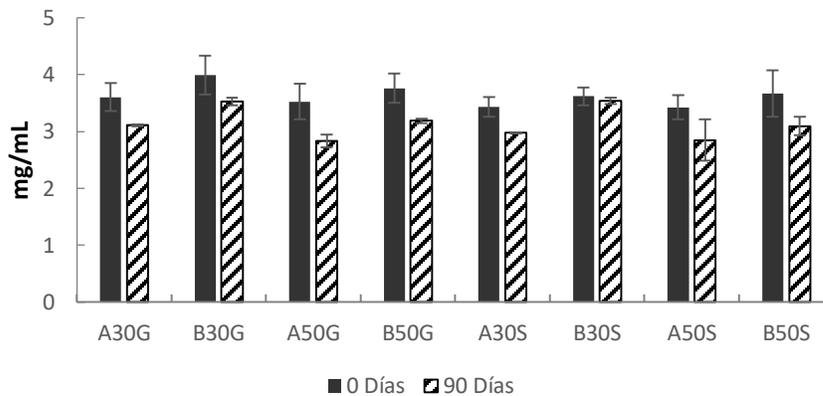


* La concentración de flavonoides es expresada como mg-equivalente de vitexina/ mL extracto. **A30G**: 40°C, 30% EtOH – Glicerina; **A50G**: 40°C, 50% EtOH – Glicerina; **A30S**: 40°C, 30% EtOH - Sorbitol; **A50S**: 40°C, 50% EtOH – Sorbitol; **B30G**: 30°C, 30% EtOH – Glicerina; **B50G**: 30°C, 50% EtOH – Glicerina; **B30S**: 30°C, 30% EtOH – Sorbitol; **B50S**: 30°C, 50% EtOH - Sorbitol.

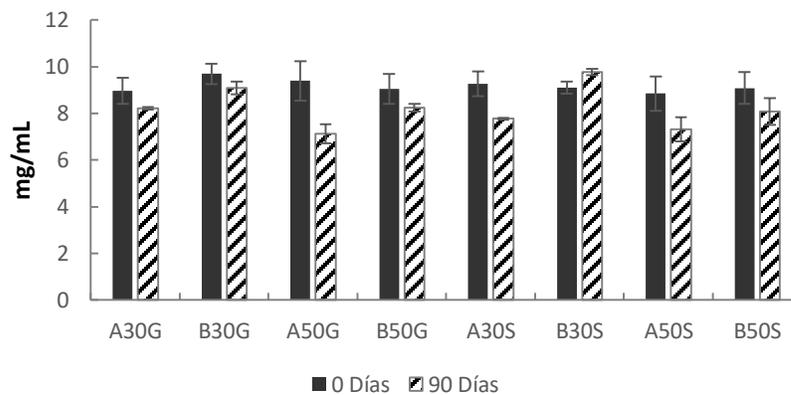
Para facilitar la interpretación de los resultados, en la Figura 3-12 se muestran las concentraciones de cada uno de los flavonoides a cero días y 90 días.

Figura 3-12. Efecto de la concentración de extracto, la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de flavonoides presentes en las formulaciones de *P. quadrangularis* en función del tiempo. **A)** Orientina-2O-glucósido **B)** Orientina-2O-xilósido **C)** Vitexina-2O-glucósido **D)** Vitexina-2O-xilósido **E)** Vitexina.

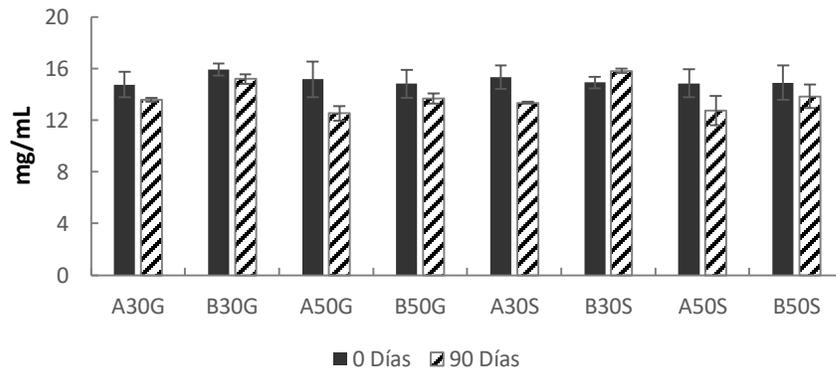
A)



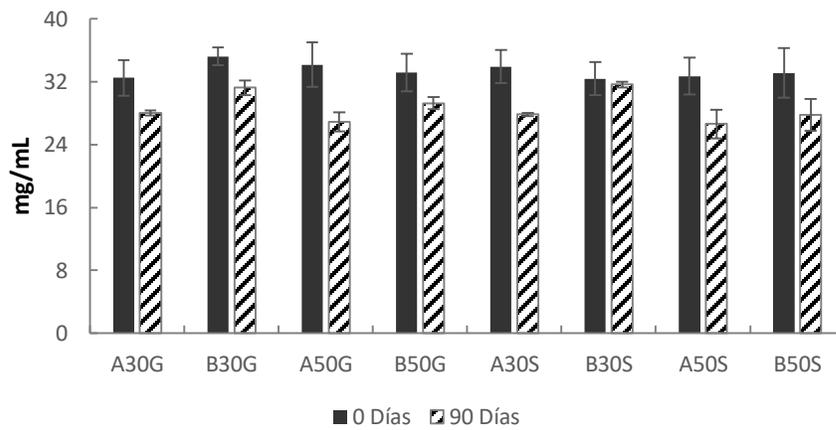
B)



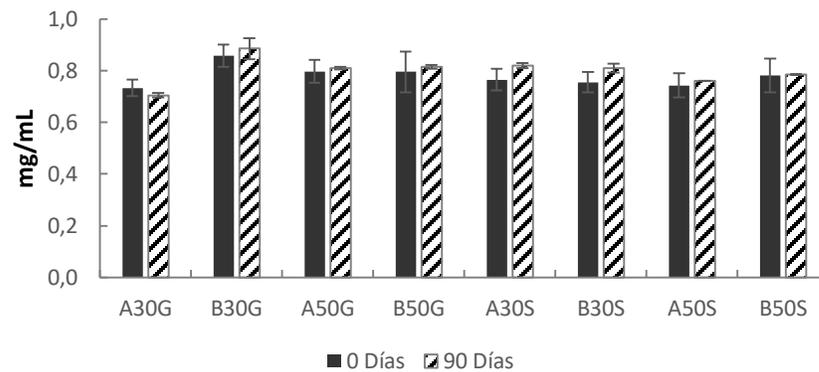
C)



D)



E)



* La concentración de flavonoides es expresada como mg-equivalente de vitexina/ mL extracto. Número de réplicas analíticas $n=6$. Los datos se presentan como la media de las observaciones \pm error Estándar **A30G**: 40°C, 30% EtOH – Glicerina; **A50G**: 40°C, 50% EtOH – Glicerina; **A30S**: 40°C, 30% EtOH - Sorbitol; **A50S**: 40°C, 50% EtOH – Sorbitol; **B30G**: 30°C, 30% EtOH – Glicerina; **B50G**: 30°C, 50% EtOH – Glicerina; **B30S**: 30°C, 30% EtOH – Sorbitol; **B50S**: 30°C, 50% EtOH - Sorbitol.

Estos resultados fueron analizados mediante la prueba *t Student*, con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 3-9), evidenciando que todos los flavonoides diglicosilados presentaron cambios estadísticamente significativos a los 90 días, mientras que para la vitexina no. Un resultado similar fue reportado por Ortmann (2013) en sus investigaciones con un extracto acuoso de *Cecropia glaziovii* sometido a una temperatura de 80 °C durante 5 días, donde se observó una disminución en la concentración de flavonoides en un 75 % y un aumento de vitexina e isovitexina (89).

Tabla 3-9. Prueba de t Student evaluando los cambios de concentración de los flavonoides a 90 días.

Ho	No se detecta diferencia significativa entre la concentración de flavonoides a tiempo inicial y después de 90 días.
t crítico	2,364
t experimental flavonoides	
Orientina 2"-O-glucósido	7,581
Orientina 2"-O-xilósido	3,222
Vitexina 2"-O-glucósido	3,262
Vitexina 2"-O-xilósido	6,718
Vitexina	-2,076
Concepto	Se rechaza la Ho: se detecta diferencia significativa en las concentraciones de flavonoides diglicosilados. Se acepta la Ho para vitexina.

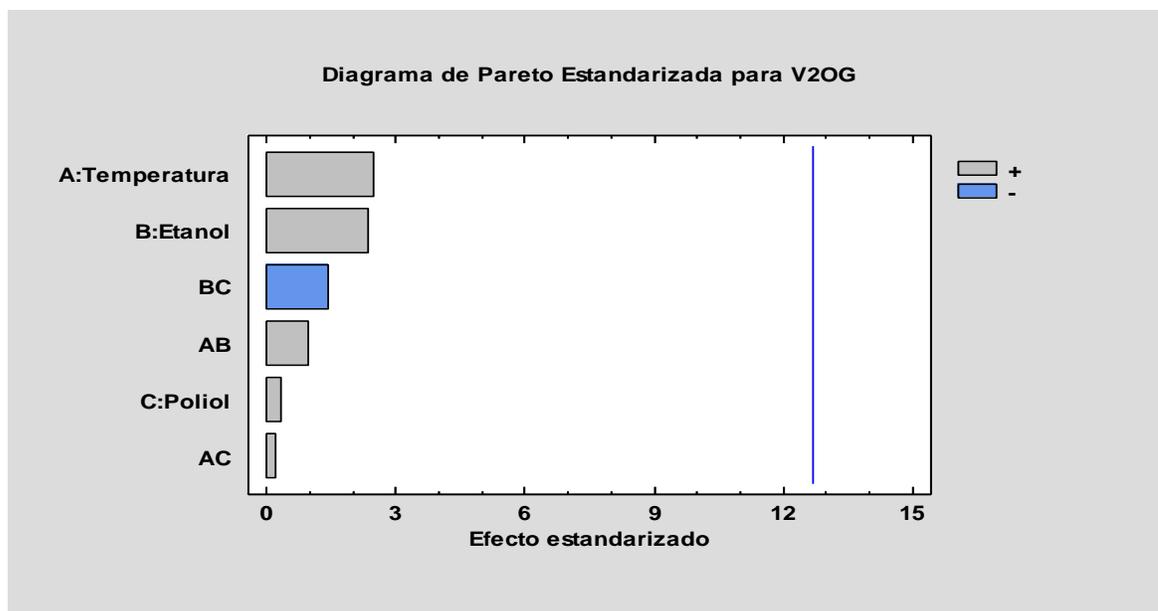
Ho: Hipótesis nula

- **Análisis del diseño estadístico experimental**

El análisis realizado al DEE mediante el software Statgraphics XVII, evaluó los cambios en cada una de las variables respuesta (considerando los resultados a cero días y 90 días): cuantificación de vitexina 2"-O-glucósido, vitexina 2"-O-xilósido, orientina 2"-O-glucósido, orientina 2"-O-xilósido, vitexina, cantidad de precipitado, cambios de color y cambios de pH. Para ninguna de las variables respuesta se evidenció que los factores evaluados tuvieran efecto significativo. Sin embargo, a partir del análisis de los efectos se definieron las condiciones más favorables respecto a la estabilidad del extracto.

En la Figura 3-13 se ilustra, a manera de ejemplo, el diagrama de Pareto estandarizado para vitexina 2"-O-glucósido, en el que se evidencia que ninguna variable del ensayo tiene efecto significativo sobre las variables respuesta estudiadas. Del análisis de los efectos se interpreta, que el extracto presentó un mayor cambio (una mayor inestabilidad) cuando se encontraba a una temperatura de 40 °C, una concentración de etanol de 50 % y en presencia de sorbitol.

Figura 3-13. Diagrama de Pareto estandarizado para vitexina 2"-O-glucósido (V2OG) en el estudio de estabilidad.



La Tabla 3-10 resume las condiciones que presentan un menor cambio de cada una de las variables respuesta, lo que indica que serían favorables para favorecer la estabilidad del extracto.

Tabla 3-10. Interpretación de los resultados del DEE respecto a las condiciones de temperatura, porcentaje de etanol y naturaleza del poliol, que favorecen la estabilidad del extracto de *P. quadrangularis*.

	Temperatura	%Etanol	Poliol
pH	30°C	50	Glicerina
Color	30°C	30	Glicerina
Precipitado	30°C	50	Sorbitol
Orientina-2O-Xilósido	30°C	30	Sorbitol
Orientina-2O-Glicósido	30°C	30	Glicerina
Vitexina-2O-Xilósido	30°C	30	Glicerina
Vitexina-2O-Glicósido	30°C	30	Glicerina
Vitexina	30°C	50	Glicerina

3.5.2 Influencia de la luz, la concentración de etanol y el tipo de poliol.

El estudio de fotoestabilidad llevado a cabo en esta investigación estuvo enfocado a demostrar si la exposición a la luz da lugar a cambios significativos en el extracto fluido de *P. quadrangularis*, aunque también se consideraron las variables de concentración de etanol (30 % y 50 %) y presencia de un poliol (glicerina y sorbitol), como en el estudio anterior.

• Evaluación del color

Como se observa en la Tabla 3-11, las muestras expuestas a la luz (C30G, C50G, C30S y C50S) evidencian un cambio mayor en la tonalidad. Flavonoides como la luteolina y la apigenina (agliconas de los flavonoides presentes en el extracto de *P. quadrangularis*) al exponerse a la luz se degradan, generando cambios en la tonalidad (94). También se observa que las muestras que presentaron mayor cambio corresponden a aquellas que tenían sorbitol como poliol (C30S y C50S), lo que podría atribuirse a que las soluciones de sorbitol pueden reaccionar con trazas metálicas, llevando a un cambio en el aspecto de la solución (82).

Tabla 3-11. Resultados de la evaluación cuali-cuantitativa del color en el extracto de *P. quadrangularis* en el ensayo de fotoestabilidad.

Tiempo	Muestras evaluadas							
	C30G	D30G	C50G	D50G	C30S	D30S	C50S	D50S
Cero días	5	5	3	3	5	5	7	7
90 días	8	6	6	3	8	5	12	6

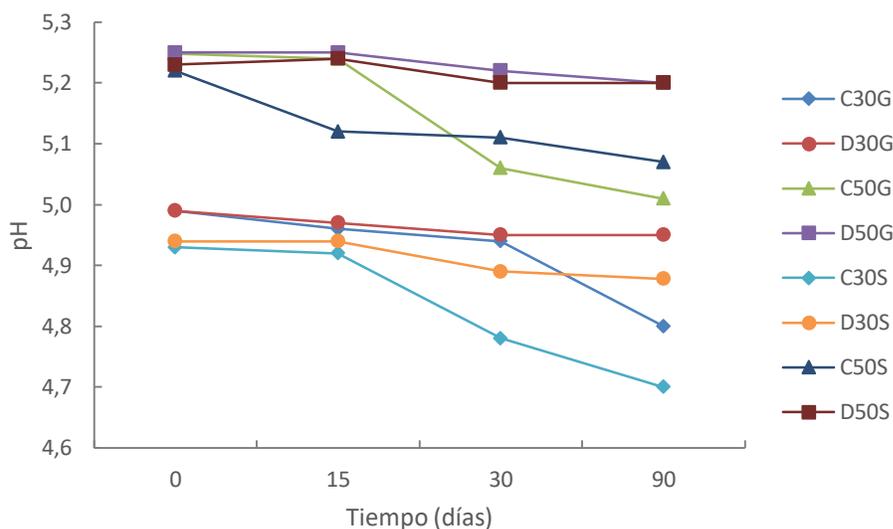
***C30G:** Luz, 30% EtOH – Glicerina; **C50G:** Luz, 50% EtOH – Glicerina; **C30S:** Luz, 30% EtOH – Sorbitol; **C50S:** Luz, 50% EtOH – Sorbitol; **D30G:** No luz, 30% EtOH – Glicerina; **D50G:** No luz, 50% EtOH – Glicerina; **D30S:** No luz, 30% EtOH – Sorbitol; **D50S:** No luz, 50% EtOH – Sorbitol.

• Evaluación del pH

Respecto al análisis del pH (Figura 3-14), las muestras expuestas a la luz (C30G, C30S, C50G y C50S) presentan una mayor variación después de 30 días que aquellas que no fueron expuestas a la luz (D30G, D30S, D50G y D50S). Al realizar la comparación estadística mediante la prueba t de Student (nivel de confianza del 95 %) para las medidas de pH a tiempos cero y 30 días expuestas a la luz, se obtuvo un $t_{\text{experimental}}$ de 3,772 ($t_{\text{crítico}}$ 2,364), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se determina que existe diferencia estadísticamente significativa. Para las muestras en ausencia de luz se obtuvo un $t_{\text{experimental}}$ de 1,684 ($t_{\text{crítico}}$ 2,364), por lo que se acepta la hipótesis nula, es decir, no se detecta diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados se encuentran en línea con el

estudio de fotoestabilidad realizado por Echeverry al extracto seco de *P. quadrangularis* (53).

Figura 3-14. Comparación del pH a los diferentes tiempos, para las diferentes composiciones a partir del extracto de *Passiflora quadrangularis*, en presencia y ausencia de luz.



C30G: Luz, 30% EtOH – Glicerina; **C50G:** Luz, 50% EtOH – Glicerina; **C30S:** Luz, 30% EtOH – Sorbitol; **C50S:** Luz, 50% EtOH – Sorbitol; **D30G:** No luz, 30% EtOH – Glicerina; **D50G:** No luz, 50% EtOH – Glicerina; **D30S:** No luz, 30% EtOH – Sorbitol; **D50S:** No luz, 50% EtOH – Sorbitol.

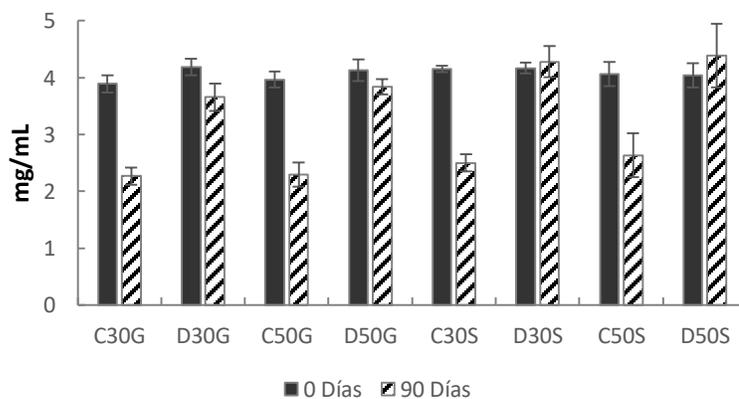
La diferencia entre las muestras con un 30 % de etanol (C30G, D30G, C30S y D30S) y las que contienen un 50 % de etanol (C50G, D50G, C50S y D50S), como se mencionó anteriormente, podría atribuirse al cambio en la constante dieléctrica del medio. Los ensayos preparados con mayor concentración (50 %) de etanol, presentan una menor capacidad de estabilizar las especies iónicas, en consecuencia, tendrán un pH mayor.

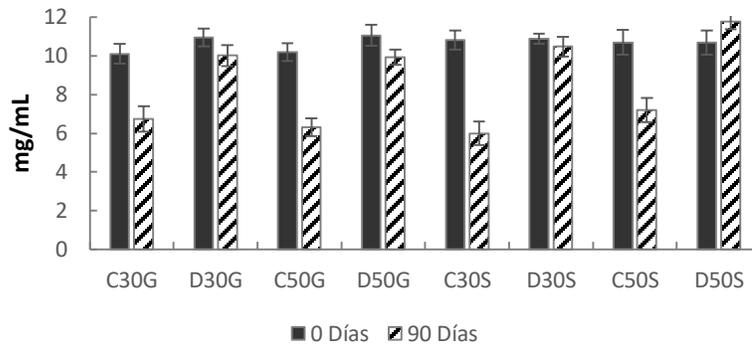
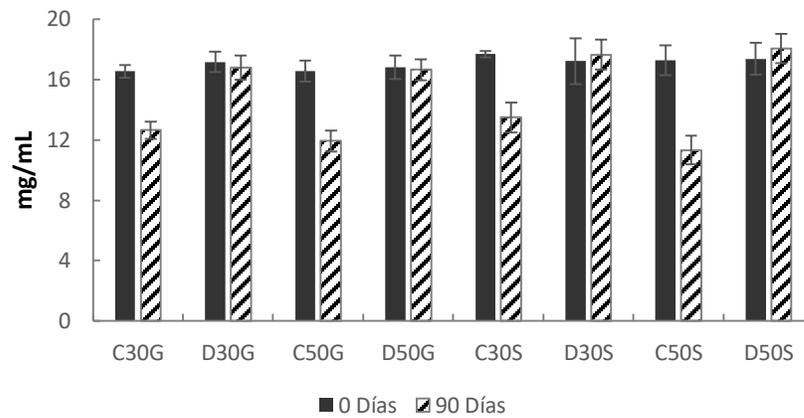
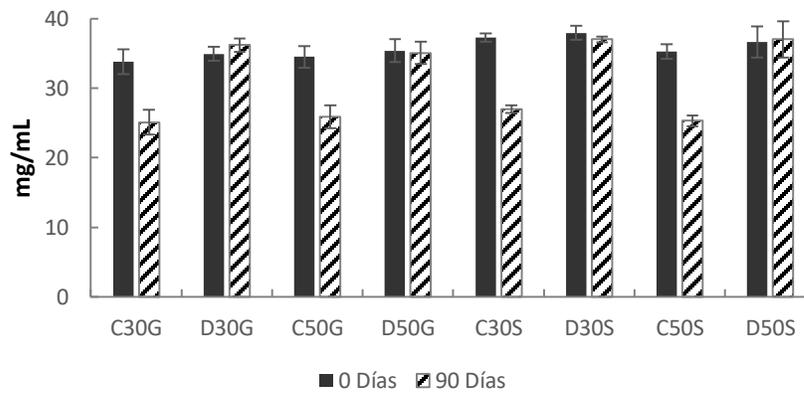
- **Cuantificación de flavonoides**

El cambio en el contenido de flavonoides (vitexina 2''-O-glucósido, vitexina 2'' -O-xilósido, orientina 2''-O-glucósido, orientina 2''-O-xilósido y vitexina), al comparar los resultados a los 90 días con el tiempo cero en presencia y ausencia de luz, se muestran en la Figura 3-15. Se observa una notable disminución en los flavonoides diglicosilados vitexina 2''-O-glucósido, vitexina 2''-O-xilósido, orientina 2''-O-glucósido y orientina 2''-O-xilósido al comparar las muestras expuestas a la luz (C30G, C50G, C30S y C50S) frente a las que estuvieron protegidas de ella (D30G, D50G, D30S y D50S). En el caso de vitexina, también se observa una disminución en las muestras expuestas a la luz y un aumento en aquellas que están protegidas.

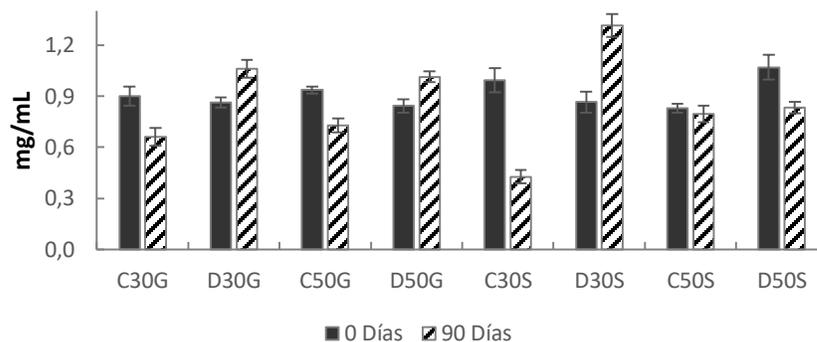
Figura 3-15. Comparación de los diferentes flavonoides presentes en el extracto fluido de *P. quadrangularis* a cero días y 90 días para las muestras evaluadas en el ensayo de fotoestabilidad. **A)** Orientina-2O-glucósido **B)** Orientina-2O-xilósido **C)** Vitexina-2O-glucósido **D)** Vitexina-2O-xilósido **E)** Vitexina.

A)



B)**C)****D)**

E)



* La concentración de flavonoides es expresada como mg-equivalente de vitexina/ mL extracto. **C30G**: Luz, 30% EtOH – Glicerina; **C50G**: Luz, 50% EtOH – Glicerina; **C30S**: Luz, 30% EtOH – Sorbitol; **C50S**: Luz, 50% EtOH – Sorbitol; **D30G**: No luz, 30% EtOH – Glicerina; **D50G**: No luz, 50% EtOH – Glicerina; **D30S**: No luz, 30% EtOH – Sorbitol; **D50S**: No luz, 50% EtOH – Sorbitol.

Como se observa en la Figura 3-15 existe degradación de los flavonoides expuestos a la luz, la que podría explicarse por las propiedades antioxidantes de los flavonoides, estudiadas ampliamente debido a su importancia nutricional y médica (95). Las plantas crecen en ambientes naturales expuestos a condiciones variables de luz en términos de radiación fotosintética activa (400 – 700 nm) y radiación ultravioleta (290 – 400 nm), por lo que poseen diferentes mecanismos fotoprotectores para tolerar la radiación solar, siendo la presencia de flavonoides uno de ellos (96).

El principal mecanismo asociado a la reacción fotoprotectora de los flavonoides se da con el oxígeno singlete. La molécula de oxígeno en su estado fundamental posee un par electrónico no apareado; cuando éste es expuesto a un exceso de energía, los electrones no apareados en el orbital externo pueden emparejarse y generar un oxígeno singlete (97). La tendencia electrofílica de dicho oxígeno hace que moléculas ricas en electrones como los flavonoides, sean su objetivo (82), siendo el ataque al doble enlace C2-C3 (por su alta densidad electrónica), la ruta más probable de su degradación por fotooxidación lo que lleva a la ruptura de los enlaces C2-C3 y C3-C4 (94).

- **Análisis del diseño estadístico experimental**

Considerando los resultados a cero días y 90 días, se realizó el análisis estadístico mediante el software Statgraphics XVII, de manera similar a lo realizado para el DEE anterior, evaluando cada una de las variables respuesta (cuantificación de vitexina 2"-O-glucósido, vitexina 2" -O-xilósido, orientina 2"-O-glucósido, orientina 2"-O-xilósido, vitexina, cambios de color, y cambios de pH). En este caso se observó que la luz tiene efecto significativo sobre la concentración de vitexina 2"-O-glucósido, vitexina 2" -O-xilósido y orientina 2"-O-glucósido. En la Figura 3-16, a manera de ejemplo, se ilustra el diagrama de Pareto estandarizado para vitexina 2"-O-glucósido, en el cual se evidencia que la exposición a la luz contribuye a la degradación de los flavonoides. A partir del análisis de efectos se proponen las condiciones que favorecen la estabilidad del extracto (Tabla 3-12) correspondientes a aquellas que presentaron una menor variabilidad (mayor estabilidad).

Figura 3-16. Diagrama de Pareto estandarizado para vitexina 2"-O-glucósido (V2OG) en el estudio de fotoestabilidad.

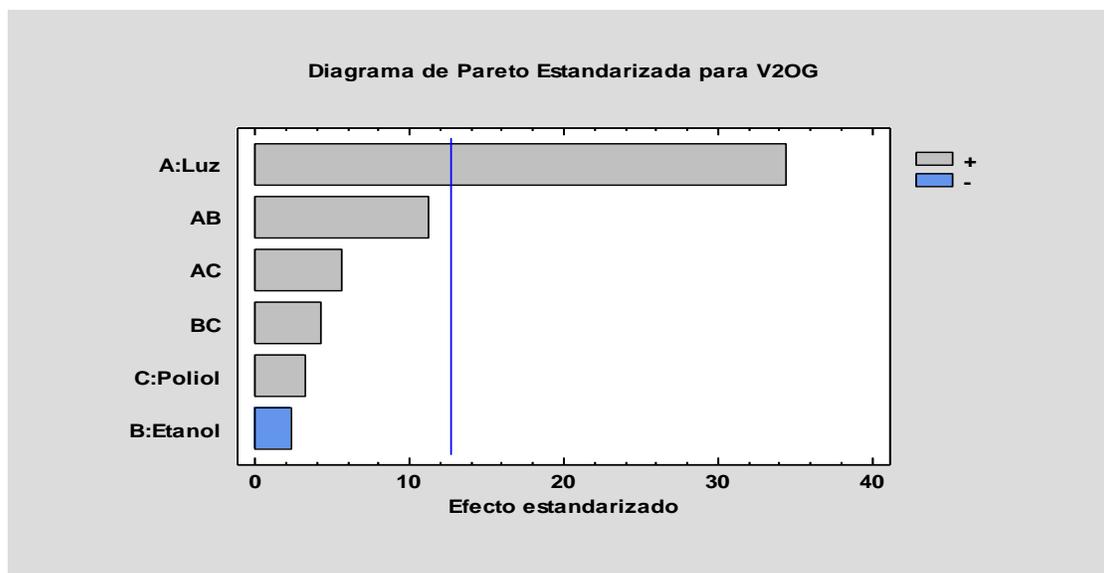


Tabla 3-12. Condiciones que favorecen la fotoestabilidad del extracto de *P. quadrangularis*.

	Luz	%Etanol	Poliol
pH	Ausencia	50	Glicerina
Color	Ausencia	30	Glicerina
Orientina-2O-Xilósido	Ausencia	30	Sorbitol
Orientina-2O-Glicósido	Ausencia	30	Glicerina
Vitexina-2O-Xilósido	Ausencia	30	Glicerina
Vitexina-2O-Glicósido	Ausencia	50	Sorbitol
Vitexina	Ausencia	50	Glicerina

Los resultados de la evaluación de fotoestabilidad, junto con los demás estudios de preformulación serán considerados más adelante en este mismo trabajo para diseñar la propuesta de formulación que se explica en el numeral 3.7.

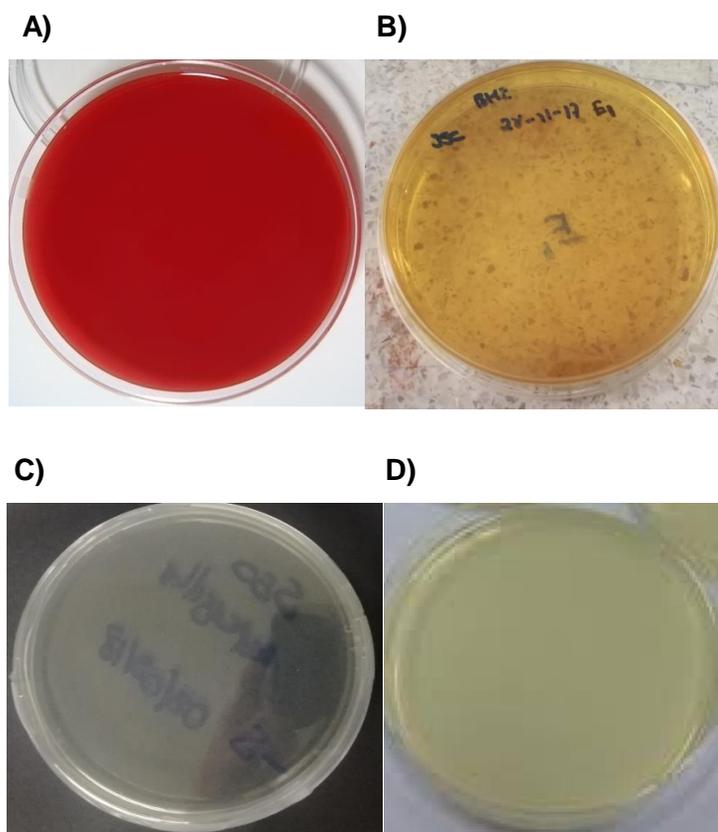
3.6 Estudio microbiológico

3.6.1 Ensayo en medios de cultivo diferenciales

Como se mencionó en la metodología, para la cuantificación de los microorganismos que pudieran estar presentes en el extracto de *P. quadrangularis* se utilizaron cuatro medios de cultivo diferentes. El agar rojo cristal violeta, que permite la identificación de coliformes; el agar sabouraud oxitetraciclina, para la identificación de hongos y levaduras; el agar plate count útil en la identificación de mesófilos y, por último, el agar infusión cerebro corazón, medio enriquecido que promueve el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. En la Figura 3-17, se muestran los agares a los que se les adicionó el

extracto fluido de *P. quadrangularis* después del tiempo de incubación. Como se observa, no se detecta crecimiento de ninguno de los microorganismos.

Figura 3-17. Resultados del análisis microbiológico del extracto fluido de *P. quadrangularis*. A) Agar rojo cristal violeta; B) Agar BHI; C) Agar Sabouraud oxitetraciclina y D) Agar plate count.



De otro lado, se realizó la comparación del contenido microbiano del extracto de *P. quadrangularis* frente al de tres fitoterapéuticos (A, B y C) disponibles en el mercado colombiano (Tabla 3-13). De acuerdo con los resultados, se destaca el producto B, dado que posee una elevada cantidad de mesófilos evidenciando inconvenientes en su sistema preservante. Por el contrario, se observa que el extracto de *P. quadrangularis* sin la adición de preservante, no permitió el crecimiento de ningún tipo de los microorganismos evaluados. Sobre esta base, se realizó la prueba de desafío microbiano al extracto sin la adición de excipientes con actividad preservante.

Tabla 3-13. Conteo de microorganismos evaluados en los medios de cultivo diferenciales.

	<i>Dilución</i>	<i>Coliformes</i>	<i>Hongos</i>	<i>Mesófilos</i>
Extracto <i>P. quadrangularis</i>	1-10	-	-	-
	1-100	-	-	-
	1-1000	-	-	-
Producto A	1-10	-	-	-
	1-100	-	-	-
	1-1000	-	-	-
Producto B	1-10	-	-	Incontables
	1-100	-	-	Incontables
	1-1000	-	-	150 UFC
Producto C	1-10	-	-	-
	1-100	-	-	-
	1-1000	-	-	-

*UFC: Unidad formadora de colonias.

3.6.2 Desafío microbiano

✓ Estandarización del inóculo inicial

En la Tabla 3-14, se relaciona el rango de densidad óptica (DO) correspondiente a valores cercanos a $1,0 \times 10^8$ UFC.

Tabla 3-14. Relación de medida de la densidad óptica con las UFC para cada uno de los microorganismos evaluados.

Microorganismo	Absorbancia	UFC
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,060 - 0,065	$0,8 - 1,1 \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,053 - 0,057	$0,6 - 0,9 \times 10^8$
<i>Escherichia coli</i>	0,048 - 0,052	$0,8 - 1,1 \times 10^8$

*UFC: Unidad formadora de colonias.

✓ Promoción del crecimiento de los medios

Una vez estandarizado el inóculo, se evaluaron los medios y condiciones propuestas en la Tabla 2-3 para desafiar el extracto y las diferentes composiciones del mismo. En la Tabla 3-15 se presenta el número de UFC obtenidas bajo las condiciones propuestas, demostrando que se promueve el crecimiento de las cepas evaluadas. Adicionalmente, se comprobó que mediante turbidimetría es posible calcular la concentración de los microorganismos, ya que todos ellos crecieron en valores cercanos a los esperados, que para este caso era de 100 UFC.

Tabla 3-15. Crecimiento de los microorganismos a las condiciones propuestas.

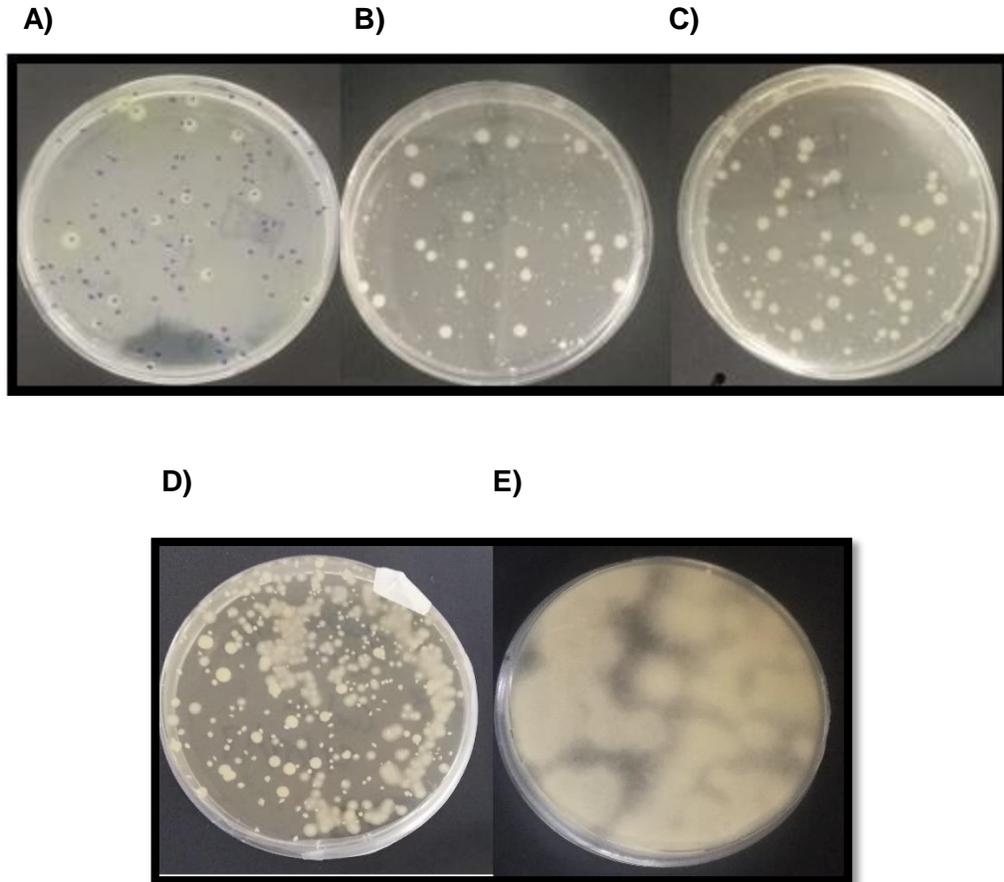
Microorganismo	UFC/mL
<i>E. coli</i>	1,09 ± 0,20 x10 ²
<i>P. aeruginosa</i>	0,84 ± 0,18 x10 ²
<i>S. aureus</i>	1,10 ± 0,25 x10 ²
<i>C. albicans</i>	0,95 ± 0,22 x10 ²
<i>A. brasiliensis</i>	1,02 ± 0,12 x10 ²

*UFC: Unidad formadora de colonias.

✓ Aptitud del método de recuento en presencia del producto

En este ensayo se determinó si alguno de los componentes presentes en el extracto interfería con el crecimiento de los microorganismos evaluados, dado que esto dificultaría el conteo en placa. En la Figura 3-18 se observa el crecimiento para las cepas bacterianas (*S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*), y para los hongos y levaduras (*C. albicans* y *A. brasiliensis*), luego de que éstas estuvieran en solución junto con el extracto de *P. quadrangularis*. Se demostró que los componentes presentes en el extracto no interfirieron en el crecimiento en placa, por lo que se puede determinar la concentración real de microorganismos presentes en el extracto. Además de esto, se demostró que la dilución en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.2 tiene la capacidad de neutralizar el etanol, permitiendo el crecimiento de los microorganismos para la realización del conteo en placa.

Figura 3-18. Crecimiento microbiano en un medio con extracto fluido de *P. quadrangularis*. A) *S. aureus* B) *E. coli* C) *P. aeruginosa* D) *C. albicans* E) *A. brasiliensis*.



✓ Prueba al producto

Luego de demostrar que se tenía la concentración inicial de microorganismos estandarizada, que las condiciones de incubación permitían el crecimiento y que era factible el conteo de microorganismos en presencia del extracto, se realizó la evaluación microbiológica del extracto fluido de *P. quadrangularis*. La Tabla 3-16, registra el recuento de microorganismos para el extracto fluido de *Passiflora quadrangularis* comparando el conteo inmediatamente inoculado, con los valores obtenidos a los 14 y 28 días; como se observa, hubo una disminución de la carga microbiana a estos tiempos.

Tabla 3-16. Resultados de la prueba de eficacia microbiana para el extracto fluido de *P. quadrangularis*

Microorganismo	0 días (UFC/mL)			14 días (UFC/mL)			28 días (UFC/mL)		
	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
<i>E. coli</i>	NC	130	7	10	2	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	NC	98	2	28	7	1	0	0	0
<i>S. aureus</i>	NC	102	8	5	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	NC	89	3	10	2	0	2	0	0
<i>A. brasiliensis</i>	NC	95	4	13	8	0	0	0	0

*NC-Incontables

*UFC: Unidad formadora de colonias.

Adicionalmente, en la Tabla 3-17 se reportan los resultados de recuento microbiano obtenidos al evaluar las cuatro composiciones del extracto, según con lo presentado en la Tabla 2-4. Para los cinco microorganismos empleados se observa disminución en el número de UFC. Según la USP 38 se considera que el producto tiene eficacia antimicrobiana, si para el caso de bacterias, se tiene una reducción logarítmica de no menos de 1,0 desde el recuento inicial. Para el caso de hongos o levaduras, no debe existir ningún incremento con respecto al recuento inicial (55).

Tabla 3-17. Resultado prueba de eficacia microbiana en los ensayos evaluados.

Formulación		<i>E. coli</i> (UFC)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC)	<i>S. aureus</i> (UFC)	<i>C. albicans</i> (UFC)	<i>A. brasiliensis</i> (UFC)
F30G	T inicial	1,08 x10 ⁶	0,90 x10 ⁶	0,85 x10 ⁶	0,95 x10 ⁶	1,10 x10 ⁶
	28 días	≤ 1,0 x10 ³	≤ 1,0 x10 ³	≤ 2,0 x10 ³	≤ 5,0 x10 ⁴	≤ 2,0 x10 ⁴
F30S	T inicial	1,01 x10 ⁶	0,75 x10 ⁶	0,95 x10 ⁶	1,15 x10 ⁶	1,15 x10 ⁶
	28 días	≤ 2,0 x10 ³	≤ 3,0 x10 ³	≤ 1,0 x10 ³	≤ 3,0 x10 ⁴	≤ 1,0 x10 ⁴
F50G	T inicial	0,90 x10 ⁶	0,75 x10 ⁶	1,17 x10 ⁶	1,25 x10 ⁶	0,95 x10 ⁶
	28 días	≤ 1,0 x10 ³	≤ 1,0 x10 ³	≤ 6,0 x10 ³	≤ 1,0 x10 ⁴	≤ 2,0 x10 ⁴
F50S	T inicial	1,25 x10 ⁶	1,01 x10 ⁶	0,88 x10 ⁶	1,02 x10 ⁶	0,70 x10 ⁶
	28 días	≤ 1,0 x10 ³	≤ 2,0 x10 ³	≤ 5,0 x10 ³	≤ 4,0 x10 ⁴	≤ 1,0 x10 ⁴
Control	T inicial	0,85 x10 ⁶	0,92 x10 ⁶	1,15 x10 ⁶	0,85 x10 ⁶	1,00 x10 ⁶
	28 días	NC	NC	NC	NC	NC

*NC-Incontables

***F30G**: Flavonoides 5%, Etanol 30% y Glicerina 5%; **F50G**: Flavonoides 5%, Etanol 30% y Sorbitol 5%; **F30S**: Flavonoides 5%, Etanol 30% y Glicerina 5%; **F50S**: Flavonoides 5%, Etanol 30% y Sorbitol 5%.

*UFC: Unidad formadora de colonias.

De acuerdo con esto, las formulaciones evaluadas cumplen con el criterio de eficacia antimicrobiana. Este comportamiento podría atribuirse a diferentes factores. Uno de ellos es la presencia de etanol en la formulación, que reduce la tensión superficial de la pared celular del microorganismo facilitando la desnaturalización proteica. Sin embargo, se sabe que el máximo de eficacia antibacteriana del etanol ocurre a concentraciones entre el 60 % y el 80 %, valores superiores a las concentraciones de etanol empleadas en las diferentes composiciones del extracto. Esto lleva a considerar que el extracto de *P. quadrangularis* tendría un efecto preservante, independiente de la presencia de etanol.

En este sentido, los estudios fitoquímicos realizados a *P. quadrangularis* muestran la presencia de metabolitos secundarios (polifenoles, flavonoides, terpenos, saponinas, taninos, etc), podría dar una explicación preliminar sobre su actividad antibacteriana (48,99,100). Algunos de ellos, como los flavonoides, han demostrado efectos antimicrobianos, antivirales, antioxidantes y antineoplásicos, entre otros (101).

Igualmente, para especies de la familia Passifloraceae se han reportado estudios relacionados con la temática, entre los que se destacan:

- Extracto hidroalcohólico de *Passiflora cincinnata*, en el que se demostró su potencial como agente antibacteriano en combinación con otros antibióticos; esta actividad es atribuida a la acción de los compuestos fenólicos presentes (102).
- Extracto de hojas de *Passiflora tetrandra*, se identificó 4-hidroxi-2-ciclopentenona como compuesto activo frente a bacterias gramnegativas y grampositivas (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*); esta actividad se atribuye a la alquilación, por la reacción de Michael, de los grupos sulfhidrilo (-SH) de algunas enzimas reguladoras (103).
- Extracto metanólico de *Passiflora edulis*, se determinó que en concentraciones entre 128 y 1024 µg/ml inhibió el crecimiento del 89,5 %, de un panel de 19 bacterias gramnegativas (104).
- Extracto de *Passiflora edulis* Sims, se identificaron proteínas pertenecientes a la familia de la albúmina 2S, que presentaban actividad antifúngica frente a *C. lindemuthianum*, *C. musae*, *F. oxysporum* y *S. cerevisiae*, estas proteínas producen una inhibición de la germinación conidial y del alargamiento hifal (105). También, se evidenció la inhibición de la acidificación del medio, lo que lleva a una inhibición del crecimiento por la alteración de la membrana plasmática (106,107).

En síntesis, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y la evidencia disponible en la literatura, en términos generales, el extracto de *P. quadrangularis* y las diferentes composiciones evaluadas presentan actividad antimicrobiana sin la adición de excipientes con actividad preservante. Este argumento permite el desarrollo de un fitoterapéutico, como un “producto más natural” como se expresa en las necesidades del paciente.

3.7 Propuesta de la formulación del producto y del proceso de fabricación

3.7.1 Formulación del producto

A partir de la información obtenida en los ensayos de preformulación (estabilidad frente a temperatura, tipo de poliol, concentración de etanol, fotoestabilidad y desafío microbiano) y del análisis estadístico correspondiente, se propone una formulación para el producto fitoterapéutico que se pretende desarrollar. En la Tabla 3-18 se presentan cada una de las variables respuesta estudiadas (pH, color, precipitado, Orientina-2O-Xilósido, Orientina-2O-Glucósido, Vitexina-2O-Xilósido, Vitexina-2O-Glucósido, flavonoides totales), asignando a cada una de ellas un porcentaje que representa su influencia en el perfil de calidad del producto. Igualmente, se incluyen las condiciones más favorables para la estabilidad del producto que fueron determinadas a partir de los DEE utilizados en los estudios de estabilidad térmica y de fotoestabilidad.

El porcentaje de influencia fue estimado según la importancia de cada una de estas variables en el perfil de calidad del producto, dando un valor mayor a pH, vitexina-2O-xilósido y a flavonoides totales, cada uno con un 20 %. Lo anterior se justifica en que cambios en el pH afectan la estabilidad de los flavonoides comprometiendo así su eficacia. Por su parte, vitexina-2O-xilósido es el principal componente al que se le atribuye la actividad ansiolítica y para el caso de los flavonoides totales, al no tener la cantidad necesaria también se puede ver comprometida la eficacia del producto, debido a que al ser el extracto un sistema multicomponente la actividad depende de todos sus compuestos presentes.

Tabla 3-18. Condiciones favorables para la estabilidad del extracto de *P. quadrangularis*, derivadas de los estudios realizados frente a la temperatura y a la luz, para cada una de las variables respuesta estudiadas.

Variable respuesta	Influencia (%)	Estudio de fotoestabilidad			Estudio de estabilidad frente a la temperatura		
		Luz	Etanol (%)	Poliol	T (°C)	Etanol (%)	Poliol
pH	20	Ausencia	30-50	Glicerina	30	50	Sorbitol
Color	5	Ausencia	50	Sorbitol	30	30-50	Sorbitol
Precipitado	5	-	-	-	30	50	Sorbitol
Orientina-2O-xilósido	10	Ausencia	30-50	Glicerina	30	30	Sorbitol
Orientina-2O-glicósido	10	Ausencia	30	Glicerina	30	30	Glicerina
Vitexina-2O-xilósido	20	Ausencia	30	Glicerina	30	30	Sorbitol
Vitexina-2O-glicósido	10	Ausencia	50	Glicerina	30	30	Glicerina
Flavonoides totales	20	Ausencia	30	Sorbitol	30	30	Glicerina

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad y teniendo en cuenta la ponderación explicada anteriormente, para el 100 % de las variables respuesta se prefiere una temperatura en su nivel bajo (30 °C); y para un 70 % de ellas (orientina-2O-xilósido, orientina-2O-glicósido, vitexina-2O-xilósido, vitexina-2O-glicósido y flavonoides totales) es recomendable una concentración baja de etanol (30 %). La glicerina y el sorbitol tienen porcentajes iguales de recomendación (50 % cada uno) respecto a su inclusión dentro de la formulación final del producto mantienen la estabilidad en el 50 % de las variables evaluadas.

A partir de las conclusiones obtenidas del estudio de fotoestabilidad, para todas las variables evaluadas se prefiere la protección a la luz para garantizar la estabilidad del producto. En el caso de etanol, para el 40 % de las variables respuesta (orientina-2O-glicósido, vitexina-2O-xilósido y flavonoides totales) una concentración del 30 % favorece la estabilidad. El poliol que se recomienda en mayor medida (70 % de las variables respuesta) es glicerina.

En síntesis, en la Tabla 3-19 se propone la formulación para un producto fitoterapéutico, en gotas orales de un extracto de *Passiflora quadrangularis*.

Tabla 3-19. Propuesta de formulación cuali-cuantitativa de un producto fitoterapéutico en gotas orales a partir del extracto hidroalcohólico de *P. quadrangularis*.

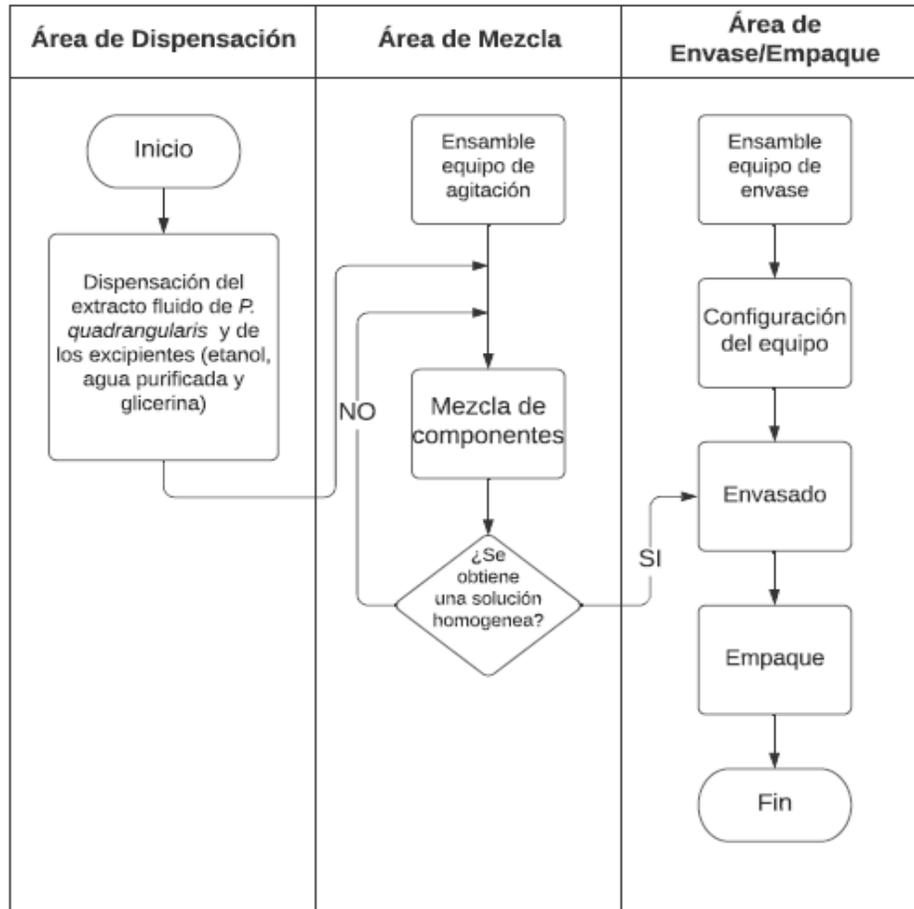
Componentes	Cantidad
Extracto	10 g
Etanol (96 %)	30 g
Glicerina	5 g
Agua purificada	c.s.p. 100 mL

Para la formulación se decidió utilizar etanol en una concentración de 30 %. Esta condición, además de que favorece la estabilidad de los flavonoides, que son los principales responsables de la actividad farmacológica, presenta una mejor aceptabilidad organoléptica con respecto a las formulaciones con un mayor contenido de etanol (50 %) y desde el punto de vista microbiológico, no se encuentra diferencia en el comportamiento de las concentraciones. La glicerina fue seleccionada como poliol dado que porque contribuye a mantener la estabilidad de los componentes presentes en el extracto y cumple las funciones de cosolvente, regulador de la evaporación; igualmente mejora la aceptabilidad organoléptica del producto.

3.7.2 Proceso de fabricación

En la Figura 3-19 se propone un proceso para la fabricación del producto fitoterapéutico propuesto, en el cual se involucran las etapas de dispensación de las materias primas, la mezcla de componentes, el envasado del granel y el empaque.

Figura 3-19. Diagrama de un proceso para la preparación de gotas orales a base de extracto de *P. quadrangularis*.



3.8 Análisis de riesgos asociados a la formulación y al proceso de fabricación.

Para el desarrollo de las gotas orales a partir del extracto hidroalcohólico de *P. quadrangularis* siguiendo QbD, es necesario identificar la influencia que tienen los materiales de partida y el proceso productivo en el cumplimiento de los estándares de

calidad propuestos. Con este propósito, en el presente trabajo se utilizó la metodología de análisis de riesgos.

Se conoce que en un producto farmacéutico todos los componentes tienen una función y con esto, un papel importante en la calidad del producto. Sin embargo, algunos de ellos resultan más determinantes. Para su identificación se empleó una matriz RAMM con una escala de ponderación en la que se asigna un valor de 1, 3 o 9, dependiendo de la importancia que tiene cada componente de la formulación en el cumplimiento de cada uno de los atributos de calidad del fitoterapéutico. El valor ponderado, es decir el que determina la criticidad del material de partida, corresponde a la sumatoria del producto entre el valor que se le asignó y el valor de criticidad de cada atributo de calidad. Para facilitar la interpretación, se utilizó un código de colores en el que los componentes de alta criticidad se resaltan con color rojo, los de mediana criticidad con color amarillo y los de baja criticidad con color verde.

Así, de acuerdo con los resultados que se presentan en la Tabla 3-20, el extracto de *P. quadrangularis* es la materia prima que presenta la mayor criticidad y define en gran medida el cumplimiento de los estándares de calidad. Además, otros componentes como el etanol y el envase tienen una criticidad media, por tanto, debe prestárseles atención durante el desarrollo del producto.

El extracto de *P. quadrangularis* tiene como principales especificaciones el aspecto, el índice de refracción, el pH y el contenido de flavonoides. Es interesante notar que para la especificación de calidad del extracto, el contenido de flavonoides podría ser considerada la propiedad más importante, es decir, aquella que resulta innegociable en su cumplimiento cuando se realice el escalamiento del producto a nivel industrial.

El etanol tiene una criticidad media debido a que cambios en su concentración podrían tener impacto en la solubilidad de los componentes del extracto y en menor grado en la estabilidad microbiológica. Para el envase su criticidad está fundamentada en la protección a la luz por la fotolabilidad del extracto, evidenciada en los estudios de preformulación. Por eso se hace necesario en el escalamiento, realizar pruebas de compatibilidad del envase con el extracto para hacer una adecuada selección de este.

Tabla 3-20. Matriz RAMM para el análisis de la criticidad de cada uno de los componentes de la formulación gotas orales a partir de extracto de *P. quadrangularis*.

Material De Partida	Propiedades organolépticas			Propiedades fisicoquímicas			Identidad	Potencia	Microbiológico	Estabilidad	Ponderación
	Aspecto	Color	Sabor	Viscosidad	pH	I. Refracción					
	9	3	1	1	3	1	9	9	3	9	
Etanol	1	1	3	1	1	1	1	1	9	9	146
Extracto	9	9	3	3	9	9	9	9	3	1	330
Glicerina	1	1	9	3	1	1	1	1	3	3	82
Agua	1	1	1	1	1	1	1	1	9	3	90
Envase	3	1	1	1	1	1	1	1	3	9	144

Luego de evaluar el impacto que tienen las materias primas en la formulación, se realizó un análisis similar para identificar las etapas del proceso productivo propuesto que resultan críticas en el cumplimiento de las especificaciones de calidad del producto fitoterapéutico desarrollado. Como se presenta en la Tabla 3-21, la etapa de mezcla resulta ser la más crítica, y las etapas de dispensación y envase son calificadas como de mediana criticidad.

Tabla 3-21. Matriz RAMM para el análisis de la criticidad de cada una de las etapas del proceso de fabricación de gotas orales a partir de extracto de *P. quadrangularis*.

Material De Partida	Propiedades organolépticas			Propiedades fisicoquímicas			Identidad	Potencia	Microbiológico	Estabilidad	Ponderación
	Aspecto	Color	Sabor	Viscosidad	pH	I. Refracción					
	9	3	1	1	3	1	9	9	3	9	
Dispensacion	1	3	3	3	9	3	9	3	3	1	180
Mezcla	9	9	3	9	3	9	1	9	1	1	240
Envase	3	1	1	1	1	1	1	1	9	9	162
Empaque	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	84

Este análisis de criticidad fue complementado con el análisis de riesgo del proceso, para lo que fue empleada la herramienta de Análisis de Fallas y Efectos (FMEA, Failure Mode and Effect Analysis). Como se observa en la Tabla 3-22, el análisis se encuentra detallado para cada una de las sub-etapas del proceso de fabricación y se fundamenta en la experiencia adquirida durante la preparación de la formulación a escala laboratorio empleando los equipos disponibles en el laboratorio de Farmacia Industrial de la Universidad Nacional de Colombia (llenadora y dosificadora marca ERWEKA® FDS N° 23797, agitador eléctrico EKATO-WERK® N° 61/04309 y un tanque de acero inoxidable de 8 L). Por último, las estrategias de mitigación del riesgo están planteadas como una proyección a la etapa siguiente del escalamiento, que es la preparación de lotes piloto.

Tabla 3-22. Análisis de riesgo para el proceso de fabricación del producto gotas orales de *Passiflora quadrangularis*.

Etapa de Dispensación	Identificación del riesgo	Valoración del riesgo							Evaluación del riesgo	Control del problema
		Análisis del riesgo								
Subetapa de proceso	¿Qué puede salir mal?	Posibles consecuencias	Causas Imaginables	Actividades de control	O	S	D	NPR		
Análisis de control de calidad de las materias primas	Que el producto no cumpla con los requisitos de identidad, potencia y pH.	Retrabajo del producto (3). Rechazo del producto (3). Eliminación del lote (9).	Confusión en la identificación de extracto fluido (9). Confusión en la selección de excipientes (3).	Rotulación y almacenamiento correcto de las materias primas (1).	3	9	1	27	SI	No aplica.
Selección de las materias primas en bodega			Diferencias propias del material vegetal antes de la extracción (3). Degradación del extracto (9).	No (9).	3	9	9	243	No	Verificación del protocolo de extracción previo. Documentación del protocolo de extracción. Generación de protocolo para la evaluación fisicoquímica del extracto. Inspección del extracto por parte del funcionario.
Pesaje de las materias primas			Error al momento de realizar la pesada (3). Balanzas descalibradas (3). Error cálculos de la cantidad de materia prima (3).	Revisión periódica de la calibración (3). Verificación por parte del operario (3).	3	9	3	81	No	Verificación de los cálculos por otro funcionario. Procedimiento para la generación de documentos obligatoria para verificar los cálculos. Verificación del peso por otro funcionario.

*NPR: Número Prioritario de Riesgo

*O: Ocurrencia, calificada en una escala 1, 3, 9 según la estimación de que un evento no ocurra, ocurra esporádicamente u ocurra con frecuencia, respectivamente.

*S: Severidad, calificada en una escala 1, 3, 9 según si se estima un impacto bajo, medio o elevado para la calidad del producto o para el desempeño eficiente de la línea de producción.

*D: Detectabilidad, calificada en una escala 1, 3, 9 según si podrían existir controles del proceso que funcionan eficientemente, si los controle posibles no resultan adecuados o si no se cuenta con mecanismos de control, respectivamente.

Tabla 3-22. Análisis de riesgo para el proceso de fabricación del producto gotas orales de *Passiflora quadrangularis*. Continuación

Etapa de Mezcla	Valoración del riesgo								Control del problema	
	Identificación del riesgo	Análisis del riesgo								Evaluación del riesgo
Subetapa de proceso	¿Qué puede salir mal?	Posibles consecuencias	Causas Imaginables	Actividades de control	O	S	D	NPR	¿Es aceptable el riesgo?	
Ensamble del equipo	Que el producto no cumpla con los requisitos de aspecto, color, viscosidad, índice de refracción y potencia.	Retrabajo del producto (3). Rechazo del producto (3). Eliminación del lote (9). Degradación del extracto (9).	El agitador seleccionado no es el adecuado (3). Posición del agitador no es la correcta (3). Tanque incorrecto (9).	No (9).	3	9	1	27	SI	No aplica
Iniciar equipo			La velocidad no es ajustada correctamente al iniciar el equipo (3).	Verificación por parte del operario (3).	3	3	9	81	No	Registrar velocidad de mezclado. Configuración en una única velocidad de mezclado. Capacitación al operario en el uso del equipo.
Mezcla			Tiempo de agitación no es el correcto (9). Tiempo de exposición a la luz (3). Cantidad de material no es correcta (3). Temperatura no adecuada (3).	Verificación por parte del operario (3). No hay control para el tiempo de agitación, ni para el control de temperatura (9)	3	9	9	243	No	Verificación del funcionamiento antes del inicio. Registro de la hora de inicio y fin de la agitación. Cubrir los equipos o uso de lámparas de sodio. Generar documentación para el control de temperatura. Registro de temperatura durante el proceso.
Detener el equipo			Ninguna (1).	No (9).	1	1	9	9	SI	No aplica

*NPR: Número Prioritario de Riesgo

*O: Ocurrencia, calificada en una escala 1, 3, 9 según la estimación de que un evento no ocurra, ocurra esporádicamente u ocurra con frecuencia, respectivamente.

*S: Severidad, calificada en una escala 1, 3, 9 según si se estima un impacto bajo, medio o elevado para la calidad del producto o para el desempeño eficiente de la línea de producción.

*D: Detectabilidad, calificada en una escala 1, 3, 9 según si podrían existir controles del proceso que funcionan eficientemente, si los controle posibles no resultan adecuados o si no se cuenta con mecanismos de control, respectivamente.

Tabla 3-22. Análisis de riesgo para el proceso de fabricación del producto gotas orales de *Passiflora quadrangularis*. Continuación

Etapa de Envase	Valoración del riesgo								Control del problema	
	Identificación del riesgo	Análisis del riesgo								Evaluación del riesgo
Subetapa de proceso	¿Qué puede salir mal?	Posibles consecuencias	Causas Imaginables	Actividades de control	O	S	D	NPR	¿Es aceptable el riesgo?	Estrategias para mitigación del riesgo
Ensamble del equipo	Que el producto no cumpla con los requisitos de aspecto, estabilidad y calidad microbiológica.	Retrabajo del lote (3).	Error en la selección de la boquilla dosificadora (3). Mala calibración del contenido por unidad (3).	No (9).	3	3	9	81	No	Generación de documentación para el ensamble del equipo. Capacitación del operario en la calibración del equipo.
Iniciar equipo			Ninguna (1).	Verificación por parte del operario (3).	1	3	3	27	SI	No aplica.
Envasado			Velocidad de llenado no correcta (9). Tiempo de exposición a la luz (3). Incorporación de aire, mayor presencia de oxígeno (3).	Verificación del funcionamiento antes del inicio. (3). No hay control para la velocidad de llenado (9).	3	9	9	243	No	Verificación del funcionamiento antes del inicio. Registro de la velocidad de llenado. Entrenar al operario en la actividad específica.
Detener el equipo			Ninguna (1).	No (9).	1	1	9	9	SI	No aplica.

*NPR: Número Prioritario de Riesgo

*O: Ocurrencia, calificada en una escala 1, 3, 9 según la estimación de que un evento no ocurra, ocurra esporádicamente u ocurra con frecuencia, respectivamente.

*S: Severidad, calificada en una escala 1, 3, 9 según si se estima un impacto bajo, medio o elevado para la calidad del producto o para el desempeño eficiente de la línea de producción.

*D: Detectabilidad, calificada en una escala 1, 3, 9 según si podrían existir controles del proceso que funcionan eficientemente, si los controle posibles no resultan adecuados o si no se cuenta con mecanismos de control, respectivamente.

Una vez se realiza el análisis detallado de cada etapa del proceso, es útil priorizar la gravedad del riesgo con el propósito de disponer de elementos de juicio respecto a su impacto en la calidad del producto, así como en el nivel de atención que debe prestarse al momento de su estandarización, entrenamiento del personal y registro en la documentación de cada lote. Para tal fin, los números de prioridad del riesgo obtenidos en la matriz FMEA, fueron comparados con una escala arbitraria (Tabla 3-23) que permite su clasificación como de alta, media o baja gravedad.

De acuerdo con lo anterior, se identificaron tres subetapas del proceso que son críticas para alcanzar los objetivos de calidad del producto: la caracterización inicial del extracto fluido de *P. quadrangularis*, el tiempo de exposición a la luz durante la etapa mezcla y la incorporación de aire durante la etapa de envase.

Tabla 3-23. Criterios para la estimación de la gravedad de los riesgos identificados para el proceso de fabricación del producto gotas orales de *Passiflora quadrangularis*.

Gravedad del riesgo	Color de identificación	Umbral (NPR)	Observaciones
Alta		≥ 200	Aspecto clave a tener en cuenta en la estandarización del proceso. Podría requerirse la definición de espacios de diseño. El personal involucrado en su realización debe ser advertido y entrenado, acerca de las condiciones de trabajo. Punto crítico de control. Se requiere registro de la condición de trabajo empleada en la fabricación de cada lote.
Media		50-100	Aspecto a tener en cuenta en la estandarización del proceso definiendo condiciones de trabajo específicas. No es necesario establecer espacios de diseño. El personal involucrado en producción debe reconocer la importancia de este aspecto. No se requiere registro de la condición de trabajo empleada para cada lote.
Baja		≤ 49	Aspecto a tener en cuenta en el entrenamiento del personal involucrado en la etapa del proceso.

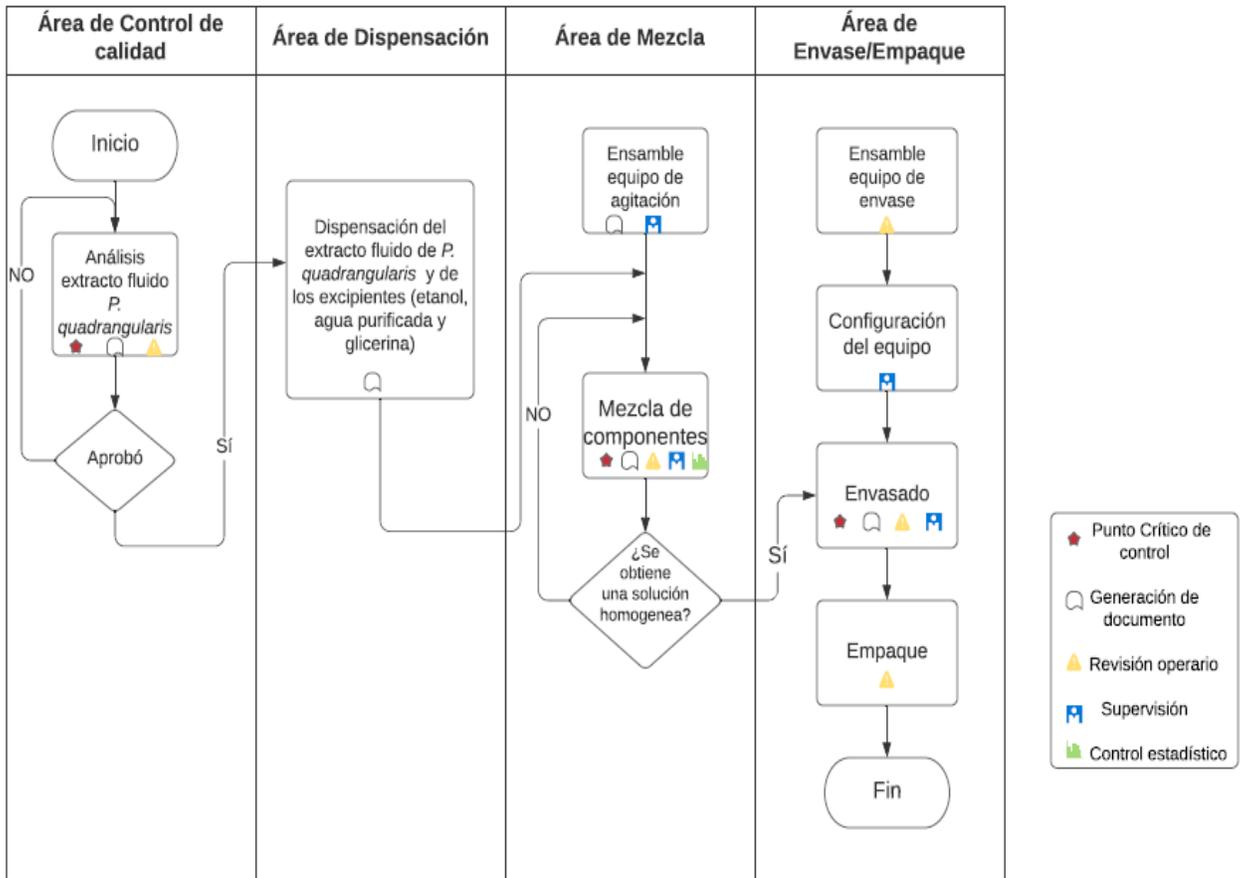
*NPR: Número Prioritario de Riesgo

Así en la Figura 3-20 se presenta una nueva propuesta de proceso de fabricación basada en los resultados del análisis de riesgo efectuados. La dispensación del extracto fluido de *P. quadrangularis* como materia prima constituye un punto crítico, por lo que es necesario implementar controles para disminuir los riesgos. Para ello, se recomienda realizar una caracterización básica del extracto que permita asegurar sus características de calidad. Se propone la evaluación del índice de refracción, el pH y la cuantificación de los flavonoides.

En la etapa de mezcla es indispensable asegurar el correcto ensamble del equipo, mediante la capacitación al operario. Así mismo, debe garantizarse el registro de las condiciones de operación empleadas en la fabricación de cada lote, es decir, la velocidad de agitación, que debe ser a bajas revoluciones para evitar incorporar aire, el tiempo y el control de temperatura. Adicionalmente, se recomienda implementar estrategias para la supervisión del operario en esta etapa, por ejemplo, la revisión de la documentación. Respecto al tiempo de exposición del producto a la luz, se busca contar con tanques de acero inoxidable, preferiblemente cerrados. Además, capacitar al operario acerca de la importancia de la fotosensibilidad de la formulación.

La etapa de llenado es un proceso semiautomático, ya que la alimentación de la tolva, así como el cambio de envase, deben ser realizados por un operario. Por esta razón, se debe contar con protocolos del proceso, que orienten el desarrollo de esta actividad en forma eficiente. Igualmente, deben registrarse los tiempos de operación y durante la capacitación del operario, debe enfatizarse en los cuidados requeridos para evitar la fotodegradación del producto.

Figura 3-20. Diagrama del proceso con los puntos críticos y las estrategias de control para la obtención de gotas orales de extracto de *P. quadrangularis*.



3.9 Evaluación de la estabilidad de la formulación seleccionada y fabricada bajo las condiciones establecidas para el proceso

Los lotes de producto fitoterapéutico a base de *P. quadrangularis* fueron investigados respecto a su estabilidad a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ durante un mes. El análisis de los resultados se realizó por comparación del contenido de flavonoides mediante pruebas de similitud de los perfiles fitoquímicos obtenidos por CLAE, con el fin de comprobar que la formulación propuesta mantiene la estabilidad de sus componentes activos. Tal como se observa en la Figura 3-21, en la que se realiza la comparación de extracto remanente, expresado como cada uno de los seis marcadores analíticos, no se detecta una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la concentración de cada uno de ellos. Respecto a la prueba de similitud f_2 , se obtuvo un valor de 79,23, el que al ser mayor de 50 indica que los perfiles no presentan una variación mayor al 10 % en los flavonoides presentes en el extracto (orientina-2O-xilósido, orientina-2O-glicósido, vitexina-2O-xilósido, vitexina-2O-glicósido, vitexina e isovitexina). De manera complementaria, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de la formulación final; en la Tabla 3-24 se presentan la comparación de los valores de densidad, índice de refracción y pH a tiempo 0 y después de un mes. Estos resultados confirman la estabilidad de la formulación de gotas orales para el extracto de *P. quadrangularis*, bajo las condiciones estudiadas

Figura 3-21. Comparación del porcentaje de extracto remanente para cada uno de los seis marcadores seleccionados vitexina-2-O-xilósido (Vi-O-Xil), vitexina-2-O-glucósido (Vi-O-Glc), orientina-2-O-xilósido (Or-O-Xil) y orientina-2-O-glucósido (Or-O-Glc), vitexina (Vi) e iso-vitexina (Iso-Vi) a una concentración de 25 $\mu\text{L/mL}$, a tiempo cero y 30 días.

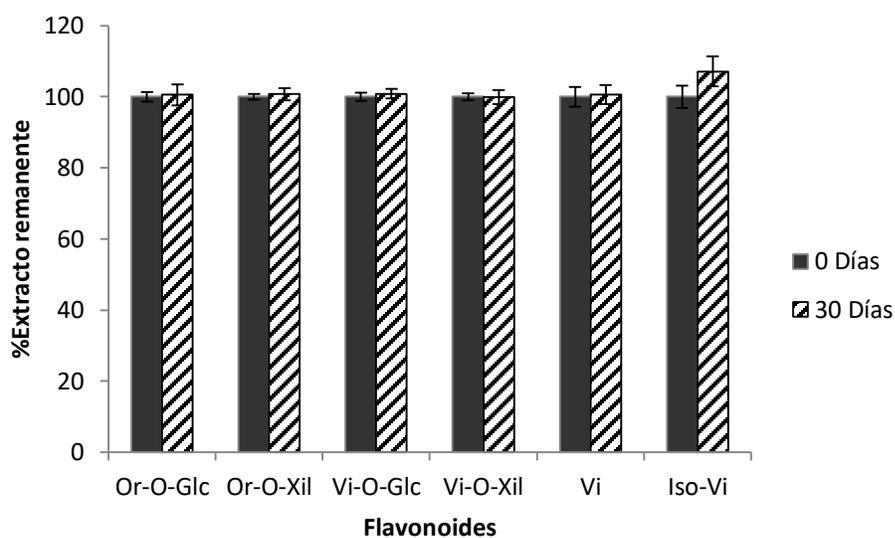


Tabla 3-24. Características fisicoquímicas de la formulación de gotas de *P. quadrangularis*

Propiedad fisicoquímica	Resultado	
	0 días	90 días
Densidad (g/mL)	0,998 \pm 0,004	0,998 \pm 0,003
pH	4,95 \pm 0,018	5,01 \pm 0,018
Índice de refracción	1,3532 – 1,3649	1,3590 – 1,3630

* Número de réplicas analíticas n=5. Los datos se presentan como la media de las observaciones \pm error estándar.

4. Conclusiones

- Este trabajo permitió la implementación de algunos de los principios del enfoque de QbD, para el desarrollo de un producto fitoterapéutico líquido de administración oral, a partir de un extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis*.
- A partir del conocimiento adquirido a través de la revisión bibliográfica, así como de la información suministrada por los clientes interno y externos, se estableció el perfil de calidad del producto y los atributos críticos de calidad, siendo estos el punto de partida que orientó las etapas siguientes en su desarrollo.
- Dentro de las actividades de preformulación y formulación, se caracterizó fisicoquímicamente el extracto fluido de *P. quadrangularis*, profundizando el conocimiento hasta ahora disponible por el grupo de investigación en Tecnología de Productos Naturales. El estudio de estabilidad del extracto frente a la temperatura, concentración de etanol y a la adición de un poliol, evidenció que ninguno de estos factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre los atributos evaluados, mientras que el estudio frente a la luz, concentración de etanol y adición de un poliol, determinó que la exposición a la luz lo afecta de manera estadísticamente significativa, siendo un factor a controlar durante el manejo del extracto como materia prima y en el proceso de fabricación de producto. Los ensayos microbiológicos realizados al extracto y al producto demostraron su capacidad de autopreservación debido a su composición y a la concentración de etanol.
- A partir del perfil del producto, los atributos críticos de calidad y los ensayos de preformulación, se definió una formulación cuali-cuantitativa y se propuso un

proceso de fabricación con miras a un posible escalamiento en el Laboratorio de Farmacia Industrial del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

- Los análisis de riesgos realizados permitieron identificar como material crítico de la formulación del producto, al extracto de *P. quadrangularis* y como etapas críticas del proceso la mezcla de componentes y al envasado del producto. A partir de este análisis, se establecieron estrategias de control que deben considerarse al momento de realizar una posterior transferencia de tecnología para el producto en desarrollo.

5. Recomendaciones

El trabajo presentó como uno de los resultados la propuesta de un proceso para la fabricación a escala laboratorio de las gotas orales del extracto de *P. quadrangularis*, por lo tanto, para continuar con la implementación del enfoque de QbD, es necesaria la transferencia tecnológica del proceso productivo hasta llegar a la escala industrial. A estos niveles, la información recopilada y el análisis de riesgos permitirán evaluar cómo las variaciones que se hagan afectan los atributos críticos de calidad del producto. Esto llevará a la definición de los espacios de diseño y a establecer las estrategias de control, en las nuevas condiciones de producción.

Teniendo en cuenta que el extracto fluido de *P. quadrangularis* es de naturaleza fotolábil y es la materia prima más importante según los análisis de riesgos desarrollados, es necesario realizar investigaciones complementarias que permitan encontrar estrategias para garantizar la calidad del extracto generando una adecuada obtención, almacenamiento y transporte.

Bibliografía

1. Atanasov AG, Waltenberger BA, Pferschy EM, Linder TD, Wawrosch CA, Uhrin PS, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 2015;33(8):1582–1614.
2. Rather MA, Bhat BA, Qurishi MA. Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down?. *Phytomedicine.* 2013;21(1):1–14.
3. Bruno D, Wolfender JL, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem Rev.* 2014;14(2):299–315.
4. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830(6):3670–3695.
5. Rocha H, Cuadro J, Mora C. Aplicación de la calidad basada en el diseño (QbD) en la reformulación de tabletas masticables. *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* 2013;42(2):190–214.
6. ISPE. Concepts and Principles SPE Guide Series: PQLI® from Concept to Continual Improvement Product Realization using Quality by Design (QbD). Part 1 Product Realization using Quality by Design (QbD): Concepts and Principles. 2011: 11–39.
7. Janssen W. *The Story of the Laws Behind the Label.* 1th. ed. United States of America: FDA; 1962.

8. Ponce LF, Rodríguez A. Buenas Prácticas de Manufactura Vigentes y su relación con la Garantía De Calidad. Rev. colomb. cienc. quim. farm. 1992;20: 63–68.
9. Charoo NA, Shamsheer AAA, Zidan AS, Rahman Z. Quality by design approach for formulation development: A case study of dispersible tablets. Int. J. Pharm. 2012;423(2):167–178.
10. World Health Organization. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report Series. Geneva. 1992;24-35.
11. Mora CE. “Nuevos enfoques” de las Buenas Prácticas de Manufactura. Rev. colomb. cienc. quim. farm. 2009;38(1):42–58.
12. García OF, Vallejo BM, Mora CE. La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. Estud.Gerenc. 2015;31(134):68–78.
13. Welch KA, Fung CA, Schmidt SS. Risk/Science-based approach to validation: A win-win-win for patients, regulators, and industry. Pharm. Sci. Technol. 2004;58(45):15–23.
14. Zhang L, Mao S. Applications of quality by design (QbD) and its tools in drug delivery. Asian J. Pharm. 2016;11(1):144–155.
15. Patel GM, Shelat PK, Lalwani AN. QbD based development of proliposome of lopinavir for improved oral bioavailability. Eur. J. Pharm. Sci. 2016;9(4):225-248
16. Mhatre R, Rathore A. Quality by design: an overview of the basic concepts. Quality by Design for Biopharmaceuticals. John Wiley & Sons. 2009.
17. Yan B, Li Y, Guo Z, Qu H. Quality by design for herbal drugs: A feedforward control strategy and an approach to define the acceptable ranges of critical quality attributes. Phytochem. Anal. 2014;25(1):59–65.
18. Uhlenbrock L, Sixt M, Tegtmeier M, Schulz H, Hagels H, Ditz R, et al. Natural products extraction of the future sustainable manufacturing solutions for societal needs. Processes. 2018;6(10):2-28.

19. Kroll U, Cordes C. Pharmaceutical prerequisites for a multi-target therapy. *Phytomedicine*. 2006;13(2):12–19.
20. Yousef SA, Mohammed YH, Namjoshi S, Grice JE, Benson HAE, Sakran W, et al. Mechanistic evaluation of enhanced curcumin delivery through human skin in vitro from optimised nanoemulsion formulations fabricated with different penetration enhancers. *Pharmaceutics*. 2019;11(12):2-20.
21. Carriço C, Pinto P, Graça A, Gonçalves LM, Ribeiro HM, Marto J. Design and characterization of a new *quercus suber* based pickering emulsion for topical application. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):1–16.
22. Thakur D, Jain A, Ghoshal G, Shivhare US, Katare OP. RP-HPLC method development using analytical QbD approach for estimation of cyanidin-3-O-glucoside in natural biopolymer based microcapsules and tablet dosage form. *J Pharm. Investig.* 2017;47(5):413–427.
23. Sharma R, Kamboj S, Khurana R, Singh G, Rana V. Physicochemical and functional performance of pectin extracted by QbD approach from *Tamarindus indica* L. pulp. *Carbohydr. Polym.* 2015;134:364–374.
24. Organización Mundial para la Salud. Salud mental: Fortalecer nuestra respuesta. Colombia. 2016.
25. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de manejo para trastornos de ansiedad. Colombia. 2014;1–47.
26. Ministerio de Salud y Protección Social. Encuesta Nacional de Salud Mental 2015. Colombia. Tomo I. 2015.
27. López F, Álamo C, García P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. *J. Anxiety Disord.* 2011;25(4):554–562.
28. López C, Estrada E. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *J. Ethnopharmacol.* 2016;186:377–391.

29. Ajao MY, Akindele AJ. Anxiolytic and sedative properties of hydroethanolic extract of *Telfairia occidentalis* leaves in mice. *Rev. bras. farmacogn.* 2013;23(2):301–309.
30. Ketcha GJM, Djiogue S, Gamo FZ, Ngitedem SG, Njamen D. Anxiolytic and sedative activities of aqueous leaf extract of *Dichrocephala integrifolia* (Asteraceae) in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2015;176:494–508.
31. Ávila G, González ME, Carballo AI, Aguilar B, García S, Giles DE, et al. Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. *J. Ethnopharmacol.* 2016;192:90–98.
32. Khan IN, Sarker MMI, Ajrin M. Sedative and anxiolytic effects of ethanolic extract of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) leaves. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4:400-404.
33. Kebebew Z, Shibeshi W. Evaluation of anxiolytic and sedative effects of 80% ethanolic *Carica papaya* L. (Caricaceae) pulp extract in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2013;150(2):665–671.
34. Nwosu MO. Herbs for mental disorders. *Fitoterapia.* 1999;70:58–63.
35. Sollozo I, Estrada E, Carro M, López C. GABAA/benzodiazepine receptor complex mediates the anxiolytic-like effect of *Montanoa tomentosa*. *J. Ethnopharmacol.* 2015;162:278–286.
36. Sandoval MD. Huila es potencia mundial en *Passifloras*. *El Espectador.* 2013.
37. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Sistema de información de gestión y desempeño de organizaciones de cadenas. Retrieved. 2015.
38. Barrios L. "Estudios de la diversidad de Passifloreacea en los departamentos de Caldas, Choco, Nariño, Quindio, Risaralda y Valle del Cauca (Colombia), Apoyados en los análisis ecogeográficos, palinológicos y citogenéticos" Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia; 2005: 38-59.

39. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: A review update. *J. Ethnopharmacol.* 2004;94(1):1–23.
40. Medina HI. "Aporte al diseño de un sistema microparticulado para un extracto de *Passiflora quadrangularis* Linn" Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia; 2014:30-75.
41. Hanada S. *Pharmacological Trials of Crude Extract of Passiflora alata*. *Planta Medica*. New York. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1984;303–316.
42. Hickey M, King C. *100 Families of Flowering Plants*. United Kingdom. Cambridge Univ Press. 1988;130–153.
43. Felter HW, Lloyd J. *King's American Dispensatory. The plants*. United State. Eighteenth edition 1898;89-112
44. Chopra RN, Nayar SL, Chopra I. *Glossary of Indian Medicinal Plants*. India. 1956;186–187.
45. Seaforth CE, Adams CD, Sylvester Y. *A Guide for the Medicinal Plants of Trinidad & Tobago*. Commonwealth Secretariate, Marlbrgh House, Pall Mall. 1983;95-102
46. Bergner P. *Passionflower*. "Aust. J. Medical Herbal. 7;13–24.
47. Domínguez LF. "Evaluación cualitativa de la solubilidad de flavonoides presentes en un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis*" Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia; 2016:20-45.
48. Osorio C, Duque C, Fujimoto Y. Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. *Phytochemistry*. 2000;53(1):97–101.
49. Gazola AC. *Flavonoid constituents of Passiflora quadrangularis* Linneaus leaves aqueous extract and the in vivo sedative activity through GABAergic pathway. *J Ethnopharmacol.* 2015;100–125.
50. Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. *Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from Matricaria chamomilla*. *Biochem. Pharmacol.* 2000;59(11):1387–1394.

51. Gazola AC, Costa GM, Castellanos L, Ramos F a., Reginatto FH, Lima TCM De, et al. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. Rev. bras. farmacogn. 2015;25(2):158–163.
52. Porras D. "Estudio para la evaluación de la compatibilidad entre un extracto de *Passiflora quadrangularis* y algunos excipientes" Tesis de Grado. Universidad Nacional De Colombia 2016:2–16.
53. Echeverry S. "Aporte a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis*" Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia; 2017:16-58.
54. Herrera J, Cardenas P. "Contribución al estudio de la estabilidad de 6-metilcumarina libre y microencapsulada" Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia; 2016:10-19.
55. Convención farmacopeica de los Estados Unidos. Prueba de eficacia antimicrobiana. Farmacopea de los Estados Unidos de América 38. 2015:1034-1038.
56. Maguire J, Peng D, Ostrove S, Brindle A, Davy S, Tiffany D, et al. Risk Analysis and Mitigation Matrix (RAMM) – A Risk Tool for Quality Management. FDA 2nd Conf. 2011;32(1):1–19.
57. Carbone TA, Tippet DD. Project risk management using the project risk FMEA. Eng Manag J. 2004;16(4):28–35.
58. Pramod K, Tahir MA, Charoo NA, Ansari SH, Ali J. Pharmaceutical product development : A quality by design approach. Int J Pharm Investig. 2016;24(9):129-140
59. FDA. Target Product Profile a Strategic Development Guidance for Industry and Review Staff Target Product Profile. Guidance for Industry and Review Staff. FDA Guidance. 2007;13.-14

60. Gutiérrez SL, Chilpa RR, Jahms HB. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Rev. bras. farmacogn.* 2014;24(5):591–608.
61. Saffari M, Ebrahimi A, Langrish T. A novel formulation for solubility and content uniformity enhancement of poorly water-soluble drugs using highly-porous mannitol. *Eur J Pharm Sci.* 2016;83:52–61.
62. Melo JG, Santos AG, De Amorim EL. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. *Evid-Based Compl Alt.* 2011;5:2-8.
63. Brantley S, Argikar A, Lin. Y, Nagar S, Paine M. Herb-drug interactions: Challenges and opportunities for improved predictions. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(3):301–317.
64. Barnes PM, Powell-griner E, Mcfann K, Nahin RL. Complementary and Alternative Medicine Use Among Adults: United States 2002. *Res. Integr. Med.* 2004;5:54-63
65. Khan IA. Issues related to botanicals. *Life Sci.* 2006;78(18):2033–2038.
66. Costa D, Ulbricht C, Chao W, Weissner W, Rusie-Seamon E, Woods J. Clinical Evidence of Herb-Drug Interactions: A Systematic Review by the Natural Standard Research Collaboration. *Curr. Drug Metab.* 2008;9(10):1063–1120.
67. Villas GR, Stefanello AP, Feitosa BC, Lima CA, Arce E, Oesterreich SA. The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O.BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: Behavioral evidences. *Nutr Neurosci.* 2018;7(2):1–11.
68. Akhondzadeh S, Naghavi HV. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *J Clin Pharm Ther.* 2001;26:363–367.
69. Movafegh A, Alizadeh R, Hajimohamadi F, Esfehni F, Nejatfar M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: A double-blind, placebo-controlled study. *Anesth Analg.* 2008;106(6):1728–1732.

70. Schulz H, Jobert M, Hübner WD. The quantitative EEG as a screening instrument to identify sedative effects of single doses of plant extracts in comparison with diazepam. *Phytomedicine*. 1998;5(6):449–458.
71. Ngan A, Conduit R. A Double-blind , Placebo-controlled Investigation of the Effects of *Passiflora incarnata* (Passionflower) Herbal Tea on Subjective Sleep Quality. *Phytother. Res*. 2011;11:1153–1159.
72. Bourin M, Bougerol T, Guitton B, Broutin E. A combination of plant extracts in the treatment of outpatients with adjustment disorder with anxious mood: Controlled study versus placebo. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997;11(2):127–132.
73. González L. "*Passiflora* en el tratamiento de la ansiedad y el insomnio" Tesis Doctorado. Universidad Complutense; 2017;25-115.
74. INVIMA. Sistema de Tramites en Línea - Consultas Públicas [Internet]. [cited 2019 Jun 17].
75. Méndez G, Fuentes VR, Soler BA, Villanueva G, Lemes Hernández GM, Rodríguez A. Variación de índices farmacognósticos en *Passiflora incarnata* L. con la época y hora de cosecha de la droga. *Rev Cuba Plantas Med*. 2001;6(3):98–104
76. Bent S. Herbal medicine in the United States: Review of efficacy, safety, and regulation - Grand Rounds at University of California, San Francisco Medical Center. *J Gen Intern Med*. 2008;23(6):854–859.
77. Khadra I, Zhou Z, Dunn C, Wilson CG, Halbert G. Statistical investigation of simulated intestinal fluid composition on the equilibrium solubility of biopharmaceutics classification system class II drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2015;67:65–75.
78. Ministerio Salud y Protección Social. Decreto 1156 de 2018. Colombia. 06 de Julio de 2018; 2018:1–25.

79. Presidencia de la República de Colombia. Decreto 549 de 2001. Colombia. 29 de marzo de 2001; 2001:1–24.
80. Modesti G. "Estudo químico de espécies brasileiras e Colombianas do Genero *Passiflora*" Tesis Doctorado. Universidad Federal de Santa Catarina; 2013:45-85.
81. Echeverry SM, Medina HI, Costa GM, Aragón DM. Optimization of flavonoid extraction from *Passiflora quadrangularis* leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions. *Rev. bras. farmacogn.* 2018;28(5):610–617.
82. Rowe R. Sorbitol. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Press P. Sixth Edit. 2009:679–681.
83. Rowe R. Glycerin. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Press P. Sixth Edit. 2009:284–286.
84. Markham KR. *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic P. Londres; 1982.
85. Chopin J, Bouillant M, Bess E. C-Glycosyl flavonoids. *The Flavonoids Advances in Research*. 1982:449–498.
86. Patras A. Stability and color evaluation of red cabbage waste hydroethanolic extract in presence of different food additives or ingredients. *Food Chem.* 2019;275:539–548.
87. Jiang T, Mao Y, Sui L, Yang N, Li S, Zhu Z, et al. Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chem.* 2019;274:460–70.
88. Loutit TS, Keigwin LD. Heat Stability of Strawberry Anthocyanins in Model Solutions Containing Natural Copigments Extracted from Rose (*Rosa damascena* Mill.) Petals. *Nature.* 1982;300(5):163–166.
89. Ortmann CF. "Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii*" Tesis de Maestría. Universidad Federal de Santa Catarina; 2013:45-56.

90. Castañeda A, Pacheco MDL, Páez ME, Rodríguez JA, Galán CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009;113(4):859–871.
91. Loh ZH, Samanta AK, Sia Heng PW. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian J. Pharm.* 2014;10(4):255–274.
92. Chen X, Fadda HM, Aburub A, Mishra D, Pinal R. Cosolvency approach for assessing the solubility of drugs in poly(vinylpyrrolidone). *Int J Pharm.* 2015;494(1):346–356.
93. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics.* 2011;3:793–829.
94. Degani L, Gulmini M, Piccablotto G, Iacomussi P, Gastaldi D, Dal Bello F, et al. Stability of natural dyes under light emitting diode lamps. *J Cult Herit.* 2017;26:12–21.
95. Rice-evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res.* 1995;22(4):375–83.
96. Majer P, Neugart S, Krumbein A, Schreiner M, Hideg É. Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environ Exp Bot.* 2014;100:1–9.
97. Min DB, Boff JM. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr Rev Food.* 2002;1(2):58–72.
98. Hajimohammadi M, Nosrati P. Scavenging effect of pasipay (*Passiflora incarnata* L.) on singlet oxygen generation and fatty acid photooxygenation. *Food Sci Nutr.* 2018;6(6):1670–1675.
99. Osorio C, Duque C, Fujimoto Y. El aroma de la badea (*Passiflora quadrangularis*): Composición y generación de compuestos volátiles a partir de glicósidos, fosfatos y monoterpenos oxigenados. *Badea.* 2005:107–131.

100. Orsini F, Pellizzoni F, Ricca G, Verotta L. Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. *Phytochemistry*. 1987;26(4):1101–1105.
101. Machado H, Nagem T, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT de. Flavonoids and potential therapeutic. *Arch. Biochem. Biophys*. 2008;27(1):33–39.
102. Siebra AL, Oliveira LR, Martins AOBPB, Siebra DC, Lemos ICS, et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(1):37–43.
103. Munro M, Albertson G, Perry N, Blunt J, Walker J, Cole A. 4-Hydroxy-2-cyclopentenone: An Anti-Pseudomonas and Cytotoxic Component from *Passiflora tetrandra*. *Planta Med*. 2007;57(2):129–31.
104. Dzutam JK, Touani FK, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):1–8.
105. Pelegrini PB, Noronha EF, Muniz MAR, Vasconcelos IM, Chiarello MD, Oliveira JTA, et al. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1764(6):1141–1146.
106. Agizzio AP, Carvalho AO, Ribeiro S de FF, Machado OLT, Alves EW, Okorokov LA, et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Arch Biochem Biophys*. 2003;416(2):188–195.
107. Carvalho O, Anto M, Da M, Ribeiro SFF, Gomes VM. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Sci*. 2006;171:515–522.

Anexo A. Datos estadísticos de los diseños experimentales

Para evaluar los cambios en la concentración de flavonoides, el color, la cantidad de precipitado y el pH como función de las variables propuestas en el estudio de estabilidad (temperatura, luz, concentración de etanol y tipo de poliol). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %, los resultados del valor de $p_{\text{calculado}}$ y los coeficientes de regresión son presentados a continuación para cada una de las variables respuesta. Adicionalmente, los datos experimentales se usaron para generar los coeficientes de los modelos de polinomios cuadráticos, presentando para cada una de las variables respuesta la ecuación respectiva.

Tabla A1. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre el pH en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,4365	-0,00025
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,7952	-0,003
<i>Tipo de poliol</i>	0,4365	-0,01
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,7952	0,000075
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,9296	0,00025
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,7952	0,000375

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \text{pH} = & 0,07 - 0,00025 * \text{Temperatura} - 0,003 * \text{Etanol} - 0,01 * \text{Poliol} + 0,000075 \\
 & * \text{Temperatura} * \text{Etanol} + 0,00025 * \text{Temperatura} * \text{Poliol} \\
 & + 0,000375 * \text{Etanol} * \text{Poliol}
 \end{aligned}$$

Tabla A2. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre el pH en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,3918	0,14
<i>Porcentaje de etanol</i>	1,00	0,0
<i>Tipo de poliol</i>	0,6082	-0,03
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,6257	-0,002
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,7952	-0,02
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	1,00	0,0

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \text{pH} = & 0,055 + 0,14 * \text{Luz} + 0,0 * \text{Etanol} - 0,03 * \text{Poliol} - 0,002 * \text{Luz} * \text{Etanol} \\
 & - 0,02 * \text{Luz} * \text{Poliol} + 0,0 * \text{Etanol} * \text{Poliol}
 \end{aligned}$$

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
 *O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
 *V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
 *V. Vitexina
 *FT. Flavonoides totales

Tabla A3. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre el color en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,0704	0,125
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,5000	-0,075
<i>Tipo de poliol</i>	0,5000	-1,25
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,5000	0,0025
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,5000	0,025
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,5000	0,0125

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \text{Color} = & -3,75 + 0,125 * \text{Temperatura} - 0,075 * \text{Etanol} - 1,25 * \text{Poliol} + 0,0025 \\
 & * \text{Temperatura} * \text{Etanol} + 0,025 * \text{Temperatura} * \text{Poliol} + 0,0125 \\
 & * \text{Etanol} * \text{Poliol}
 \end{aligned}$$

Tabla A4. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre el color en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,0747	2,0
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,6667	-0,0125
<i>Tipo de poliol</i>	0,3918	-2,5
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,5000	0,025
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,5000	0,5
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,2048	0,075

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \text{Color} = & 0,5 + 2,0 * \text{Luz} - 0,0125 * \text{Etanol} - 2,5 * \text{Poliol} + 0,025 * \text{Luz} * \text{Etanol} \\
 & + 0,5 * \text{Luz} * \text{Poliol} + 0,075 * \text{Etanol} * \text{Poliol}
 \end{aligned}$$

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido

*O2OX. Orientina-2"-O-xilósido

*V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido

*V. Vitexina

*FT. Flavonoides totales

Tabla A5. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre orientina-2"-O-glucósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,9413	237,988
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,3013	417,071
<i>Tipo de poliol</i>	0,6093	-7846,09
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,8549	-5,4109
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,6298	153,313
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,7825	41,4647

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \mathbf{O2OG} = & -10260,0 + 237,988 * \mathbf{Temperatura} + 417,071 * \mathbf{Etanol} - 7846,09 \\
 & * \mathbf{Poliol} - 5,4109 * \mathbf{Temperatura} * \mathbf{Etanol} + 153,313 * \mathbf{Temperatura} \\
 & * \mathbf{Poliol} + 41,4647 * \mathbf{Etanol} * \mathbf{Poliol}
 \end{aligned}$$

Tabla A6. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre orientina-2"-O-glucósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,1593	19987,2
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,9310	-32,3036
<i>Tipo de poliol</i>	0,6541	-5214,9
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,9535	-25,1107
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,8340	1830,29
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,8950	57,1237

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \mathbf{O2OG} = & 8092,87 + 19987,2 * \mathbf{Luz} - 32,3036 * \mathbf{Etanol} - 5214,9 * \mathbf{Poliol} - 25,1107 \\
 & * \mathbf{Luz} * \mathbf{Etanol} + 1830,29 * \mathbf{Luz} * \mathbf{Poliol} + 57,1237 * \mathbf{Etanol} * \mathbf{Poliol}
 \end{aligned}$$

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
 *O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
 *V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
 *V. Vitexina
 *FT. Flavonoides totales

Tabla A7. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre orientina-2"-O-xilósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,5290	-1666,7
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,4154	-1573,79
<i>Tipo de poliol</i>	0,7864	13390,6
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,5905	59,9056
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,9661	42,6463
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,5538	-337,245

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \mathbf{O2OX} = & \mathbf{53938,1 - 1666,7 * Temperatura - 1573,79 * Etanol + 13390,6 * Poliol} \\
 & \mathbf{+ 59,9056 * Temperatura * Etanol + 42,6463 * Temperatura} \\
 & \mathbf{* Poliol - 337,245 * Etanol * Poliol}
 \end{aligned}$$

Tabla A8. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre orientina-2"-O-xilósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,2411	62488,5
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,5814	720,877
<i>Tipo de poliol</i>	0,8166	22599,2
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,6748	-604,17
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,5948	15937,0
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,6426	-677,925

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \mathbf{O2OX} = & \mathbf{-11788,9 + 62488,5 * Luz + 720,877 * Etanol + 22599,2 * Poliol - 604,17} \\
 & \mathbf{* Luz * Etanol + 15937,0 * Luz * Poliol - 677,925 * Etanol * Poliol}
 \end{aligned}$$

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
 *O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
 *V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
 *V. Vitexina
 *FT. Flavonoides totales

Tabla A9. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre vitexina-2"-O-glucósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,4343	-788,396
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,3493	-917,697
<i>Tipo de poliol</i>	0,8708	-7460,04
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,6887	46,7658
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,6306	576,203
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,6236	-295,06

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 V2OG = & 17710,0 - 788,396 * Temperatura - 917,697 * Etanol - 7460,04 * Poliol \\
 & + 46,7658 * Temperatura * Etanol + 576,203 * Temperatura \\
 & * Poliol - 295,06 * Etanol * Poliol
 \end{aligned}$$

Tabla A10. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre vitexina-2"-O-glucósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,0185	4446,28
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,2614	-233,298
<i>Tipo de poliol</i>	0,1887	-14269,3
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,0566	1315,4
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,1135	13012,7
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,1488	492,496

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 V2OG = & 13199,5 + 4446,28 * Luz - 233,298 * Etanol - 14269,3 * Poliol + 1315,4 \\
 & * Luz * Etanol + 13012,7 * Luz * Poliol + 492,496 * Etanol * Poliol
 \end{aligned}$$

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
 *O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
 *V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
 *V. Vitexina
 *FT. Flavonoides totales

Tabla A11. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre vitexina-2"-O-xilósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,6218	2991,77
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,4867	2374,4
<i>Tipo de poliol</i>	0,9991	-59242,4
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,9713	-15,7573
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,7495	1451,23
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,9237	210,606

. * Nivel de significación 0,05

$$V20X = -107500 + 2991,77 * Temperatura + 2374,4 * Etanol - 59242,4 * Poliol - 15,7573 * Temperatura * Etanol + 1451,23 * Temperatura * Poliol + 210,606 * Etanol * Poliol$$

Tabla A12. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre vitexina-2"-O-xilósido en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,0486	69830,3
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,4509	-601,864
<i>Tipo de poliol</i>	0,8341	3753,89
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,3407	1003,97
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,2028	36097,2
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,8429	-149,965

. * Nivel de significación 0,05

$$V20X = 37656,9 + 69830,3 * Luz - 601,864 * Etanol + 3753,89 * Poliol + 1003,97 * Luz * Etanol + 36097,2 * Luz * Poliol - 149,965 * Etanol * Poliol$$

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
*O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
*V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
*V. Vitexina
*FT. Flavonoides totales

Tabla A13. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre vitexina en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,5587	183,081
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,2346	74,8182
<i>Tipo de poliol</i>	0,3261	961,767
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,5420	-3,6999
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,5246	39,084
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,2597	-48,856

. * Nivel de significación 0,05

$$V = -3465,5 + 183,081 * Temperatura + 74,8182 * Etanol + 961,767 * Poliol \\ - 3,6999 * Temperatura * Etanol + 39,084 * Temperatura * Polio \\ - 48,856 * Etanol * Poliol$$

Tabla A14. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre vitexina en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,9945	-2386,56
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,4296	-45,6905
<i>Tipo de poliol</i>	0,4316	12766,7
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,3926	59,5365
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,1899	2746,39
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,0888	-300,631

. * Nivel de significación 0,05

$$V = 4968,56 - 2386,57 * Luz - 45,6905 * Etanol + 12766,7 * Poliol + 59,5365 \\ * Luz * Etanol + 2746,39 * Luz * Poliol - 300,631 * Etanol * Poliol$$

Tabla A15. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la

*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
*O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
*V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
*V. Vitexina
*FT. Flavonoides totales

temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la cuantificación de precipitado en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,2625	0,90875
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,4255	0,56275
<i>Tipo de poliol</i>	0,2174	9,0675
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,2948	-0,017675
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,5186	-0,08325
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,1492	-0,184875

. * Nivel de significación 0,05

$$V = -21,8025 + 0,90875 * Temperatura + 0,56275 * Etanol + 9,0675 * Poliol - 0,017675 * Temperatura * Etanol - 0,08325 * Temperatura * Polio - 0,184875 * Etanol * Poliol$$

Tabla A16. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la temperatura, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de flavonoides totales presentes en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Temperatura</i>	0,5881	-1603,43
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,3601	-776,42
<i>Tipo de poliol</i>	0,8864	-73469,1
<i>Temperatura-Porcentaje de etanol</i>	0,8322	133,658
<i>Temperatura-Tipo de poliol</i>	0,7856	1734,7
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,9469	207,179

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 \text{Flavonoides} = & 6621,0 - 1603,43 * \text{Temperatura} - 776,42 * \text{Etanol} - 73469,1 \\
 & * \text{Poliol} + 133,658 * \text{Temperatura} * \text{Etanol} + 1734,7 * \text{Temperatura} \\
 & * \text{Poliol} + 207,179 * \text{Etanol} * \text{Poliol}
 \end{aligned}$$

Tabla A17. Resultados ANOVA y coeficientes de regresión para el efecto de la luz, la concentración de alcohol, la naturaleza del poliol y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de flavonoides totales presentes en los ensayos de *P. quadrangularis*.

Factor	P-valor	Coefficientes de regresión
<i>Luz</i>	0,0543	262461,3
<i>Porcentaje de etanol</i>	0,3799	1951,61
<i>Tipo de poliol</i>	0,8145	50209,7
<i>Luz-Porcentaje de etanol</i>	0,9045	-231,276
<i>Luz-Tipo de poliol</i>	0,3105	57729,2
<i>Porcentaje de etanol-Tipo de poliol</i>	0,6053	-1092,87

. * Nivel de significación 0,05

$$\begin{aligned}
 FT = & -62486,0 + 262461,3 * Luz + 1951,61 * Etanol + 50209,7 * Poliol - 231,276 \\
 & * Luz * Etanol + 57729,2 * Luz * Poliol - 1092,87 * Etanol * Poliol
 \end{aligned}$$

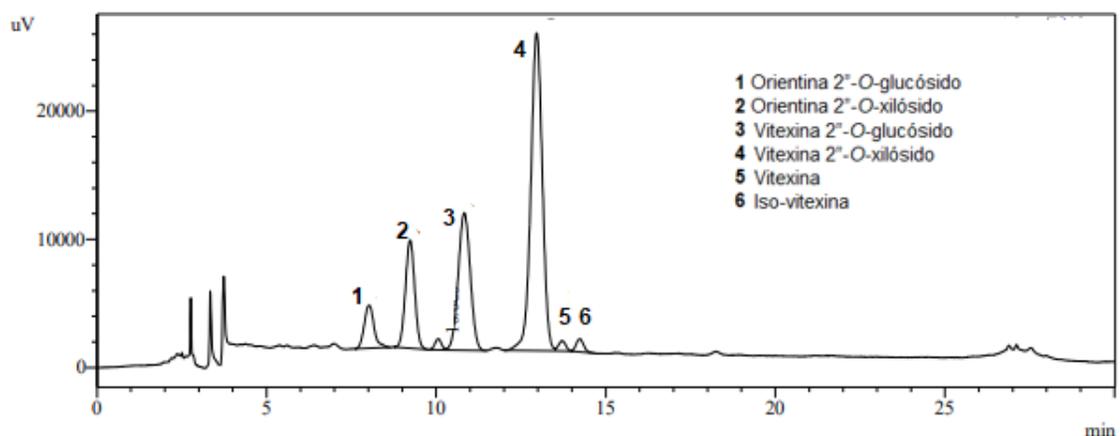
*O2OG. Orientina-2"-O-glucósido
 *O2OX. Orientina-2"-O-xilósido
 *V2OG. Vitexina-2"-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2"-O-xilósido
 *V. Vitexina
 *FT. Flavonoides totales

Anexo B. Cromatogramas de la formulación final de *P. quadrangularis*.

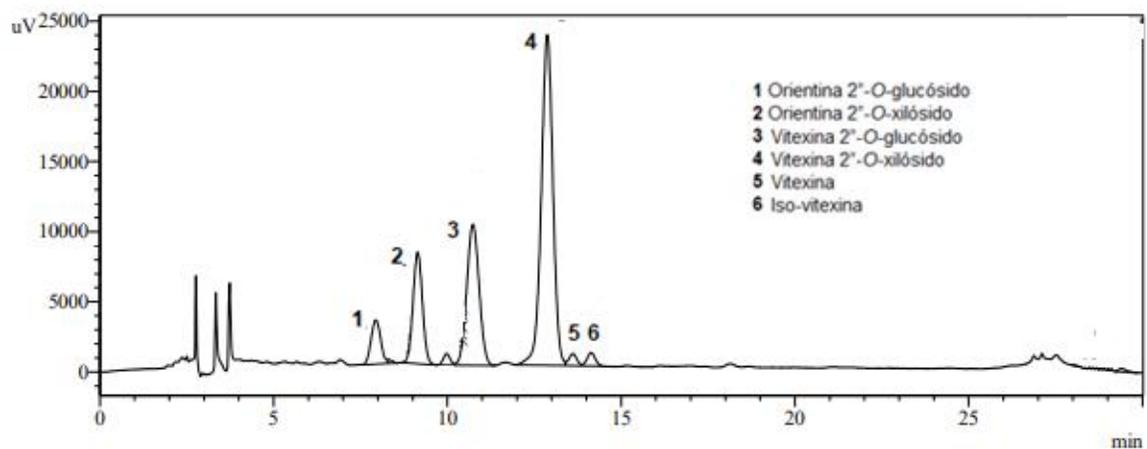
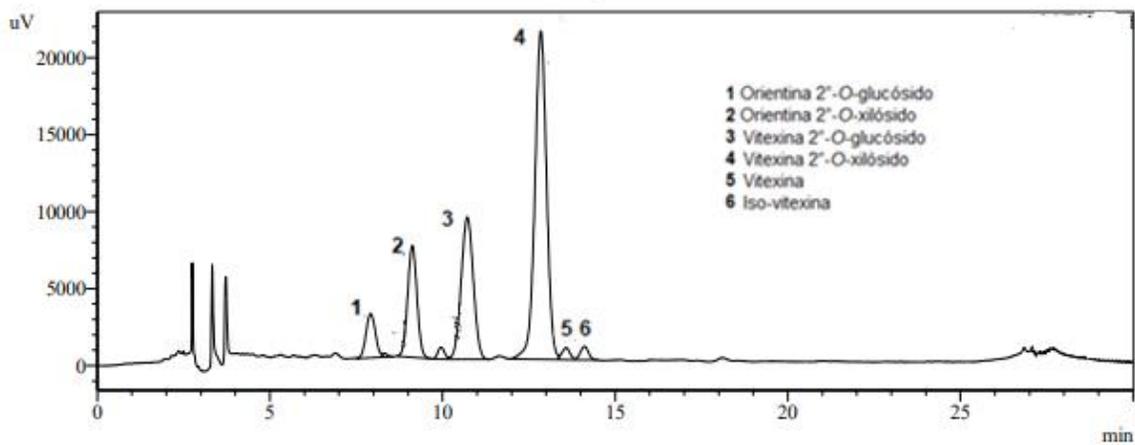
A continuación, se muestran los cromatogramas correspondientes a la formulación final de gotas de *P. quadrangularis* evaluada en el estudio de estabilidad durante 90 días.

Figura B1. Cromatograma formulación *P. quadrangularis* evaluada a los 0 días.



*O2OG. Orientina-2''-O-glucósido
*O2OX. Orientina-2''-O-xilósido
*V2OG. Vitexina-2''-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2''-O-xilósido
*V. Vitexina
*FT. Flavonoides totales

Figura B2. Cromatograma formulacion *P. quadrangularis* evaluada a los 30 días.**Figura B3.** Cromatograma formulacion *P. quadrangularis* evaluada a los 90 días.

*O2OG. Orientina-2''-O-glucósido
 *O2OX. Orientina-2''-O-xilósido
 *V2OG. Vitexina-2''-O-glucósido

*V2OX. Vitexina-2''-O-xilósido
 *V. Vitexina
 *FT. Flavonoides totales