



FACULTAD DE FARMACIA.  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**OBTENCIÓN DE PECTINAS MEDIANTE APLICACIÓN DE TECNOLOGÍA  
ENZIMÁTICA Y SU APLICACIÓN EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN  
CONTROLADA DE FÁRMACOS**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**VIVIAN LIZETTE ORELLANA NÚÑEZ.**

Director de Tesis: Jacqueline Concha Olmos

Co-Director de Tesis: Virginia Sánchez Montoya

VALPARAÍSO 2013

## INDICE GENERAL

Resumen.....	7
Abstract.....	8
1 Revisión Bibliográfica .....	9
1.1 Generalidades .....	9
1.2 Sustancias pécticas .....	10
1.2.1 Definición y estructura de las sustancias pécticas.....	10
1.2.2 Usos y aplicaciones de las sustancias pécticas en la industria farmacéutica .	12
1.3 Formas Farmacéuticas.....	15
1.3.1 Tipos de Formas Farmacéuticas.....	18
1.3.2 Forma Farmacéutica Liberación Modificada .....	19
1.3.3 Forma Farmacéutica Liberación Controlada.....	21
1.3.4 Mecanismos de Liberación Controlada.....	22
1.3.5 Sistemas de liberación por vía oral. ....	23
1.4 Comprimidos Matriciales.....	23
1.4.1 Matrices inertes, plásticas o insolubles .....	24
1.4.2 Matrices hidrofílicas.....	25
1.4.3 Matrices lipídicas .....	26
1.4.4 Fabricación de comprimidos.....	27
1.4.5 Sistemas de liberación controlada y pectinas.....	28
1.5 Métodos de Extracción de Pectinas.....	31
1.5.1 Método Convencional .....	32
1.5.2 Método Enzimático .....	32
2 Hipótesis.....	36
3 Objetivos .....	37
3.1 Objetivo General .....	37
3.2 Objetivos Específicos .....	37
4 Materiales y Metodología .....	38
4.1 Materia Prima .....	38
4.2 Productos Químicos .....	38
4.3 Preparación de la Materia Prima .....	38
4.4 Obtención de Pectinas de los Residuos Agroindustriales .....	38

4.5	Caracterización de Pectinas.....	40
4.5.1	Grado de Esterificación.....	40
4.5.2	Contenido de Ácido Galacturónico.....	40
4.5.3	Medición de PH. ....	41
4.5.4	Humedad. ....	41
4.5.5	Ácido Urónico.....	41
4.5.6	Grado de Metilación.....	41
4.6	Preparación del Sistema de Liberación Controlada.....	42
4.6.1	Preparación de comprimidos de paracetamol de liberación convencional. ...	42
4.6.2	Preparación de comprimidos de paracetamol con pectina comercial. ....	42
4.6.3	Preparación de comprimidos de paracetamol con pectina obtenida de residuos. ....	42
4.7	Comparación de la Forma Farmacéutica Fabricada con una Forma de Liberación Convencional.....	43
4.8	Análisis Estadístico .....	44
5	Resultados y Discusión. ....	45
5.1	Obtención y Caracterización de Pectinas .....	45
5.2	Análisis de la Liberación de Paracetamol .....	49
6	Conclusión. ....	58
7	Bibliografía. ....	59
8	Anexos. ....	65

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Formulación de liberación controlada usando pectinas (Tabla modificada de Sriamornsak, 2003) .....	13
Tabla 1-2. Formas de presentación de los fármacos .....	15
Tabla 1-3. Clasificación de vías de administración de fármacos .....	16
Tabla 1-4. Formas farmacéuticas de liberación modificada .....	19
Tabla 1-5. Clasificación de las enzimas pécticas que actúan sobre pectinas o ácidos pécticos .....	33
Tabla 1-6. Pectinasas y su acción sobre homogalacturano y rhamnogalacturano .....	33
Tabla 5-1. Caracterización de pectinas obtenidas a partir de residuos agroindustriales .....	45
Tabla 5-2. Contenido de ácido galacturónico y ácido úronico en pectinas de pera y coseta agotada de remolacha .....	47
Tabla 5-3. Masa media de comprimidos de paracetamol.....	49

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Esquema de pared celular vegetal. ....	10
Figura 1-2. Estructuras propuestas de pectina.....	11
Figura 1-3. Principales sitios de administración de fármacos que contiene pectina. Se muestra la cavidad nasal, la vía vaginal y el tracto gastrointestinal.....	12
Figura 1-4. Representación esquemática de la “caja de huevo” de las pectinas de bajo metoxilo. ....	14
Figura 1-5. Perfil de liberación controlada de fármacos. ....	18
Figura 1-6. Perfiles de concentración plasmática de una forma farmacéutica de liberación controlada y de una forma farmacéutica de liberación modificada .....	20
Figura 1-7. Representación esquemática de un sistema de liberación controlada de fármaco en el tiempo. ....	22
Figura 1-8. Representación esquemática del proceso de difusión de un fármaco desde una matriz inerte. ....	25
Figura 1-9. Representación esquemática del proceso de liberación de un fármaco desde una matriz hidrofílica. ....	26
Figura 1-10. Representación esquemática del proceso de erosión desde una matriz lipídica .....	27
Figura 1-11. Equipo de disolución. A) Método de canastillo, B) Método de paleta. ....	31
Figura 1-12. Resumen de extracción método convencional y método enzimático. ....	32
Figura 4-1. Obtención de Residuo Insoluble Purificado (RIP). ....	39
Figura 4-2. Diagrama de flujo de extracción de pectinas por vía enzimática. ....	40
Figura 5-1. Precipitación de pectinas con etanol al 95%. A) pera, B) coseta agotada de remolacha. ....	48
Figura 5-2. Comprimidos fabricados con las diferentes pectinas. A) comprimido control, B) comprimido PBM, C) comprimido con PMM, D) comprimido con P.A, E) comprimido con P.E, E) comprimido con C.A, F) comprimido con C.E. ....	49
Figura 5-3. Cinética de disolución del comprimido control, con los comprimidos con PBM y PMM respectivamente. ....	50

Figura 5-4. Cinética de disolución del comprimido control, con los comprimidos con pectina de pera ácida y pera enzimática. ....	51
Figura 5-5. Cinética de disolución del comprimido control, con los comprimidos con pectina de coqueta de remolacha ácida y coqueta de remolacha enzimática. ....	52
Figura 5-6. Gráfica comparativa de diferentes comprimidos al tiempo de disolución de 60 minutos. ....	52
Figura 5-7. Comparación de la cinética de disolución de la pectina de pera ácida con la pectina de coqueta ácida. ....	55

## RESUMEN

El desarrollo de nuevas matrices para la liberación de fármacos es un tema de gran interés en la actualidad. Las pectinas son polímeros de origen natural que poseen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica tales como agente detoxificante, reductores de la tasa de digestión de alimentos por inmovilización de los componentes en el intestino, reguladores en el nivel de colesterol en la sangre, y materiales de liberación controlada. En este trabajo se compararon las cinéticas de disolución de distintos comprimidos de paracetamol de 80 mg los cuales fueron fabricados con distintas pectinas al 30 % p/p, provenientes pectinas cítricas comerciales, de residuos de pera y coqueta agotada de remolacha, obtenidos por método convencional ácido y método enzimático, utilizándose la pectinasa Rohapect DA6L. Se realizó el estudio de cinética de disolución en un equipo USP tipo 2 a 50 rpm en un medio de buffer fosfato a pH 5,8 y se tomaron muestras a 5 tiempos distintos (5, 15, 30, 45, 60 minutos). Los resultados obtenidos demuestran que todas las pectinas obtenidas retardan la liberación del paracetamol, pero aquellas obtenidas de pera y coqueta por el método convencional son quienes presentan un mayor efecto. En conclusión, según lo establecido por la USP 29, a los 15 min un comprimido de liberación modificada debe tener disuelto entre un 45-60% y a los 60 min debe tener un 85% disuelto, tomando esto en cuenta solo los comprimidos fabricados con las pectinas obtenidas por el método convencional cumplen con estos parámetros.

## ABSTRACT

The development of new matrices for drugs release is nowadays an issue of great interest. Pectins of natural origin polymers that have several applications in the pharmaceutical industry as activities as detoxifying agent, food digestion rate regulators via component immobilization in the intestine, blood cholesterol level regulators and controlled material release, among others; one of their main characteristics is that they possess is the gel forming capacity, this is why they are considered a potential candidate to reach this purpose. In this work, it was compare the dilution kinetics of different 80 mg acetaminophen tablets, which where manufactured with different pectins to 30% w/w, from pear and beet residuals, obtained by conventional and enzymatic methods. The study was made in a type 2 USP equipment at 50 RPM in a pH 5, 8 phosphate buffer, at 5 different time points (5, 15, 30, 45 and 60 minutes). The results obtained demonstrate that all pectins delayed the acetaminophen release, being the pear and beet pectins obtained via the conventional method of the higher effect. In conclusion, it is necessary to obtain pectins of a higher degree of esterification to observe a higher effect on drug release.

# **1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1 Generalidades**

En la última década, la agroindustria hortofrutícola en Chile ha sido uno de los sectores más dinámicos de la economía nacional, vendiéndose (mercado interno y externo) cerca de 6.040 millones de dólares, representando esto alrededor de un 3% del PIB (Consejo Nacional de Producción Limpia, 2005).

En lo relativo a la generación de residuos, este sector valoriza casi el 100% de los residuos sólidos orgánicos, 93,2% lo dispone como alimentación animal, 3,6% como compostaje y un 1,5% como mejorador de suelo. Si bien este tipo de residuos no representa un riesgo para las personas, la disposición inadecuada puede dar origen a la contaminación del aire (generación de malos olores), del agua (subterránea y superficial) y del suelo (Manterola, 1999).

En nuestro país, la valorización de residuos es un tema emergente, sólo un pequeño número de industrias dispone de estos materiales para la extracción de aceites esenciales, pectinas, flavonoides, entre otros, situación que otorga un valor adicional a un material considerado de descarte. En este sentido, hoy en día la obtención de sustancias a partir de estos residuos se realiza convencionalmente empleando procedimientos químicos los cuales son costosos y contaminantes. Es por esto que contribuyendo directamente a los Acuerdos de Producción Limpia (APL) que Chile ha adquirido con la comunidad internacional, se ha considerado el uso de enzimas en los procesos para el tratamiento de estos residuos, con esto se ve favorecido la obtención de un producto más limpio el cual se podría considerar con potencial uso farmacéutico.

## 1.2 SUSTANCIAS PÉCTICAS

### 1.2.1 Definición y estructura de las sustancias pécticas.

Las sustancias pécticas son macromoléculas glúcídicas complejas de alto peso molecular, ácidas y cargadas negativamente, que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Estas moléculas constituyen los componentes mayoritarios de la laminilla media y la pared celular primaria de las plantas superiores (Sainz, 2008; Caffall *et al.*, 2009; Yapo, 2011) (**Figura 1-1**) y se pueden clasificar en cuatro principales grupos según la American Chemical Society (Sainz, 2008):

- Ácidos péctinicos: el término es usado para definir a los ácidos poligalacturónicos coloidales que contienen una proporción considerable de grupos metil éster.
- Ácidos pécticos: sustancias pécticas compuestas principalmente por ácido poligalacturónico coloidal y esencialmente libre de grupos metil éster.
- Pectina: designa a los ácidos pécticos solubles en agua, con diferente contenido de grupos metil éster y grado de neutralización, los cuales son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones favorables.
- Protopectina: sustancias insolubles en agua, las cuales se encuentran en las plantas y, bajo hidrólisis restringida, producen ácidos péctinicos.

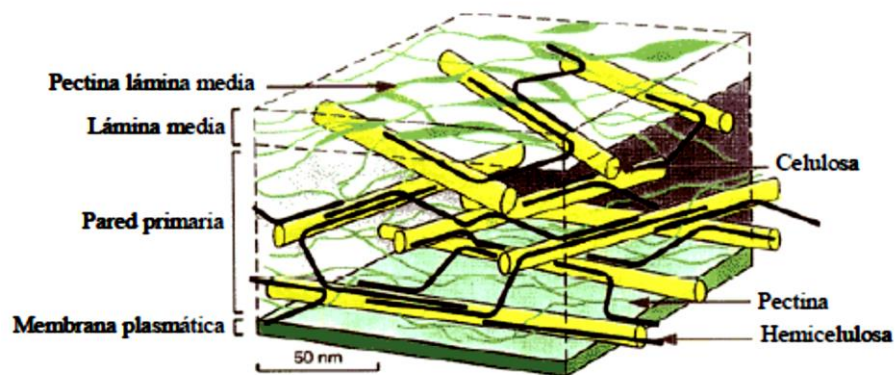
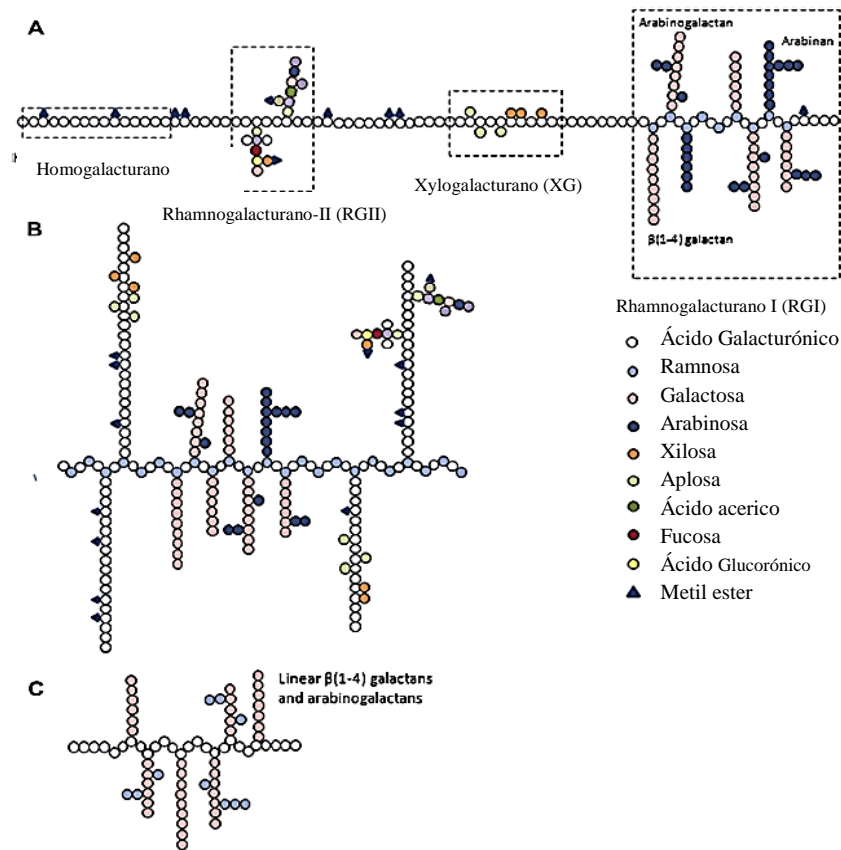


Figura 1-1. Esquema de pared celular vegetal(Soriano, 2004).

Estructuralmente, la molécula de pectina se divide en dos partes (**Figura 1-2**): la cadena principal y las cadenas laterales. La cadena principal está formada por unidades lineales de ácido D-galacturónico unidas mediante enlaces  $\alpha$ -(1,4) (Nikolic' *et al.*, 2007; Sainz, 2008; Zapata *et al.*, 2009) interrumpidas por enlaces  $\alpha$ -(1,2) de unidades de L-ramnosa. De esta manera, la cadena principal está formada por dos regiones (A) la región “lisa” u homogalacturonano (HG) integrada por unidades lineales de ácido D-galacturónico y (B) La región “pilosa” o ramno-galacturonano está formada por dímeros de D-galacturónico y L-ramnosa. Las cadenas laterales están formadas por restos de azúcares neutros que se encuentran unidos covalentemente al átomo de carbono 4 de las unidades de ramnosa dentro de la región del ramno-galacturonano (Sainz, 2008).

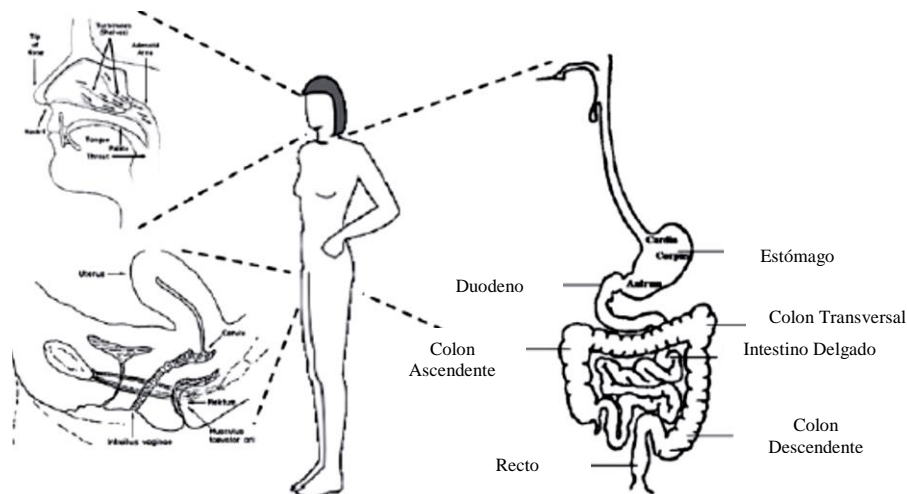


**Figura 1-2. Estructuras propuestas de pectina (Maxwell *et al.*, 2011).**

### 1.2.2 Usos y aplicaciones de las sustancias pécticas en la industria farmacéutica

En la industria farmacéutica el uso de pectinas ha tendido a ampliarse cada vez más. Inicialmente era empleado principalmente como astringente en ungüentos, agente natural profiláctico contra el envenenamiento con cationes tóxicos, donde se demostró su eficacia en la eliminación de plomo y mercurio en el tracto gastrointestinal y órganos respiratorios; agente de coagulación de la sangre, acortando el tiempo de hemorragia o sangrado local y generador de sensación de saciedad, reduciendo el consumo de alimentos.

Por otra parte, en la última década, debido a la capacidad de formar hidrogeles las pectinas se han utilizado en formulaciones de tabletas como agente aglutinante, adhesivo dental, y matrices en la formulación de comprimidos de liberación controlada (Sriamornsak, 2003; Beneke, 2009; Fishman, 2001; Awasthi, 2010; Chasquibol *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2011). Cabe destacar que estas moléculas por su inocuidad pueden ser utilizadas en la liberación de fármacos por vía oral, nasal (Morris *et al.*, 2010 a; Liu *et al.*, 2007) y vaginal (Figura 1-3) (Morris *et al.*, 2010 a).



**Figura 1-3. Principales sitios de administración de fármacos que contiene pectina. Se muestra la cavidad nasal, la vía vaginal y el tracto gastrointestinal (Morris *et al.*, 2010 a).**

Una característica positiva e interesante de resaltar acerca de las pectinas es el hecho de que al emplearse como vehículo de fármacos provoca una disminución en la toxicidad de estos y prolonga su actividad sin la disminución de su efecto terapéutico (Tabla 1-1). Esto ha

llevado a que últimamente se desarrollen microglóbulos de pectina para su potencial uso en quimioterapia de cáncer localizado como sistema de liberación de fármacos intravascular biodegradable. Las sustancias pécticas probablemente también tengan un efecto favorable homeostático y antifibrinolítico. Adicionalmente, en el sector de cosmética se utiliza la propiedad tradicional de la pectina, que es la de formar geles y pastas (Sainz, 2008).

**Tabla 1-1.** Formulación de liberación controlada usando pectinas (Tabla modificada de Sriamornsak, 2003)

Forma de dosis	Tipo de pectina	Aplicaciones
Tableta	Pectina pura y estandarizada	Agente aglutinante y liberación retardada del fármaco
Tableta	Pectina-AM	Propiedades de liberación sostenida en tabletas de compresión directa
Tableta	Pectina-AM (pura y estandarizada)	Sistema de matriz hidrogel
Tableta	Pectina-AM	Compresión directa de la mezcla de pectina-AM y HPMC
Perlas de gel	Pectina-BM (amidada)	Sistema de liberación sostenida usando pectinato de calcio
Microesferas	Pectina-BM	Microesferas de pectina preparadas por técnica de emulsificación
Tableta	Pectinato de calcio	Compresión del pectinato de calcio
Tableta	Pectina-AM y Pectina-BM	Compresión directa de solo pectina-AM o pectina-BM

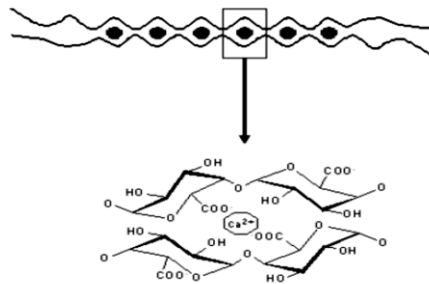
Pectina-AM= pectina de alto metoxilo; Pectina-BM= pectina de bajo metoxilo; HPMC= hidroxipropil metilcelulosa

En lo que respecta de la calidad de las pectinas, dos son los criterios empleados para verificar la pureza, (1) el porcentaje de ácido galacturónico (AGA) y (2) el porcentaje de cenizas (Chasquibol *et al.*, 2008). El ácido galacturónico presente en las frutas se encuentra variablemente esterificado por metanol. Este metanol puede perderse con relativa facilidad por hidrólisis ácida o enzimática, dejando el grupo ácido libre. En función del porcentaje de restos de ácido galacturónico esterificado las pectinas se clasifican como de alto metoxilo cuando este porcentaje es superior al 50% y de bajo metoxilo cuando es inferior (Chasquibol *et al.*, 2008).

Las pectina de alto metoxilo forman geles a pH menor de 4.0 (Morris *et al.*, 2010 a). Estas características se alcanzan usualmente con un contenido de sólidos solubles entre 55 y 85%,

de los cuales el 60% debe ser sacarosa. En estas condiciones se logra que los grupos carboxilo de la pectina no se disocien y se reduzcan las interacciones por repulsión de cargas, además se minimizan las interacciones pectina solvente y se favorece la formación de puentes de hidrogeno entre la sacarosa y la pectina (Lajolo *et al.*, 2006; Urias *et al.*, 2010; Yapo *et al.*, 2007). Los geles de pectinas de alto metoxilo son estabilizados por enlaces de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas débiles individuales (Chasquibol *et al.*, 2008).

Mientras, las pectinas de bajo metoxilo forman redes de geles estabilizados electrostáticamente con o sin azúcar y con cationes metálicos divalentes, usualmente calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en lo que es conocido como modelo de “la caja de huevo” (**Figura 1-4**). Este modelo es formado en un proceso de dos pasos, una dimerización seguida por una agregación de “cajas de huevo” preformadas (Morris *et al.*, 2010 a); la formación de geles con estas pectinas se puede alcanzar en sistemas cuyo pH se encuentre en un rango entre 1,0 y 7,0; sin que se requiera la presencia de sacarosa y el rango de sólidos solubles puede estar entre 0 y 80%. El nivel de calcio requerido depende del porcentaje de grupos carboxilo disponible (Levigne *et al.*, 2002; Urias *et al.*, 2010; Kubo *et al.*, 2004; Yapo *et al.*, 2007).



**Figura 1-4. Representación esquemática de la “caja de huevo” de las pectinas de bajo metoxilo (Sriamornask, 2003).**

El gel de pectina se forma cuando las porciones de homogalacturonano (HG) están unidas entrecruzadas formando una red cristalina tridimensional en donde el agua y los solutos quedan atrapados. Son varios los factores que determinan las propiedades gelificantes de

las sustancias pécticas entre los que se incluyen la temperatura, el tipo de pectina, el grado de esterificación con metanol, el grado de acetilación, el pH, los azúcares, el calcio y otros solutos (Sainz, 2008).

Mientras que las características químicas de las pectinas que influyen en la fuerza del gel son el grado de esterificación y el peso molecular; por lo tanto, el grado de esterificación es un factor clave para determinar la conformación y las propiedades reológicas de las pectinas. A mayor grado de esterificación mayor serán las interacciones hidrofóbicas, por lo que el gel será más fuerte. Un alto grado de esterificación conlleva mayor temperatura de gelificación. Cuanto más alto es el peso molecular mayor la viscosidad de la pectina, por consiguiente mayor su grado de esterificación (Chasquibol *et al.*, 2008).

### 1.3 FORMAS FARMACEUTICAS.

En nuestro país según el Reglamento Nacional de Control de Productos Farmacéuticos (MINSAL, 2005) se define a la forma farmacéutica o cosmética como la forma o estado físico en el cual se presenta un producto para facilitar su fraccionamiento, dosificación y administración o empleo. Para que el principio activo pueda ser administrado y absorbido debe estar contenido en una formulación o forma farmacéutica, que de acuerdo a su aspecto físico puede ser sólida, semisólida, líquida o gaseosa (**Tabla 1-2**).

**Tabla 1-2.** Formas de presentación de los fármacos (Silva, 2011)

Forma farmacéutica	Estériles	No Estériles
Sólida	Polvo estéril para inyección, liofilizados	Comprimidos, polvos cápsulas, granulados
Líquida	Soluciones parenterales, emulsiones parenterales y soluciones oftálmicas	Soluciones, jarabe, elixir, emulsiones, suspensiones.
Semisólida	Ungüentos oftálmicos	Cremas, ungüentos, pomadas, geles
Gaseosa		Aerosoles

Las formas farmacéuticas a su vez pueden ser aplicadas por diversas vías o rutas de administración (**Tabla 1-3**) dependiendo si es para un efecto local (en el sitio de aplicación) o para un efecto sistémico (en un sitio diferente al sitio de aplicación) (Silva, 2011).

La vía más popular para la administración de medicamentos según el personal médico y los pacientes es a través de la boca y el tracto digestivo: la vía oral (Morris *et al.*, 2010 b; Villanova *et al.*, 2011). El principal sitio de absorción del fármaco por esta vía es el intestino delgado el cual ofrece una superficie de epitelio de 100 m<sup>2</sup> aproximadamente. Si el fármaco es poco soluble, o está en la forma de liberación controlada, una absorción significativa del fármaco también puede ocurrir en el intestino grueso. Esta vía de ingreso es de particular interés ya que la administración de fármacos por ella es menos invasiva, es más cómoda, hay mayor cumplimiento y el riesgo de infección es reducido en comparación con las inyecciones subcutáneas. Sin embargo, hay desventajas asociadas a esta vía de administración como son baja biodisponibilidad debido a un relativamente bajo paso de agentes activos a través del epitelio de la mucosa, proteólisis enzimática y degradación ácida en el estómago de los fármacos administradas por esta vía (Morris *et al.*, 2010 a).

**Tabla 1-3.** Clasificación de vías de administración de fármacos (Silva, 2011)

<b>Externa o tópica</b>	<b>Interna</b>	<b>Percutánea</b>
<b>Piel</b>	Entérica (a través del tubo digestivo)	A través de la piel
<b>Mucosas</b>	- oral o bucal,	para ejercer su
- fosas nasales,	- sublingual,	acción en otro sitio
- uretra,	- rectal	
- vagina,	Parental (por inyecciones)	
- conjuntiva ocular	- intradérmica,	
<b>Oído</b>	- subcutánea,	
<b>Orofaringe</b>	- intramuscular,	
	- endovenosa,	
	- intraarterial,	
	- intratecal,	
	- otras	
	Inhalatoria	

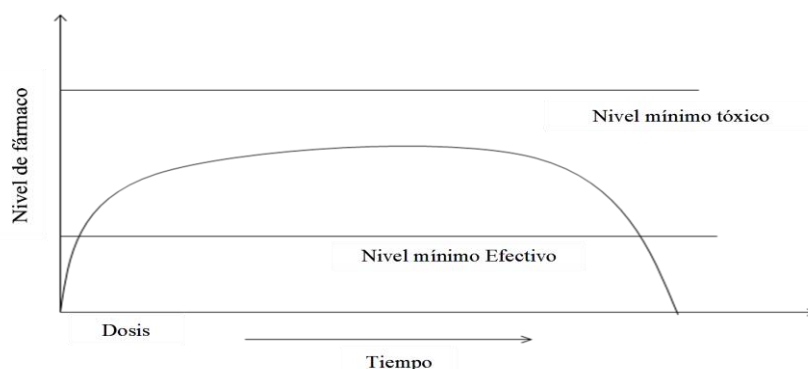
El proceso de liberación de los principios activos desde las formas de dosificación constituye un factor limitante de la absorción de aquellos medicamentos que se administran por vía extravascular. En el caso de las formulaciones orales, la liberación es un proceso previo a la absorción gastrointestinal y puede modificar su biodisponibilidad, tanto en magnitud como en velocidad y, en consecuencia, condicionar la intensidad y duración del efecto terapéutico (Domínguez-Gil y Suárez., 2000).

Para toda sustancia farmacológicamente activa existen dos concentraciones límites que deben estar perfectamente determinadas y que dependen de la propia naturaleza del fármaco y de sus interacciones con el organismo. Estas son: la concentración mínima efectiva, por debajo de la cual las dosis administradas no tiene valor terapéutico y el fármaco resulta totalmente ineficaz, y la concentración mínima tóxica, por encima de la cual el fármaco origina la aparición de efectos secundarios, resultando tóxico para el organismo (Escobar *et al.*, 2002).

La dosificación de un determinado fármaco (**Figura 1-5**) debe estar siempre entre estos dos límites, de tal manera que se define el índice terapéutico, IT, como la relación entre la concentración mínima tóxica y la concentración mínima efectiva (Escobar *et al.*, 2002):

$$IT = \frac{\text{Concentración mínima tóxica}}{\text{Concentración mínima efectiva}}$$

Cuanto más alto sea el valor del índice terapéutico mayor será la tolerancia y las posibilidades de dosificación de un fármaco (Escobar *et al.*, 2002).



**Figura 1-5. Perfil de liberación controlada de fármacos (Escobar *et al.*, 2002).**

### 1.3.1 TIPOS DE FORMAS FARMACEUTICAS.

Las formas farmacéuticas, de acuerdo a la Real Farmacopea Española (2003), se dividen en: de liberación convencional y de liberación modificada (**Tabla 1-4**), ésta última, además, incluye las formas farmacéuticas de sistemas de liberación acelerada, diferida, prolongada, sistemas flotantes y bioadhesivos (Silva, 2011).

La definición que la Real Farmacopea Española (2003) da para la forma farmacéutica de liberación convencional es “*preparaciones en las que la liberación de la sustancia o sustancias activas no está deliberadamente modificada por un diseño de formulación particular ni por un método de fabricación especial*” Mientras que la forma farmacéutica de liberación modificada se define como la “*preparaciones en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía. Esta modificación deliberada se consigue por una formulación particular o por un método de fabricación especial.*”.

La importancia de la forma farmacéutica reside en que determina la eficacia del medicamento, ya sea liberando el principio activo de manera lenta, o en el lugar de mayor eficiencia, evita daños al paciente por interacción química, solubiliza sustancias insolubles, mejora sabores y/o mejora el aspecto (Silva, 2011).

**Tabla 1-4.** Formas farmacéuticas de liberación modificada (CHUS, 2002)

<b>Formas farmacéuticas de liberación modificada</b>	<b>Características principales</b>
Sistemas de liberación acelerada	- Disolución rápida del fármaco sin necesidad de administración de líquidos. - No se prolonga el efecto terapéutico.
Sistemas de liberación diferida	- Retardadas: diseñadas para salvar el pH gástrico o para evitar gastrolesividad del fármaco. No prolongan el efecto terapéutico. - Pulsátil: liberación secuencial del medicamento.
Sistemas de liberación prolongada	- Diseñados para prolongar la concentración plasmática del fármaco o para mejorar las características farmacocinéticas del medicamento.
Sistemas flotantes y bioadhesivos	- Diseñados para prolongar el efecto terapéutico.

### **1.3.2 FORMA FARMACÉUTICA LIBERACIÓN MODIFICADA.**

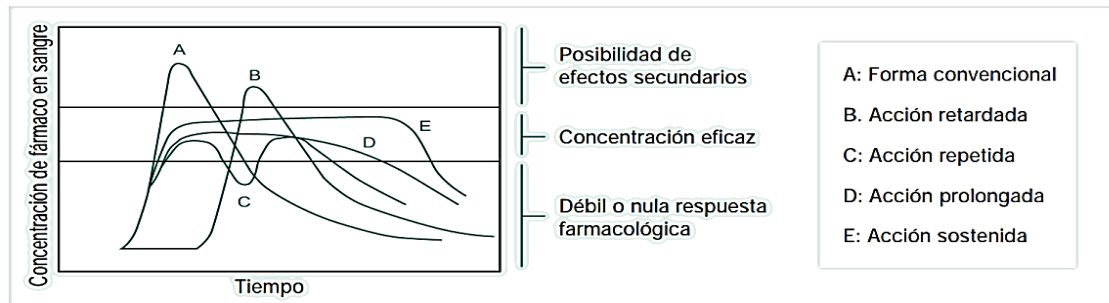
La formulación de una forma farmacéutica de liberación modificada del tipo prolongada (**Figura 1-6**) resulta muy apropiada para muchos fármacos, ya que permite mejorar el perfil terapéutico de numerosos medicamentos. Sin embargo, no todo principio activo es apropiado para su incorporación en este tipo de forma farmacéutica. Por ejemplo, un principio activo que tiene un estrecho rango terapéutico o una vida media larga, se emplea con medicamentos que tienen una vida media corta y que necesitan ser administrados repetidamente en el día y en la noche (Domínguez-Gil y Suarez, 2000).

Los comprimidos de que poseen este tipo de liberación pueden ser de tipo recubierto o no, son preparados con excipientes especiales, o por procedimientos particulares o por ambos medios simultáneamente, con el fin de que se modifique la velocidad, el lugar o el momento de liberación de él o los principios activos (Real Farmacopea Española, 2003; Silva, 2011).

Algunos tratados de tecnología farmacéutica realizan una sencilla clasificación sencilla, atendiendo que considera tanto los mecanismos que afectan el proceso como la liberación, como también a determinados aspectos de la fisiología del aparato digestivo. En otros casos

se utiliza una clasificación que se basa exclusivamente en el mecanismo de liberación como tal (Lastre, 2002; Silva, 2011):

- Sistemas de disolución y/o dispersión rápida.
- Sistemas de liberación con tránsito gastrointestinal normal.
- Sistemas de liberación con tránsito gastrointestinal retardado.
- Sistemas de liberación tiempo-dependiente.



**Figura 1-6. Perfiles de concentración plasmática de una forma farmacéutica de liberación controlada y de una forma farmacéutica de liberación modificada (Silva, 2011)**

Los objetivos clínicos de las formas farmacéuticas de liberación modificada del tipo prolongada (Domínguez-Gil y Suárez, 2000; Escobar *et al.*, 2002) se pueden desglosar en:

- Aumentar el intervalo de dosificación con el fin de evitar problemas de incumplimiento de prescripción médica.
- Reducir las fluctuaciones de concentraciones séricas de los fármacos con el objetivo de disminuir efectos adversos y/o mejorar efectividad terapéutica, así también se puede disminuir el número de dosis, ya que la administración se hace en intervalos más largos.
- Controlar el lugar de liberación del fármaco para incrementar su efectividad terapéutica.
- Además, tanto para el paciente como para la industria farmacéutica es más económica.

Para la formulación de una forma farmacéutica de acción prolongada es importante que el proceso de liberación *in vivo* sea predecible. Para esto se deben conocer los mecanismos implicados, los que se clasifican en: sistemas controlados por disolución, difusión, erosionables con difusión-disolución y controlados osmóticamente (Domínguez-Gil y Suarez, 2000). El sistema controlado por disolución-difusión o también llamado sistema matricial se caracteriza principalmente por utilizar una barrera para controlar el proceso de difusión. Actualmente, este tipo de sistema es considerado la forma más fácil y menos costosa de controlar esta liberación (Costa *et al.*, 2004).

### **1.3.3 FORMA FARMACÉUTICA LIBERACIÓN CONTROLADA.**

En la tecnología de la liberación controlada lo más importante es crear un medio en el cual se obtenga una respuesta óptima, con efectos secundarios mínimos y una eficacia prolongada en el organismo (Escobar *et al.*, 2002).

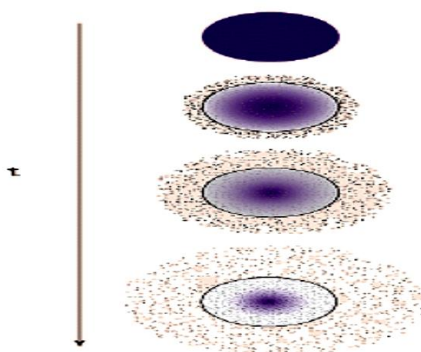
La selección de fármacos candidatos para ser incorporados a formulaciones orales de liberación controlada debe estar basada en criterios fisicoquímicos, biofarmacéuticos, farmacocinéticos y clínicos. Las características ideales que deben presentar son: semivida de eliminación corta, buena absorción gastrointestinal con escaso efecto de «primer-paso», baja dosificación por alta actividad intrínseca y riesgo de toxicidad asociado a frecuentes oscilaciones de las concentraciones séricas (Domínguez-Gil y Suárez, 2000; Silva, 2011).

Para fármacos con una semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) inferior a 8 horas, las formulaciones de liberación controlada permiten reducir la frecuencia de la administración y mantienen relativamente constantes las concentraciones séricas. Para fármacos con margen terapéutico estrecho, las formulaciones de liberación controlada permiten incrementar la eficacia y reducir las reacciones adversas (Domínguez-Gil y Suárez, 2000).

### 1.3.4 MECANISMOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA.

Existen varios mecanismos por los cuales pueden liberarse diferentes principios activos a partir de matrices poliméricas. Uno de ellos es sin duda la difusión, la cual ocurre cuando un agente activo atraviesa el polímero que forma el dispositivo de liberación (Escobar, 2002; Silva, 2011).

En la **Figura 1-7**, se han mezclado los monómeros y el agente activo formando un sistema homogéneo. La liberación del agente activo se produce por simple difusión a través de la matriz polimérica hinchada y hacia un ambiente externo. Si el proceso de liberación es continuo, la cantidad de fármaco dentro de la matriz polimérica normalmente disminuye en el tiempo (Escobar, 2002).



**Figura 1-7. Representación esquemática de un sistema de liberación controlada de fármaco en el tiempo (Escobar, 2002).**

Los sistemas de liberación controlados están inicialmente secos y cuando se introduce en el cuerpo humano, absorberá agua u otros fluidos del cuerpo hasta hincharse. El hinchamiento aumenta el volumen acuoso dentro del hidrogel así como su tamaño tridimensional permitiéndole al fármaco difundir a través de la red hinchando al medio externo (Escobar, 2002; Silva, 2011).

### **1.3.5 Sistemas de liberación por vía oral.**

Entre las primeras aplicaciones de los sistemas de liberación controlada de fármacos por encapsulación están los medicamentos suministrados por vía oral. Una vez más, para este tipo de sistema, la liberación está íntimamente relacionada con el hinchamiento de los sistemas poliméricos. Un gran número de los polímeros sensibles al pH se hinchan a altos valores de pH y se deshinchán a valores bajos de pH, además que estos sistemas tienen la característica de proteger el fármaco de la acción de las enzimas y fluidos gástricos que son muy ácidos (pH = 1) y básicos en el intestino (pH = 8,5). Además muchos dispositivos orales son diseñados para que se desintegren y se disuelvan después de pasar por el intestino. Son muchas las variables que afectan la proporción del fármaco liberado, tales como, el tamaño de la tableta y la concentración del fármaco, el tamaño de poro de la matriz inerte y la solubilidad intrínseca del fármaco en medio acuoso (Escobar, 2002; Silva, 2011).

## **1.4 COMPRIMIDOS MATRICIALES.**

Los sistemas matriciales pueden ser considerados actualmente como una de las formas más fáciles y menos costosas de controlar la liberación de los principios activos (Costa *et al.*, 2003). Este tipo de comprimidos o sistemas son en los que el principio activo se encuentra repartido en una matriz, generalmente de tipo polimérica (Suñe, 2002), que retardan y regulan la liberación del principio activo, mediante un proceso que sigue las leyes de difusión. Los tipos de mecanismos que gobiernan la liberación de los principios activos en los sistemas matriciales son (Suñe, 2002; Silva, 2011):

- A. Tipo I o Fickniano: Se encuentra en las matrices inertes en las que el fármaco hidrosoluble está disperso en una matriz insoluble. La velocidad de liberación disminuye en función del tiempo, debido a que la longitud del trayecto de difusión para las moléculas de principio activo aumenta a medida que el frente del disolvente avanza hacia el centro del comprimido o matriz. La cantidad de fármaco disuelta es

proporcional a la raíz cuadrada del tiempo transcurrido hasta alcanzar una liberación de aproximadamente el 60% de la dosis vehiculizada.

- B. Tipo II: Este mecanismo se presenta cuando la liberación del principio activo es controlada por el hinchamiento de la matriz o comprimido matricial.
- C. Difusión anómala o No Fickniano: En este caso la liberación del principio activo depende simultáneamente de los fenómenos de hinchamiento y de difusión de la matriz.
- D. Tipo Supra II: El comprimido presenta, en el medio de disolución, una capa superficial totalmente hidratada que sufre erosión continua durante el proceso de liberación. En algunos casos, la liberación de fármaco se acerca a orden cero si la velocidad de avance del frente del medio de disolución hacia el interior del comprimido y la velocidad de erosión (o de disolución, si el polímero es hidrosoluble) se compensan.

Según las características que gobiernen la liberación, se pueden distinguir tres tipos de matrices (Costa *et al.*, 2003; Silva, 2011; Suñe, 2002):

#### **1.4.1 Matrices inertes, plásticas o insolubles**

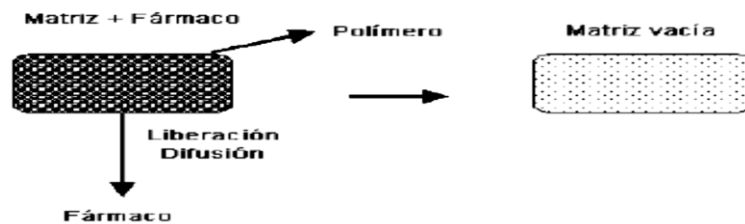
Denominadas comúnmente *matrices plásticas o insolubles*, forman una red sólida porosa compuesta de sustancias no tóxicas, no digeribles e insolubles en el tracto gastrointestinal. Ellas se eliminan en forma intacta junto con las heces. El número de excipientes que pueden utilizarse para obtener este tipo de matrices es amplio gracias al desarrollo de la química moderna. Estos deben cumplir varias exigencias:

- La formación de una red porosa no desintegrable después de la compresión.
- Insolubilidad en los fluidos del tracto gastrointestinal.
- Compatibilidad con fármacos y otros componentes.
- No tóxicos.

El proceso de liberación de fármaco ocurre por difusión a través de los poros de la matriz y depende de la concentración del fármaco, su solubilidad, los aditivos y la naturaleza de los líquidos de la granulación. Otros factores que podrían modificar la liberación del principio

activo son: el tamaño de partícula del excipiente, la forma y área superficial del sistema matricial, la presión de compresión (Costa *et al.*, 2003; Silva, 2011).

Este tipo de matrices es de gran utilidad ya que la influencia de las condiciones del medio (pH, concentración iónica, actividad enzimática o motilidad gastrointestinal) son mínimas o nulas, con excepción de aquellos fármacos cuya solubilidad depende fuertemente de las variaciones del pH. Por esta razón, este tipo de matriz se usa esencialmente para las moléculas relativamente solubles (Costa *et al.*, 2003; Silva, 2011) (**Figura 1-8**).



**Figura 1-8. Representación esquemática del proceso de difusión de un fármaco desde una matriz inerte (Costa et al., 2003; Silva, 2011).**

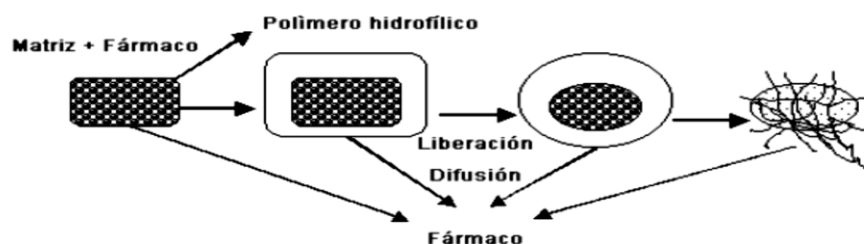
#### 1.4.2 Matrices hidrofílicas

Estas son obtenidas por la compresión de una mezcla que contiene un principio activo relativamente soluble y un polímero no digerible que actúa como un agente gelificante. Este polímero se hidrata e hincha cuando entra en contacto con los líquidos digestivos. De esta manera hay formación de una capa gelificada, cuyo espesor aumentará con el tiempo. El fármaco tiene que difundir progresivamente a través de esta capa gelificada. La liberación del principio activo puede describirse en cuatro pasos no consecutivos:

- La penetración del líquido del medio de disolución o del tracto gastrointestinal en el comprimido junto con la disolución simultánea de una cantidad pequeña de fármaco que se encuentra en la superficie externa de la forma farmacéutica.
- Hinchamiento del polímero hidrófilo por adsorción de agua y formación de una barrera gelificada.

- Penetración de los líquidos circundantes en la profundidad de los comprimidos por difusión a través de la capa de gel y disolución del fármaco.
- Difusión del fármaco disuelto a través de la barrera gelificada.

En las matrices hidrofílicas, es posible modificar el ambiente de disolución de fármaco para controlar la velocidad de liberación creando un “micro-pH” en la matriz con el uso de sustancias apropiadas para estos fines (Costa *et al.*, 2003; Suñe, 2002; Silva, 2011) (**Figura 1-9**).

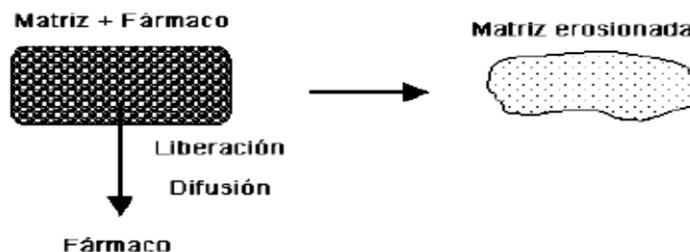


**Figura 1-9.** Representación esquemática del proceso de liberación de un fármaco desde una matriz hidrofílica (Costa *et al.*, 2003).

### 1.4.3 Matrices lipídicas

Son a menudo llamadas “*matrices insolubles*” o “*matrices ceras*” a causa de su apariencia, o “*matrices erosionables*”. El principio activo se suspende en un excipiente lipídico, en el que queda aprisionado o “incrustado”. Los excipientes están constituidos por glicéridos, principalmente saturados (mono-, di- y triglicéridos), ácidos y alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y de alcoholes de bajo peso molecular y por ceras, constituidas principalmente por ésteres de alcoholes y de ácidos grasos superiores. Estos excipientes, generalmente de origen natural, son bien tolerados fisiológicamente.

Los fármacos incorporados son generalmente lipofílicos, que se disuelven o quedan parcialmente en suspensión (Silva, 2011; Costa *et al.*, 2003) (**Figura 1-10**).



**Figura 1-10. Representación esquemática del proceso de erosión desde una matriz lipídica (Costa *et al.*, 2003)**

#### **1.4.4 Fabricación de comprimidos.**

Los comprimidos se consideran que son la forma más deseable de dosificación en la administración de fármacos, ya que es preferido tanto por los pacientes como por la industria. Los comprimidos consisten en la mezcla de componentes en polvo los cuales contribuyen en las propiedades finales del producto (Villanova *et al.*, 2011).

La producción de comprimidos, especialmente comprimidos hechos por compresión directa, es simple y los procesos de la producción involucran bajos costos, lo cual es atractivo para los laboratorios farmacéuticos. El término “compresión directa” (CD) es usado para definir el proceso por el cual se comprimen de forma directa los comprimidos a partir de la mezcla en polvo de los ingredientes activos y los excipientes adecuados. No existe un pre-tratamiento de la mezcla de polvos por granulación húmeda o seca es necesario. Es así como la compresión directa ocurre a través de tres pasos para producir la forma de dosificación final: la mezcla de polvo, lubricación y compresión (Villanova *et al.*, 2011).

Al realizar la compresión cuando se alcanza una cierta presión, el reordenamiento de las partículas cesará debido al reducido espacio y el aumento de la fricción entre estas. La reducción del volumen adicional a continuación se llevará a cabo por cambios en las dimensiones de las partículas. Estas pueden fracturarse en partículas más pequeñas y discretas o fragmentos, o las partículas originales pueden someterse a cualquiera de los

cambios temporales (es decir, la deformación elástica) o permanente (es decir, deformación plástica) en la forma como se aumenta la presión (Salbu, 2011).

La compresión directa es un proceso más económico, reduce el tiempo de ciclo en los productos, y es más simple en términos de requerimientos de GMP. Debido a que con un menor número de pasos, sin agua y temperatura, la estabilidad del producto final puede ser aumentada y, finalmente, la compresión directa es amigable con el ambiente (Villanova *et al.*, 2011).

La mayoría de las formulaciones de comprimidos orales representan las llamadas formas farmacéuticas de liberación inmediata. Las formas de dosificación convencional contienen principios activos con vidas medias de eliminación cortas por lo que deben administrarse numerosas veces al día de forma de mantener un nivel plasmático efectivo de la droga, lo cual representa un inconveniente mayor en términos de cumplimiento por parte del paciente. Los excipientes para la compresión directa deben tener las propiedades físicas adecuadas para el proceso de compresión. La fluidez es necesaria para asegurar la homogeneidad y el llenado uniforme de los comprimidos. Otro parámetro importante en la producción incluye la alta capacidad de compresión y la consolidación del polvo. Por otra parte, el comprimido debe mantenerse en la misma forma una vez que la fuerza de compresión ha sido removida. Un excipiente de compresión directa debe tener un potencial de dilución alto, para que la forma final tenga el menor peso posible (Villanova *et al.*, 2011).

#### **1.4.5 Sistemas de liberación controlada y pectinas.**

Actualmente la mayoría de las formas farmacéuticas existentes en el mercado son elaboradas a base de polímeros sintéticos y en mucha menor escala se utilizan los polímeros de origen natural, conocidos como biopolímeros, estos son compuestos que son fácilmente degradables por la microflora presente en el colon que tiene como característica el proteger al material bioactivo de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal superior (Liu *et al.*, 2003).

Entre los polisacáridos utilizados en la actualidad encontramos (Beneke *et al.*, 2009; Salbu *et al.*, 2010): celulosa, hemicelulosa, inulina, carragenanos, alginatos, quitosano, gomas, mucilagos y siendo las de interés para este tema de tesis las pectinas.

La pectina se ha investigado, que se mantiene intacta en el tracto gastrointestinal superior y es degradada por la micro flora del colon (Liu *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2004) y no son digeridas por las enzimas gástricas o intestinales y se solubilizan en el fluido acuoso del tracto gastrointestinal (Awasthi, 2010), por lo que ha sido estudiada como un excipiente en muchos tipos de formas de dosificación tales como: película de revestimiento de fármacos cuando se mezcla con celulosa de etilo, sistemas de micro partículas en preparaciones oftálmicas y como matriz en los parches transdérmicos y tiene un alto potencial como material hidrófilo polimérico para sistemas de liberación de fármacos (Beneke *et al.*, 2009). Todos estos estudios han sido en base al uso de pectinas de origen cítrica, sin embargo se han propuesto el utilizar pectinas provenientes de nuevas fuentes

Las sales de calcio de las pectinas tienen solubilidad reducida y las matrices de tabletas preparadas con pectinato de calcio muestran un muy buen potencial para ser usadas en drogas con sistemas de liberación en el colon.

Las pectinas son adecuadas excipientes para formas farmacéuticas tales como suspensiones, microesferas y matriz para tabletas (Awasthi, 2010).

En la actualidad existen en el mercado numerosos productos formulados para administración oral y parenteral que entregan el principio activo en forma controlada. Sin embargo, muchos de estos preparados emplean tecnologías muy sofisticadas en su elaboración, difícilmente alcanzables en países en desarrollo y con mercados reducidos. Por este motivo, es interesante el desarrollo de este tipo de formulaciones en forma de matrices, que llevan el fármaco uniformemente disperso y desde donde se libera principalmente por mecanismos difusionales y cuya gran ventaja es que el producto farmacéutico se puede obtener mediante tecnologías convencionales (Costa *et al.*, 2003).

La aplicación de sistemas poliméricos de dosificación controlada ofrece una atractiva alternativa para conseguir niveles constantes de fármaco en el organismo (Escobar *et al.*, 2002).

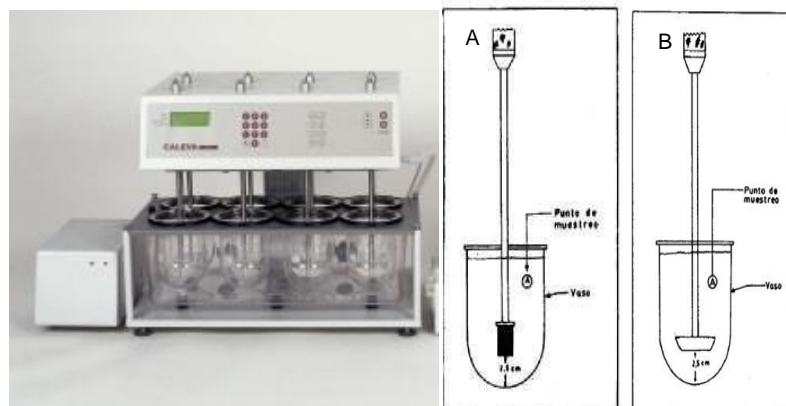
Dado que los polisacáridos cumplen con muchos de los requisitos que se esperan para los excipientes farmacéuticos tales como la no-toxicidad, estabilidad, disponibilidad y capacidad de renovación, es que son ampliamente investigados para su uso en el desarrollo de formas sólidas de dosificación oral. Además, los polisacáridos con diferentes propiedades fisicoquímicas pueden ser extraídos de las plantas a costo relativamente bajo y pueden ser adaptados químicamente de forma de adaptarse a las necesidades específicas. Como un ejemplo, muchos vegetales ricos en polisacáridos se utilizan con éxito como formadores de matriz en formas de liberación controlada (Beneke *et al.*, 2009).

Los biopolímeros han sido ampliamente estudiados en aplicaciones farmacéuticas para modificar la liberación de principios activos. El empleo de estas sustancias en el control de la liberación busca la dosificación del fármaco a través de la matriz polimérica en flujos dentro de su ventana terapéutica, esto conlleva a la reducción de efectos adversos por fluctuación en las concentraciones plasmáticas del fármaco y la disminución del número de dosis necesarias del medicamento (Rojas *et al.*, 2008).

Entre los polímeros de origen natural utilizados para formular sistemas de liberación de fármacos se encuentra el colágeno, la albumina o el quitosano, entre otros mencionados anteriormente. En cambio en los polímeros sintéticos se pueden distinguir dos grupos, los que son de tipo biodegradables como son los ácidos poliláctico y poliglicólico, y los que son polímeros no biodegradables como son los ácidos poliacrílicos (Espinoza, 2008).

Para medir la efectividad de la liberación de un principio activo en una matriz polimérica se puede realizar evaluando la disolución del principio activo en medio acuoso. Entre los métodos más utilizados experimentalmente se encuentran: *el aparato 1*, conocido como “método de canastillo” y *el aparato 2* (**Figura 1-11**), conocido como “método de paleta”, ambos se realizan bajo condiciones fisiológicas, de forma que se puedan interpretar los datos para obtener un rendimiento en relación al proceso *in vivo*. La elección del tipo de

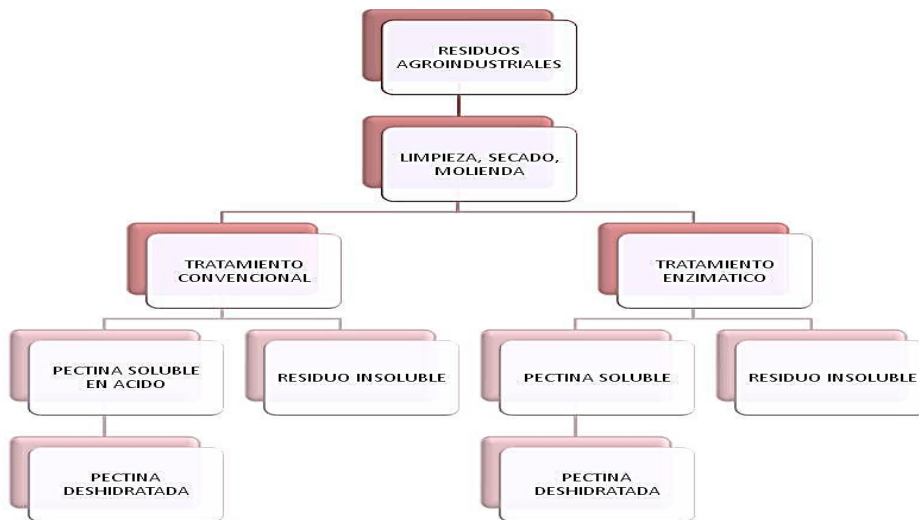
equipo depende de la especificación que indique la monografía de disolución descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (Girard, 2009).



**Figura 1-11. Equipo de disolución. A) Método de canastillo, B) Método de paleta.**

## 1.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PECTINAS.

Existen diferentes técnicas para la extracción de pectina a partir de tejidos vegetales (**Figura 1-12**), las cuales utilizan procedimientos fisicoquímicos, microbiológicos o enzimáticos. Sin embargo, los procedimientos fisicoquímicos, si bien son los más utilizados a nivel industrial, tienen las desventajas que conlleva el manejo, tanto de ácidos fuertes como de altas temperaturas, sin mencionar sus altos requerimientos energéticos y los problemas de contaminación ambiental que generan. Desde hace algunos años nuestro país ha estado contribuyendo directamente a los Acuerdos de Producción Limpia (APL), por lo que se ha informado sobre diversos trabajos relacionados con el uso de las técnicas microbiológicas y enzimáticas; sin embargo, son escasos los estudios que relacionan dichos procesos con la optimización de las condiciones de operación (Zapata *et al*, 2008). Tanto la hidrólisis química y enzimática fácilmente descompone los polisacáridos pécticos en fragmentos individuales (Novosel'skaya *et al.*, 2000).



**Figura 1-12. Resumen de extracción método convencional y método enzimático.**

### 1.5.1 Método Convencional

Es el método de hidrólisis ácida y posterior precipitación con etanol, es el método convencional para extracción de pectinas comerciales (cítricos y manzanas). Éste proceso se lleva a cabo bajo influencia de diferentes factores, principalmente: temperatura (80-95°C), pH (1,5 y 3,0) y tiempo (20 y 120 minutos); en el que la pectina se extrae por medio de agua caliente acidulada en un medio de pH bajo (1,5 y 3,0). Para hacer más eficiente el proceso de extracción primero que todo se deben inactivar las enzimas pécticas, poniendo la materia prima en agua y calentando a ebullición para eliminar posibles contaminantes (Fredes C. *et al.*, 2009; Mollea C. *et al.*, 2008; Rovaris *et al.*, 2007; Yapo *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Método Enzimático

La hidrólisis enzimática de la pectina es una mejor técnica de hidrólisis de este polímero sin degradación. Sin embargo, este procedimiento necesita diferentes tipos de pectinasas para realizar la degradación de la pectina (Garna *et al.*, 2006).

Los procedimientos enzimáticos para la extracción de pectina utilizan aquellas enzimas, de origen microbiano, que tienen la capacidad de solubilizar pectina a partir de sustancias pécticas (Yapo, 2009). La clasificación de estas enzimas está basada en el ataque sobre la

estructura en la cual actúen. Básicamente existen tres tipos de enzimas las que se muestran en la Tabla 1-5 y Tabla 1-6:

**Tabla 1-5.** Clasificación de las enzimas pécticas que actúan sobre pectinas o ácidos pécticos (Pagan, 1999).

Nombre recomendado por la EC	Nombre habitual	N° EC	Sustrato	Enlace
<i>Enzimas desesterificantes</i>				
Polimetilgalacturonato esterasa (PMGE)	Pectina esterasa	3.1.1.11	Pectina	Afectado al azar
<i>Enzimas despolimerizantes</i>				
<b>Hidrolasas</b>				
Endopoligalacturonasa (Endo-PG)	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	al azar
Exopoligalacturonasa 1 (Exo-PG1)	Poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	último cadena penúltimo cadena
Exopoligalacturonasa 2 (Exo-PG2)	Pofigalacturonasa	3.2.1.82	Pectato	cadena
Endopolimetilgalacturonasa (Endo-PMG)	Pectina hidrolasa		Pectina	al azar
exopolimetilgalacturonasa (Exo-PMG)	Pectina hidrolasa		Pectina	último cadena
<b>Liasas</b>				
Endopoligalacturonato liasa (Endo-pGL)	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	al azar penúltimo cadena
Exopoligalacturonato liasa (Exo-PGL)	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	cadena
Endopolimetilgalacturonato liasa (Endo-PMGL)	Pectina liasa	4.2.2.10	Pectato	al azar
Exopoliemetilgalacturonato liasa (Exo-PMGL)	Pectina liasa	Pectina		último cadena

**Tabla 1-6.** Pectinasas y su acción sobre homogalacturano y rhamnogalacturano (Duvetter et al., 2009).

Enzima	Sustrato	Mecanismo
<b>Homogalacturano</b>		
Pectinmetilesterasa	Pectina	Hidrólisis
Poligalactoronasa (PG)		
Endo-PG	Ácido péctico	Hidrólisis
Exp-PG	Ácido péctico	Hidrólisis
Pectinliasa	Pectina	$\beta$ -eliminación
Pectatoliasa (PL)		
Endo-PL	Ácido péctico	$\beta$ -eliminación
Exo-PL	Ácido péctico	$\beta$ -eliminación
<b>Rhamnogalacturano</b>		
Rhamnogalacturonasa	Pectina	Hidrólisis

- I. Enzimas desesterificantes** (pectinestearasas) que catalizan la desesterificación de los grupos metoxilos de la pectina formando ácido péctico. Estas enzimas son producidas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores (Sainz, 2008).
- II. Enzimas despolimerizantes** (pectinasas: hidrolasas y liasas) que rompen cualquiera de los enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glucosídico entre los monómeros de ácido galacturónico de las sustancias pécticas por hidrólisis (hidrolasas) o por  $\beta$ -eliminación (liasas). Las *hidrolasas* han sido divididas en cuatro grupos: aquellas que prefieren al pectato fueron denominadas *poligalacturonasas*, mientras que las que prefieren degradar la pectina fueron denominadas *polimetilgalacturonasas*. Los prefijos endo- y exo-utilizados en conjunto con cualquiera de estos nombres denotan una acción aleatoria o desde los extremos sobre las moléculas, respectivamente. Las endo-poligalacturonasas (endo-PGasas) son producidas por una amplia variedad de organismos, entre ellos, numerosos hongos y bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos parásitos de plantas. Y las exo-poligalacturonasas (exo-PGasas) han sido encontradas en diferentes frutas y vegetales, así como también en hongos y algunas bacterias (Sainz, 2008).
- Las *liasas*, que son también denominadas transeliminadas, rompen los enlaces glucosídicos tanto del pectato (endo- y exo- poligalacturonatoliasa) como de la pectina (endopolimetilgalacturonatoliasa o pectinliasa). Las pectinliasas (endo-) son las únicas pectinasas que hidrolizan la pectina altamente metilada (Sainz, 2008).
- III. Protopectinasas** (PPasas) son las enzimas capaces de hidrolizar la protopectina convirtiéndolas en pectina altamente polimerizada y soluble. Estas son clasificadas a su vez en dos tipos: las *tipo A* hidrolizan la región de ácidos poligalacturónicos de la protopectina y las *tipo B* hidrolizan las cadenas de polisacáridos que conectan las cadenas de ácido poligalacturónicos y los constituyentes de la pared celular (Sainz, 2008).

Las *Ramnogalacturonasas* son enzimas recientemente descritas, las cuales son capaces de degradar pectina. Actúan, junto con una ramno-galacturonano acetilasa, únicamente sobre regiones de la pectina ramificada, liberando oligosacáridos compuestos por secuencias alternadas de residuos L-ramnosilos con uniones  $\alpha$ -(1,2) y D-galacturosilos con uniones  $\alpha$ -(1,4), con grupos galactosilos con uniones  $\alpha$ -(1,4) sobre algunas de las unidades ramnosilos. La terminación no reductora siempre es una unidad de ramnosa. Estas enzimas poseen una gran importancia tecnológica ya que ayudan a la solubilización y fragmentación de las regiones pilosas facilitando la extracción y filtrado de jugos (Sainz, 2008).

En el año 2011, Silva evaluó la extracción de pectinas por método convencional a partir de residuos agroindustriales como una fuente en los sistemas de liberación controlada, en aquel trabajo se ensayaron y evaluaron los perfiles de disolución para comprimidos de paracetamol 80mg, comprimidos formulados individualmente con extractos de pectinas y pectina cítrica comercial al 30% p/p como excipientes. Las sustancias pécticas fueron extraídas a partir de residuos de pera, plátano naranja y durazno mediante hidrólisis con ácido clorhídrico y aisladas por precipitación con etanol, obteniéndose para todos los casos extractos de pectinas de alto metoxilo (PAM). Los comprimidos (con y sin pectinas) fueron elaborados por compresión directa en una prensa hidráulica y sometida al análisis de disolución. Los resultados obtenidos mostraron que si bien todas las pectinas retardan la disolución del paracetamol, sólo la pectina de durazno entrega valores que se pueden correlacionar con los parámetros que se establecen para ser clasificado como un comprimido de liberación prolongada (Silva, 2011). De acuerdo a lo anterior, al utilizar el método convencional se está hidrolizando tanto las pectinas presentes como la hemicelulosa y celulosa de la pared celular, es por esto que se considera que al extraer las pectinas utilizando un método enzimático, se debieran obtener productos de una pureza mayor y al ser utilizados como matrices en comprimidos de liberación controlada, de esta forma mejorando los resultados obtenidos en el estudio realizado anteriormente por Silva.

## **2 HIPÓTESIS.**

La extracción de pectinas a partir de residuos agroindustriales por método enzimático en comparación con el método por extracción con ácido, permitirá obtener pectinas de igual o superior respuesta para su uso en sistemas de liberación controlada de comprimidos de paracetamol.

### **3 OBJETIVOS.**

#### **3.1 Objetivo General**

Comparar las pectinas obtenidas por tratamiento enzimático con las obtenidas por método convencional, y evaluar su aplicación en sistemas de liberación controlada en un determinado fármaco.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Establecer el contenido de pectinas en diversos residuos provenientes de la agroindustria.
- Obtener pectinas provenientes desde residuos agroindustriales con potencial uso como sistema de liberación controlada aplicando un tratamiento enzimático con Rohapect DA6L.
- Establecer el grado de esterificación de las pectinas obtenidas mediante la técnica de espectroscopia de infrarrojo (FT-IR).
- Estudiar la capacidad de las pectinas extraídas como matriz de principio activo en sistemas de liberación controlada.

## **4 MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **4.1 MATERIA PRIMA**

Los residuos agroindustriales de pera y coseta agotada de remolacha fueron provistos por el Laboratorio de Enzimas de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia de la Universidad Católica de Valparaíso.

### **4.2 REACTIVOS QUÍMICOS**

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Merck, Riedel de Hæn, Supelco, J.T. Baker y Sigma y cumplen con el ser de grado analítico (p.a) con valores de pureza superior al 99%.

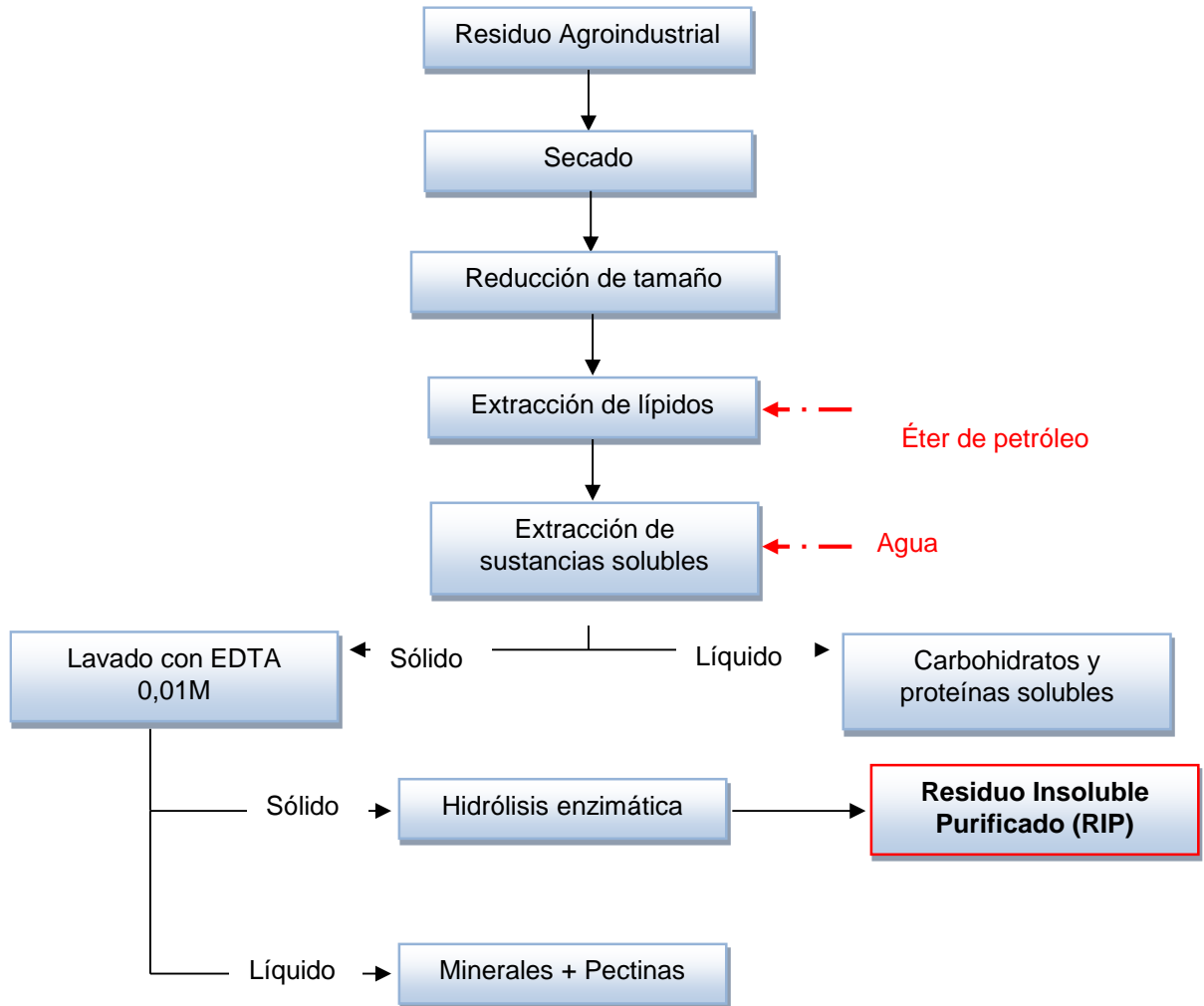
### **4.3 PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA**

Lavar con abundante agua los residuos, con el objetivo de eliminar elementos contaminantes. Luego escurrir exceso de agua y colocar en estufa a 60°C por 24 horas. Posteriormente triturar y almacenar en bolsas herméticas hasta su utilización.

### **4.4 OBTENCIÓN DE PECTINAS DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

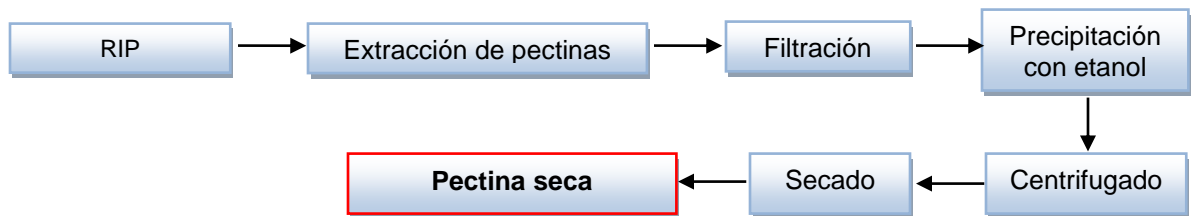
Esta etapa consiste en aislar u obtener pectinas a partir de residuos agroindustriales. Para ello se utilizará el método propuesto por Claye *et al* 1996, proceso estándar que permita remover los lípidos, polisacáridos solubles y proteínas mediante procesos físicos, químicos o enzimáticos, reduciendo de esa manera el posterior efecto de la variable tipo de sustrato en el fraccionamiento del material lignocelulósico. En este sentido, se propone remover los lípidos mediante extracción con hexano, las proteínas por hidrólisis enzimática con

proteasas, el almidón por acción de amilasas y la recuperación de pectinas por acción de pectinasas (**Figura4-1**).



**Figura 4-1. Obtención de Residuo Insoluble Purificado (RIP) (Silva, 2011).**

Una vez que se ha obtenido el Residuo Insoluble Purificado se procede a la extracción de las pectinas por vía enzimática, como se muestra en la **Figura 4-2**:



**Figura 4-2. Diagrama de flujo de extracción de pectinas por vía enzimática.**

## **4.5 CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS.**

Una vez obtenidas las pectinas, estas se caracterizan con el fin de determinar sus características principales (Gavira *et al*, 2005).

### **4.5.1 GRADO DE ESTERIFICACIÓN (Woo *et al.*, 2010; Silva, 2011; Espejo, 2011).**

50 mg (**m**) de pectinas secas se disuelven en 10 ml de ADD (Agua Destilada) mediante agitación. La solución resultante es titulada con hidróxido de sodio estandarizado (NaOH 0,1N) y unas gotas de fenolftaleína como indicador. El volumen consumido durante la titulación se registra como **v<sub>1</sub>**. Posteriormente, se le adicionan 30 mL de NaOH 0,1N a la mezcla ya titulada, con la finalidad de desesterificar las pectinas, a temperatura ambiente por 30 minutos. A continuación se le adicionan 30 mL de ácido clorhídrico estandarizado (0,1N) con la finalidad de neutralizar el NaOH. Finalmente se vuelve a titular la solución con NaOH 0,1N y unas gotas de fenolftaleína como indicador. El volumen de la titulación se registra como **v<sub>2</sub>**.

El grado de esterificación se expresa como DE(%) y se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DE(\%) = \frac{v_2}{v_1+v_2} \times 100$$

### **4.5.2 CONTENIDO DE ÁCIDO GALACTURÓNICO.**

El procedimiento es el mismo que para el cálculo del grado de esterificación. Se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Ácido Galacturónico (mg)} = 19,41 \times (v_1+v_2)$$

#### 4.5.3 Medición de PH.

Se determinará utilizando un pHmetro con una solución de pectina al 1% (1g de pectina en 10 mL de agua).

#### 4.5.4 HUMEDAD.

Se pesa la muestra inicialmente (I) y se seca a una temperatura de 105 +/- 5°C a una temperatura constante, lo que entregará un peso final (F). El porcentaje de humedad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Humedad\%} = \frac{\text{I (g)} - \text{F (g)}}{\text{I (g)}}$$

#### 4.5.5 ÁCIDO URÓNICO.

Se determina la cantidad de ácido urónico mediante método colorimétrico, leyendo las absorbancias a una longitud de onda de 525 nm (Fournier, 2001).

#### 4.5.6 GRADO DE METILACIÓN.

El grado de metoxilo se obtiene a partir del DE. Se expresa como DM(%) y se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula, modificada de la FCC, 2004:

$$\text{DM(\%)} = \frac{v_2 \times N_{\text{NaOH}} \times PM \times OCH_3}{m} / 100$$

#### **4.6 PREPARACIÓN DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA (Silva, 2011).**

Se analizó la capacidad que posee la pectina de pera y de coseta agotada de remolacha para retardar la liberación de paracetamol en un comprimido de liberación convencional y de un comprimido de liberación modificada (Anexo 1).

##### **4.6.1 Preparación de comprimidos de paracetamol de liberación convencional.**

La preparación de los comprimidos de paracetamol se realizó mediante el uso de una prensa hidráulica Perkin-Elmer, la composición de cada comprimido se basó en la evaluación realizada por Silva 2011, la cual consiste en:

- Paracetamol, 80 mg
- Pectina, 30%p/p
- Lactosa, csp

##### **4.6.2 Preparación de comprimidos de paracetamol con pectina comercial (Silva, 2011).**

Se prepara el comprimido con pectina comercial mediante el uso de una prensa hidráulica a 64kP/cm<sup>2</sup>, se utilizaron las siguientes cantidades basándose en los datos obtenidos por Silva 2011.

- Paracetamol, 80 mg
- Pectina comercial, 137 mg
- Lactosa, csp 500 mg

##### **4.6.3 Preparación de comprimidos de paracetamol con pectina obtenida de residuos (Silva, 2011).**

En este caso se prepararon comprimidos con pectina de pera y de coseta agotada de remolacha, por medio el uso de una prensa hidráulica. La formulación considera las mismas condiciones que para la preparación del comprimido con pectina comercial.

#### **4.7 COMPARACIÓN DE LA FORMA FARMACEUTICA FABRICADA CON UNA FORMA DE LIBERACION CONVENCIONAL (Silva, 2011)**

En esta fase se realizó un estudio comparativo de disolución *in vitro*, lo que correlaciona la disolución de la forma farmacéutica *in vitro* con su eficiencia *in vivo*. Este método se estudia en un aparato de disolución USP de 6 vasos Hanson Research *in vitro* en el laboratorio LATEFAR de la Facultad de Farmacia. Este aparato permite comparar la disolución del comprimido con pectina y del comprimido de liberación convencional a diferentes intervalos de tiempo. Es un factor importante que los tiempos de disolución utilizados en ambos perfiles sean exactamente los mismos y a intervalos que permitan caracterizar el perfil de disolución completo. Los tiempos considerados fueron a 5, 15, 30, 45 y 60 minutos.

Como lo indica la monografía para el estudio de disolución de paracetamol, se utilizó un medio buffer fosfato a pH  $5,8 \pm 0,01$  en un volumen de 900 mL. Se agregó el comprimido a cada vaso y se sacaron alícuotas de 5 mL con una micropipeta (p 5000), cada alícuota se traspasó en un filtro con tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  para luego ser diluida en una relación de  $500 \mu\text{L}$  sobre 5 mL de buffer fosfato, y posteriormente fueron medidas en el espectrofotómetro Genesys 10uv, en una celda de cuarzo, a la longitud de onda de máxima absorbancia del paracetamol, la cual es de 243 nm (USP 29, 2006).

Para realizar el estudio se preparó una solución estándar de paracetamol, el cual fue almacenado en un frasco ámbar, a partir de esto se obtuvo la constante a partir de la siguiente fórmula:

$$y = mx + b$$

$$\text{(Absorbancia = Pendiente * Concentración + Intercepto)}$$

Por lo que se puede decir que la concentración en cada vaso a los diferentes tiempos será:

$$\text{Concentración} = (\text{Absorbancia} - \text{Intercepto}) / \text{Pendiente}$$

Para la comparación de los perfiles de disolución, se trabaja con curvas de calibración apropiadas para poder interpolar las concentraciones de paracetamol disuelto.

De esta forma se debe realizar la corrección del porcentaje del fármaco disuelto a través de los siguientes pasos:

1. Dada la concentración que entrega la absorbancia se debe multiplicar por un factor de dilución (FD), que tiene valor 10, ya que la alícuota que se extrae del vaso se diluye 10 veces: 500  $\mu$ L sobre 5 mL de buffer fosfato, donde se obtiene C (concentración).
2. Para calcular los miligramos (mg) de paracetamol contenido en cada alícuota se utiliza la siguiente fórmula: **C = mg x 5 mL**; siendo C la concentración original de la alícuota y 5 mL el volumen que se toma del vaso.
3. Se realizó un cálculo de sumatorias de alícuotas extraídas ( $\Sigma$ ), siendo 0 la sumatoria del primer tiempo, y se suman sucesivamente los mg de las alícuotas anteriores.
4. **mg en el vaso sin corregir = C x 900 mL**, siendo 900 mL el volumen total que contenía cada vaso.
5. **total disuelto (mg)** = corresponde a la adición de la sumatoria de alícuotas extraídas y a los mg en el vaso sin corregir, correspondientes a cada tiempo.
6. el porcentaje de fármaco disuelto se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Disuelto} = \frac{\text{mg disuelto total}}{80 \text{ mg}} \times 100$$

Por lo que los resultados quedan tabulados como se indica en el Anexo 2.

#### 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán expresados como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias entre los grupos experimentales serán evaluadas mediante análisis de varianza y la prueba t de Student para observaciones pareadas y no pareadas. Se considerará un valor de  $p < 0.05$  como indicador de diferencia estadísticamente significativa.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS.

En la **Tabla 5-1** se presentan los resultados de grado de esterificación, pH, humedad y grado de metilación de las pectinas obtenidas por método convencional y método enzimático.

**Tabla 5-1.** Caracterización de pectinas obtenidas a partir de residuos agroindustriales

Pectina	pH	Humedad (%)	Grado de esterificación (%)	Grado de metilación (%)
Pera método enzimático	3,98	9,50	86,44	30,6
Coseta método enzimático	4,02	9,90	94,12	19,2
Pera método ácido	3,29	8,28	83,33	15,3
Coseta método ácido	4,74	8,10	90,91	12,2

Según lo establecido por la USP 30 la pérdida de humedad para las pectinas debe ser menos de un 10% del peso original de muestra (1g), por lo que se cumple este parámetro para las pectinas obtenidas por método convencional ácido y las pectinas obtenidas por método enzimático. Todas las pectinas presentan pH entre 3,0 y 4,0, lo que presentan baja interacción a valores similares como es el caso del pH estomacal. Las pectinas que están a pH mayor a 3,0, se encuentran sus grupos carboxilos ionizados. Esta ionización provoca que la pectina al ser utilizada como una matriz polimérica que contiene un fármaco, este sufra un proceso de liberación controlada.

El grado de esterificación de las pectinas obtenidas (relación de residuos de ácido galacturónico metilesterificados con el total de unidades de ácido galacturónico presentes en la muestra de pectina) (Sriamornsak, 2003; Gavira, 2005; Silva, 2011) fue medido por un método volumétrico (Woo *et al.*, 2010; Silva, 2011; Espejo, 2011), las pectinas obtenidas a partir de los residuos presentan un DE que fluctúa entre 83-94%, por lo que se puede decir que son pectinas de alto metoxilo, ya que como fue explicado anteriormente poseen un  $DE \geq 50\%$ ; sin embargo esto se contradice con los resultados obtenidos en el

análisis realizado por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) donde los espectros obtenidos de las pectinas de coseta agotada de remolacha así como los de pera (Anexo 3), por ambos métodos demuestran que todas las pectinas obtenidas son de un bajo grado de metoxilación, ya que las bandas que se observan en la región entre 1500 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ , permiten la identificación y cuantificación de estas sustancias específicamente. La región correspondiente a 1650 se mide específicamente la cantidad de grupos carboxilos libres, mientras que la región alrededor de los 1750 determina la presencia de los grupos carboxilos esterificados. En cada uno de los espectros se puede ver claramente como es el peak en el rango de los 1650 mayor indicando que las pectinas obtenidas poseen características similares de aquellas pectinas que poseen un grado de esterificación de menos de un 50%, (Silva, 2011). También se observa como en el caso de la pectina de coseta agotada de remolacha, el método por el cual fue obtenida no influyo en los peaks obtenidos al realizar el FTIR; sin embargo en el caso de la pectina pera, el método si influyo en el espectro, este se puede deber a que la pectina obtenida por el método enzimático se eliminaron mas impurezas que con la pectina obtenida por el método convencional.

A mayor grado de esterificación las pectinas son más solubles en agua a temperatura ambiente y a su propio pH. La viscosidad de la solución formada depende de: la concentración, temperatura, grado de esterificación, presencia de electrolitos en el medio. Al controlar todos estos parámetros se puede considerar que las pectinas obtenidas durante este trabajo caen bajo el concepto de “extractos de pectina o sustancias pécticas” (Pagan, 1999; Soriano, 2004; Escobar *et al.*, 2002; Silva, 2011). Las sustancias pécticas son una familia de carbohidratos coloidales bastantes complejas que consisten de moléculas de ácido galacturónico polimerizado (Meñaca, 2010).

Las pectinas obtenidas presentan un bajo grado de metilación, el cual está definido como el *número de moles de metanol por 100 moles de ácido galacturónico* (Morris *et al.*, 2010 a). Cabe destacar que los métodos disponibles para medir la metilación de la pectina incluyen: valoración de los cambios en los grupos carboxílicos después de la hidrólisis básica de la pectina, valoración de la pectina con policaciones, y análisis por cromatografía de gases del

metanol después de la hidrólisis de pectina. Todos estos métodos requieren aislamiento de la pectina desde la pared celular de la planta antes que el grado de metilación pueda ser medido (McFeeters *et al.*, 1984).

En la **Tabla 5-2** se presenta la cantidad de ácido galacturónico determinado por método volumétrico y obtenido por método espectrofotométrico.

**Tabla 5-2.** Contenido de ácido galacturónico por método volumétrico y espectrofotométrico en pectinas de pera y coseta agotada de remolacha.

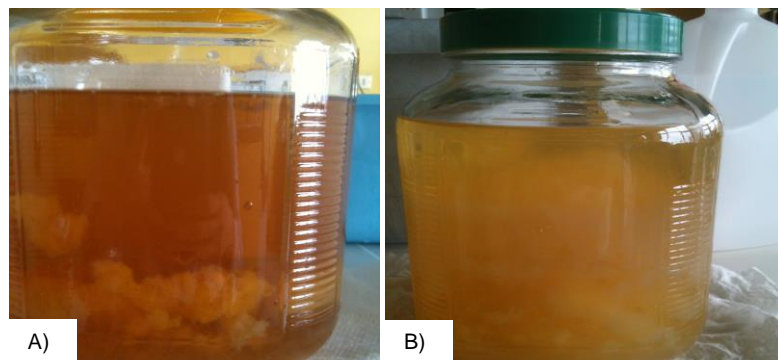
Pectina	Ácido galacturónico (mg) (volumétrico)	Ácido galacturónico (mg) (espectrofotométrico)
Pera método enzimático	65,99	37,80
Coseta método enzimático	114,52	48,47
Pera método ácido	58,23	30,35
Coseta método ácido	42,70	52,58

El ácido galacturónico (AGA) es la unidad primaria de las pectinas, la riqueza en esta sustancia es una de las características que permite determinar la pureza de las pectinas de tipo ácido; es decir de aquellas pectinas que se encuentran de forma más superficial en la pared celular de los vegetales; a mayor cantidad de este ácido la pectina posee mayor peso molecular (Meñaca, 2010). En este caso en particular las pectinas que han sido obtenidas a partir de los residuos de coseta de remolacha así como del residuo de pera, tanto por el método convencional ácido como por el método enzimático, corresponden a pectinas de tipo neutra, es decir, son pectinas que se encuentran más arraigadas al interior de la pared celular; por lo que los valores obtenidos en la medición de AGA en este caso en particular no son concluyentes, por lo expuesto anteriormente.

Las pectinas son ácidos pectínicos con diferentes grados de esterificación y neutralización, que pueden contener de 200 a 1000 unidades de ácido galacturónico (Múñoz, 2011). Se pueden distinguir tres clases principales de sustancias pécticas: *las protopectinas*, que son sustancias insolubles en agua, que se encuentra 100% esterificada; *los ácidos pectínicos*, que son sustancias compuestas por ácido poligalacturónico y presentan un contenido

variable de grupos metilos (siendo el máx 14%), y finalmente *los ácidos pécticos*, que son sustancias compuestas principalmente por ácido poligalacturónico que se encuentra no esterificado por grupos metilos (con un DE 0%). Basándonos en los resultados obtenidos se puede decir que las sustancias pécticas obtenidas serian del tipo protopectinas.

La **Figura 5-1** muestra la diferencia entre los tipos de pectina obtenidas por método enzimático. Se puede observar la diferencia en el color, la claridad, también en la cantidad de hidrocoloide formado al ser precipitado con etanol en frío. La pectina obtenida a partir de pera forma un hidrocoloide definido, de un aparente mayor volumen, mientras que la pectina obtenida a partir de residuo de coseta, el hidrocoloide formado no presenta una forma definida, sin embargo, este si es de gran volumen.



**Figura 5-1. Precipitación de pectinas con etanol al 95%. A) pera, B) coseta agotada de remolacha.**

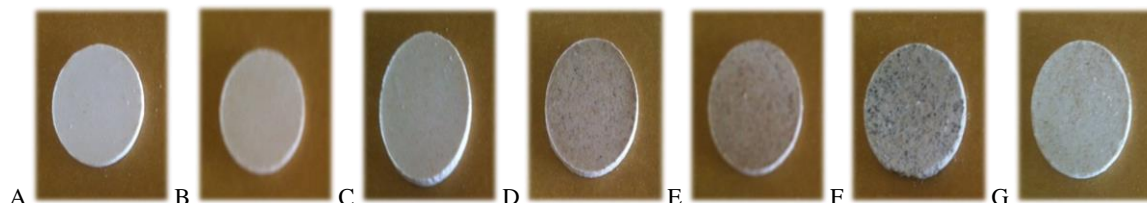
El paso más importante durante la extracción de pectinas es la solubilización, en donde la protopectina insoluble se convierte en pectina soluble debido a la hidrólisis de los enlaces glicosídicos por las enzimas participantes durante la extracción (Calderón *et al.*, 2011) obteniéndose finalmente lo que son las pectinas neutras ya que las hidrólisis actúan a niveles más profundos de la pared celular. A diferencia de las pectinas ácidas que estas al encontrarse más expuestas a la pared celular se obtienen con el primer lavado del residuo agroindustrial.

## 5.2 ANÁLISIS DE LA LIBERACION DE PARACETAMOL.

En la **Tabla 5-3** se muestra el promedio de los comprimidos formulados (n=3) para desarrollar el análisis de cinética de disolución de paracetamol. Como se observa el peso de los comprimidos no presentan grandes diferencias, por lo que son aptos para el estudio. En la **Figura 5-2** se muestran los comprimidos finales utilizados en el estudio de cinética.

**Tabla 5-3.** Masa media de comprimidos de paracetamol.

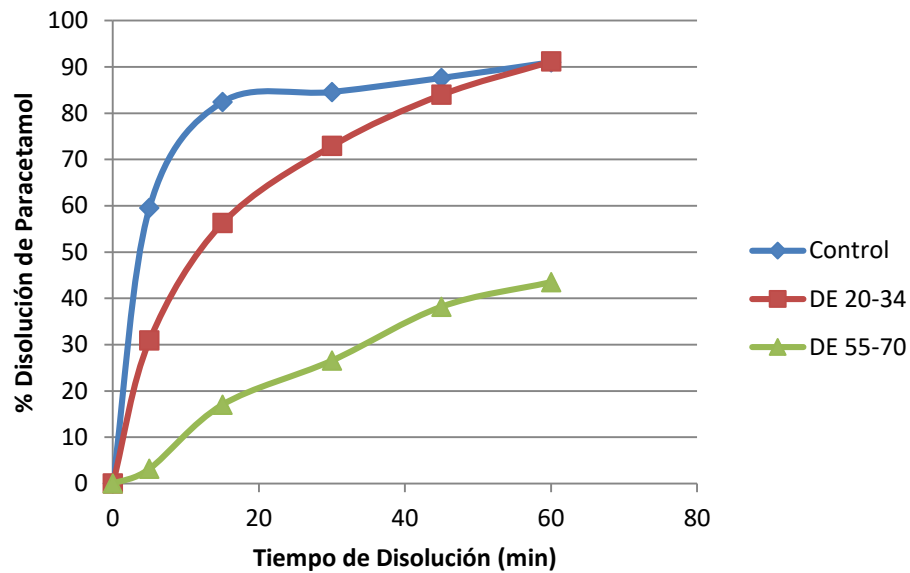
Tipo de comprimido	Masa (mg)	Sigla
Comprimido control sin pectina	481,3	C
Comprimido con pectina 20-34%	475,0	PBM
Comprimido con pectina 55-70%	473,4	PMM
Comprimido con pectina de pera ácida	477,6	P.A
Comprimido con pectina de pera enzimática	468,3	P.E
Comprimido con pectina de coseta ácida	461,3	C.A
Comprimido con pectina de coseta enzimática	460,0	C.E



**Figura 5-2.** Comprimidos fabricados con las diferentes pectinas. A) comprimido control, B) comprimido PBM, C) comprimido con PMM, D) comprimido con P.A, E) comprimido con P.E, F) comprimido con C.A, G) comprimido con C.E.

Los resultados se obtuvieron al fabricar comprimidos con contenido de 30% p/p de pectina, esto se basa en el estudio realizado previamente por Silva, 2011, donde se encontró que con esta concentración se obtienen respuestas favorables en la prolongación de la liberación del principio activo. Como se muestra en la **Figura 5-3** se realiza una comparación en la cinética de disolución del comprimido control con aquellos comprimidos que fueron fabricados con pectinas de 20-34% y de 55-70% respectivamente. Acá se puede observar que los comprimidos que contienen pectinas con un mayor grado de esterificación provoca un retraso en la liberación del principio activo. El grado de metoxilación determina muchas

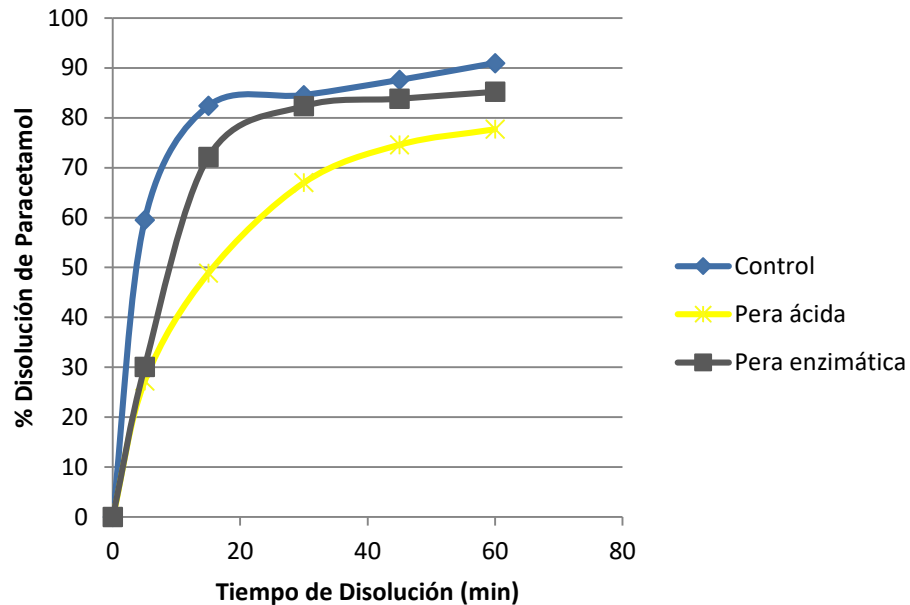
de las propiedades de solubilidad de las pectinas, especialmente las propiedades de gelificación. Las pectinas de alto metoxilo son poco solubles y requieren una mínimo cantidad de sólidos solubles y un pH de alrededor de 3 para formar geles. En cambio las pectinas de bajo metoxilo son más hidrófilas y más solubles en comparación con las de mayor grado de metoxilación, esto se debe a la mayor cantidad de grupos carboxilos ionizados.



**Figura 5-3. Cinética de disolución del comprimido control, con los comprimidos con PBM y PMM respectivamente.**

En la **Figura 5-4** se compara los resultados obtenidos entre el comprimido control y los comprimidos con pectina de residuo de pera obtenidos por el método ácido y enzimático. Se observa que es el comprimido con P.A quien presenta una mejor respuesta en retardar la liberación del paracetamol, con respecto al comprimido fabricado con la pectina de residuo de pera obtenida por método enzimático. Si bien con el método enzimático se obtienen pectinas más puras, el residuo al ser tratado con enzimas sufre una hidrólisis, con lo cual se disminuye el grado de esterificación de las pectinas finales, esta hidrólisis no ocurre en aquellas pectinas que han sido obtenidas por el método convencional. Al extraer pectinas por el método convencional el resultado es que se mantiene un grado de esterificación

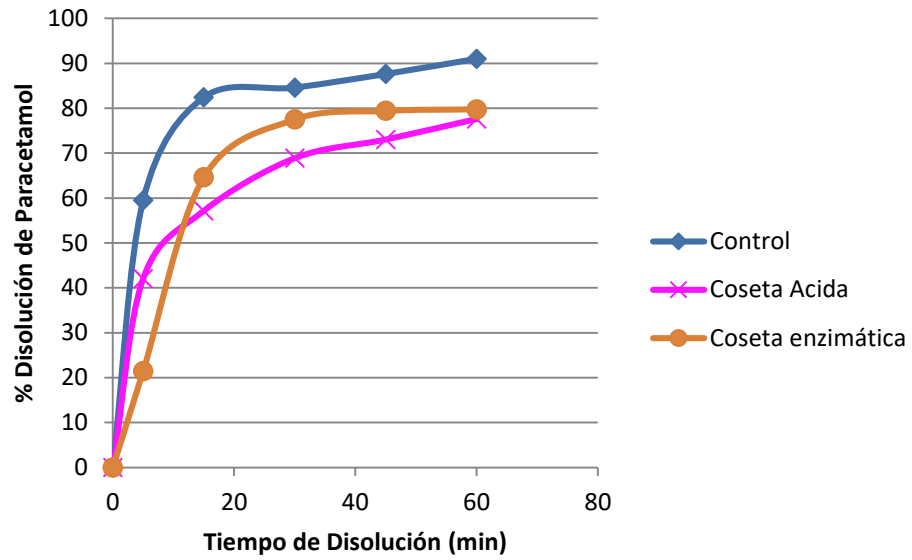
mayor, y esto es lo que favorece a la prolongación de la liberación del fármaco contenido en el comprimido, que es lo que se observa en la Figura 5.3 donde es el comprimido con PMM quien presenta el mayor retardo.



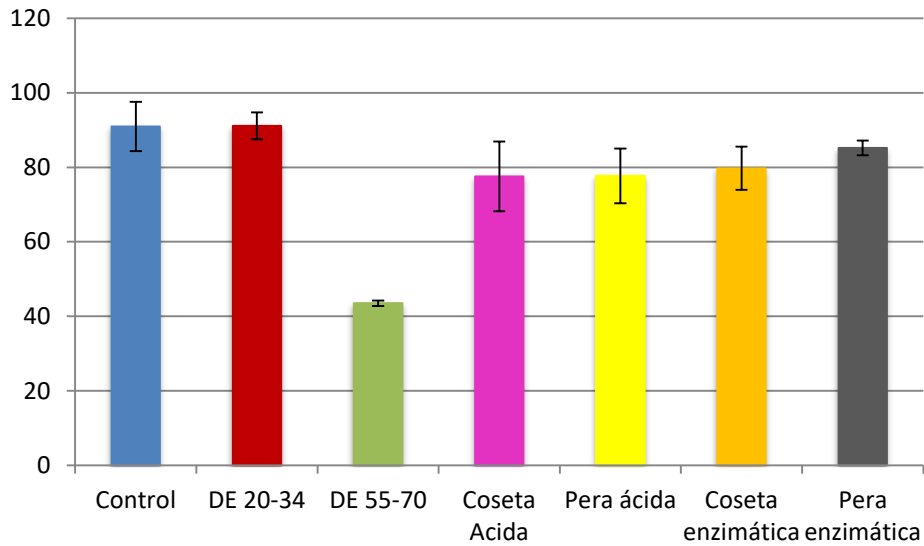
**Figura 5-4. Cinética de disolución del comprimido control, con los comprimidos con pectina de pera ácida y pera enzimática.**

En la **Figura 5-5** se muestra la cinética de disolución entre el comprimido control y los comprimidos con pectinas de coseta agotada de remolacha que fueron obtenidos por el método convencional y enzimático. Acá se observa al igual que en el caso del residuo de pera, que es el comprimido con pectina ácida quien produce una prolongación mayor en la liberación del principio activo.

En la **Figura 5-6** se muestra que a los 60 minutos de disolución no se encuentran grandes diferencias entre ninguno de los comprimidos fabricados, excepto en el comprimido fabricado con pectina cuyo grado de esterificación se encuentra entre 55-74%, ya que al poseer un mayor DE se produce una mayor prolongación en la liberación del fármaco.



**Figura 5-5. Cinética de disolución del comprimido control, con los comprimidos con pectina de coseta de remolacha ácida y coseta de remolacha enzimática.**



**Figura 5-6. Gráfica comparativa de diferentes comprimidos al tiempo de disolución de 60 minutos.**

Aunque los resultados no son los más óptimos en prolongar la disolución del fármaco, estos demuestran que las pectinas estudiadas retardan la disolución del paracetamol en las condiciones establecidas (pH 5,8 y 37°C).

Al considerar los parámetros indicados por la USP 29 para los comprimidos de paracetamol de liberación convencional a los 15 minutos de transcurrida la disolución se debe tener más de un 80% de fármaco disuelto con respecto al total rotulado en la etiqueta (80 mg), esta condición solo es cumplida por el comprimido control, el resto de los comprimidos presentan valores menores de disolución.

Para ser considerados como tabletas de liberación prolongada, según la monografía oficial de la USP 29, a los 15 minutos de transcurrida la disolución se debe tener entre un 45-60% del fármaco disuelto. En este caso en particular la pectina de pera extraída por método enzimático se encuentra por encima de estos valores, por lo que la cantidad de pectina puede ser utilizada en menor cantidad, y podría ser una posible matriz para la liberación prolongada de paracetamol.

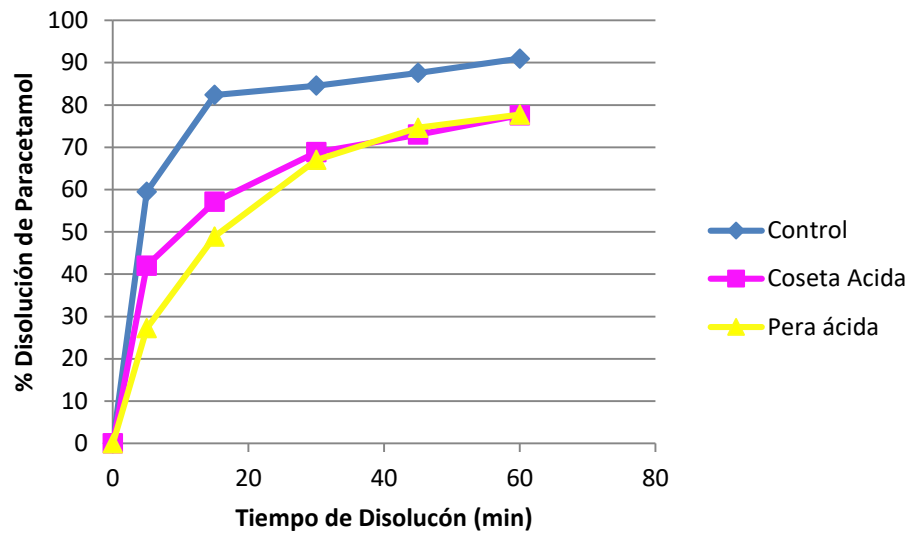
Transcurridos 60 minutos de la cinética, el porcentaje de disolución del paracetamol debe encontrarse entre 60-85%. Considerando esta condición, las pectinas tanto de pera como coqueta de remolacha, obtenidas por método convencional y enzimático, cumplen con este parámetro por lo que se pueden considerar como matrices para liberación prolongada de paracetamol.

Con los resultados obtenidos al realizar la cinética de disolución de los comprimidos de paracetamol fabricados con las pectinas extraídas a partir de los residuos de pera y de coqueta agotada de remolacha por ambos métodos, se puede decir que los comprimidos fabricados por el método convencional ácido son quienes presentan los mejores resultados. Esto se debe a que por esta vía la muestra sufre una menor cantidad de hidrólisis en su estructura con lo que quedan pectinas con una mayor estructura, lo que beneficiaría la prolongación de la liberación del principio activo. Otro punto a considerar es que los residuos que sufrieron tratamiento convencional al encontrarse con un menor grado de tratamiento aun pueden tener residuos de hemicelulosa y celulosa, las cuales son utilizadas

actualmente como excipientes en la industria farmacéutica los cuales en algún grado podrían haber influido en los mejores resultados obtenidos en la cinética de disolución de los comprimidos. Lo anteriormente descrito no ocurre en los residuos tratados con el método enzimático, ya que se realiza un mayor tratamiento en las muestras, mediante el uso de pectinasas como fue la Rohapect DA6L, por lo que las sustancias pécticas obtenidas son de un tamaño menor. Sin embargo se debe destacar que a pesar de que hubo un mejor resultado con aquellos comprimidos fabricados con las pectinas obtenidas por método convencional, todos los comprimidos presentan un comportamiento similar al comprimido control, el cual está fabricado solo con paracetamol y lactosa.

Se podrían realizar nuevos estudios con otros residuos vegetales que puedan tener pectinas con un mayor grado de esterificación de forma de determinar si es que el grado de metoxilación de estas influye en la prolongación de la liberación de paracetamol, y por tanto son mejores matrices para este tipo de estudio. Otra posibilidad es la utilización de las pectinas de tipo ácido para realizar este tipo de estudio y determinar si estas pueden ser utilizadas como matrices de comprimidos de liberación controlada. Finalmente se podría utilizar las pectinas con un bajo grado de metoxilación, como las obtenidas en este trabajo, añadiendo iones de calcio de forma de darles mayor estabilidad y formar la figura de caja de huevo y ver si que bajo estas condiciones se mejora el efecto de prolongar la liberación del principio activo.

En las pectinas extraídas por el método ácido, no se aprecian grandes diferencias entre ellas en los resultados en la cinética de disolución de paracetamol como se muestra en la **Figura 5-7**, por lo cual se podrían realizar nuevos análisis de forma de poder identificar cual de las dos sería la más recomendada para ser utilizada como matriz polimérica.



**Figura 5-7. Comparación de la cinética de disolución de la pectina de pera ácida con la pectina de coseta ácida.**

Hay trabajos en la actualidad donde se ha demostrado que las pectinas de bajo metoxilo son potenciales excipientes de compresión directa, ya que consisten en partículas con alta compactibilidad, esto se debe a que a menor grado de metilación es menor el tamaño de partícula lo cual produce un aumento en la compactibilidad de las pectinas (Salbu, 2010), a diferencia de aquellas pectinas con un alto grado de metoxilación, ya que ellas presentan altos grados de deformación plástica y deformación elástica rápida, esto indica una necesidad de presiones de compactación más altas con el fin de deformar las partículas de pectina de alto metoxilo (Salbu, 2011). Existen estudios a su vez sobre el potencial uso para la liberación sostenida de ambroxol y salbutamol líquido que comprende estar en una solución acuosa diluida de pectina que está diseñado para formar geles in situ en el ambiente ácido del estómago en conjunto con una fuente de calcio, demostrando que el uso de estas sustancias es factible debido a la unión con iones de calcio en el estomago permite la formación de geles favoreciendo así la liberación sostenida de ambos principios activos (Kubo *et al*, 2004; Rathod *et al.*, 2011). Por otra parte aun cuando no es parte de este trabajo, cabe destacar que existen investigaciones donde las pectinas que son de bajo metoxilo extraídas por el método enzimático presentan una acción antiproliferativa, por lo

que se podría realizar un estudio si los residuos analizados en este trabajo obtenido por esa vía pueden presentar esta actividad.

Al realizar el análisis de significancia (Anexo 4) se puede deducir que: existe un efecto del tiempo en la cinética, también existe un efecto del tipo pectina utilizada para formar la matriz del comprimido, existe una diferencia significativa entre el comprimido control versus el comprimido con pectina con un grado de esterificación 55-70%, también hay diferencias significativas entre los comprimidos con pectina de pera y coseta de remolacha extraídos por vía enzimática y vía convencional versus el comprimido con pectina con un DE 55-70% obteniéndose el mejor resultado con este último, finalmente también hay una diferencia entre las pectinas que poseen el menor grado de esterificación versus las que poseen un DE 55-70%, siendo estas últimas las que poseen el mayor efecto en la prolongación de la liberación del principio activo.

Resumiendo los extractos pécticos obtenidos son soluciones de baja solubilidad, las cuales cuando entran en contacto con soluciones acuosas se hidratan, pero no se hinchan, es por esto que si bien los extractos retrasaron la liberación del paracetamol en comparación con el control, este efecto no es tan significativo si se compara con una pectina de mayor grado de esterificación como es el caso de la pectina que tiene un DE 55-70%.

Se requiere obtener pectinas con un mayor grado de esterificación para mejorar la prolongación de la liberación del paracetamol, por lo que sería necesario realizar un nuevo estudio con residuos que puedan contener este tipo de pectinas, para poder utilizarlas como matrices poliméricas. Otro factor a considerar aparte de la obtención de pectinas con mayor grado de metoxilación, es combinar las pectinas de bajo metoxilo con iones con lo cual se puede optimizar el control de la liberación de fármacos en sistemas elaborados con pectina, así como para ajustar la velocidad de liberación del principio activo. También se ha observado que incrementando la cantidad de iones divalentes en la formulación se produce un mayor grado de reticulación y agregación en el sistema. Sin embargo, un exceso de iones calcio origina un fenómeno de pre gelificación que provoca una mayor velocidad de liberación del fármaco (Mamani *et al.*, 2011).

El uso de pectinas cítricas comerciales y las provenientes de pera, han sido estudiados para un gran número de funciones en la industria farmacéutica, pero su uso como un potencial material polimérico no se ha profundizado. En este trabajo se ha podido demostrar que el uso de estos polímeros en fármacos de liberación prolongada, entrega resultados positivos, ya que si se pueden apreciar cambios en la cinética de disolución.

Se puede recalcar que las pectinas obtenidas por el método enzimático son protopectinas de tipo neutras, es decir se encuentran más al interior de la pared celular vegetal, son de bajo metoxilo, que presentan un efecto de prolongar la liberación de comprimidos de paracetamol pero este es en menor grado en comparación con aquellas pectinas obtenidas por el método convencional ácido, quienes fueron las que presentaron un mejor efecto al prolongar la liberación del principio activo; es por esto que sería recomendable para futuros estudios tratar de extraer pectinas con un mayor grado de metoxilación para desarrollar formas farmacéuticas que retarden la liberación del fármaco, o en su defecto formar estructuras con calcio (tipo caja de huevo), o ver si el uso de pectinas de tipo ácido, es decir las que se encuentran más expuestas, presentan un mejor efecto como matrices de comprimidos de liberación controlada.

## 6 CONCLUSIÓN.

- Las sustancias pécticas obtenidas por método enzimático a partir de los residuos agroindustriales poseen un efecto de retrasar la liberación del principio activo en comparación con el comprimido control.
- Sustancias pécticas obtenidas por tratamiento enzimático y convencional pueden ser utilizados como bases para la formulación de comprimidos de liberación controlada.
- Comprimidos elaborados con 30% de sustancias pécticas obtenidas a partir de residuos de coseta agotada de remolacha y residuo de pera obtenidos por el método convencional ácido retrasan la liberación de paracetamol en un 22,5% y 22,3% respectivamente en comparación al control.
- Las sustancias pécticas extraídas por método enzimático del residuo de coseta agotada de remolacha y de residuo de pera tienen un menor efecto al retrasar la liberación del paracetamol en un 20,3 y 14,8% respectivamente en comparación con al comprimido control y a los comprimidos fabricados con pectinas obtenidas por método convencional.
- El método volumétrico para determinar el parámetro de grado de esterificación y los métodos empleados para medir ácido galacturónico estos miden la calidad de las pectinas de tipo ácida, es por esto que los datos obtenidos no son concluyentes para las pectinas extraídas en este caso que son de tipo neutras
- Las pectinas obtenidas por método convencional cumplen con los parámetros establecidos por la USP 29 para los comprimidos de liberación modificada.
- El comprimido con pectina cítrica comercial presenta el mayor efecto al prolongar la liberación de paracetamol 46,5% comparado con todo el resto de los comprimidos estudiados.

## 7 BIBLIOGRAFÍA.

1. **Ahmed** I., Ayres J. 2011. Comparison of in vivo performance of a colonic delivery system. *Int. J. Phar.* 409:169-177.
2. **Awasthi** R. 2010. Selection of pectin as pharmaceutical excipient on the basis of rheological behavior. *Int. J. Pharm Sci.* 3(1):229-231.
3. **Beneke** C., Viljoen A., Hamman J. 2009. Polymeric Plant-derived Excipients in Drug Delivery. *Molecules.* 14:2602-2620.
4. **Caffall** K.H., Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Car Res.* 344:1879-1900.
5. **Calderón** E., Matos A. 2011. Fuentes para la extracción de pectina y su aplicación en la industria. I Congreso Nacional de Investigación. Perú.
6. **Cavalitto** S. 2008. Maceración enzimática de tejidos vegetales. Acción de protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* sobre cáscara de pomelo. Universidad Nacional de Quilmes. Departamento de Ciencia y Tecnología, Licenciatura en Biotecnología.
7. **Chasquibol** N., Arroyo E., Morales J.C. 2008. Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial* n°26. 175-199 pp.
8. **CHUS.** 2002. Especialidades farmacéuticas orales de liberación modificada. Complejo hospitalario Universitario de Santiago. *Boletín de información terapéutica.* 1(11): 41-43.
9. **Claye** S., Idouraineb A., Webera C. 1996. Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources. *Food Chem.* Vol. 57. No. 2:305-310.
10. **Costa** E., Arancibia A., Aïache J. 2004. Sistemas Matriciales. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (2): 259-65.

11. **Domínguez-Gil** y Suarez M. 2000. Avances en tecnología farmacéutica. Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica. Universidad de Salamanca. 1-66.
12. **Duvetter** T., Sila D.N., Jolie R., Van Loey A., Hendrickx M. 2009. Pectin in fruits and vegetables: Part I – Stability and catalytic activity of pectinasas. CRFSFS. 8:75-85.
13. **Escobar** J.L., García D.M., Zaldivar D., Kattime I. 2002. Hidrogeles. Principales características de sistema de liberación controlada de fármacos. Volumen 3. Revista Iberoamericana Polímeros.
14. **Espejo** C. 2011. Evaluación de pectinas de *Gerbera Jamesonii* como biomaterial para ingeniería de tejidos. Tesis de grado. Facultad de farmacia. Universidad de Valparaíso.
15. **Espinoza** N. 2008. Caracterización de biopolímeros y su aplicación de probióticos de liberación específica. Tesis de grado Instituto politécnico nacional. México. 43-47.
16. **Fishman** M., Chau H., Kolpak F., Brady J. 2001. Solvent Effects on the Molecular Properties of Pectins. Food Chem. 49:4494-4501.
17. **Fournier** E. 2001. Colorimetric Quantification of Carbohydrates. Curren Prot Food Anal Chem.
18. **Fredes** C., Loyola N., Muñoz J. 2009. Extracción de pectinas de *Vitis Labrusca CV. Concord* para producir jaleas. Idesia. Chile. Volumen 27. N°3:9-14.
19. **Garna** H., Mabon N., Nott K., Wathelet B., Paquot M. 2006. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. Food Chem. 96:477–484.
20. **Gavira** N., López L. 2005. Extracción a escala laboratorio de la pectina del maracuyá y escalado preliminar a planta piloto. Universidad Eafit, Departamento Ingeniería de procesos Medellín. 23-50.
21. **Girard** M. 2009. Apuntes de pruebas de disolución. XXIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. El Salvador.

22. **Habibi** Y., Heyraud A., Mahrouz M., Vignon M.R. 2004. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Car Res.* 339:1119-1127.
23. **Kubo** W., Miyazaki S., Dairaku M., Togashi M., Mikami R., Attwood D. 2004. Oral sustained delivery of ambroxol from in situ-gelling pectin formulations. *Int J Pharm.* 217:233-240.
24. **Lajolo** F., Wenzel de Meneses E. 2006. Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. Universidad de Sao Paulo. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Alimento y Nutrición Experimental. pp 639-643.
25. **Lastre** García J.L. 2002. Nuevos sistemas orales de liberación modificada. *Schironia.* 1:63-71.
26. **Levigne** S., Ralet M., Thibault J. 2002. Characterization of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carb Pol.* 49:145-153.
27. **Liu** L., Fishman M., Kost J., Hicks K. 2003. Pectin-based systems for colon-specific drugdelivery via oral route. *Biomaterials.* 24:3333–3343.
28. **Liu** L., Fishman M., Hicks K. 2007. Pectin in controlled drug delivery-a review. 14:15-24.
29. **Mamani** P., Ruiz R., Veiga M.D. 2011. Pectina: Usos Farmacéuticos y Aplicaciones Terapéuticas. Universidad Complutense de Madrid. 82-97.
30. **Manterola** H., Cerda D., Mira J. 1999. Los Residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes. Fundación para la innovación agraria, Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile, pp 92, 100, 108, 109, 139, 140.
31. **Maxwell** E., Belshaw N., Waldron K., Morris V. 2011. Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. *TIFS.* 1-10.

32. **McFeeters R.F.**, Armstrong S.A. 1984. Measurement of pectin methylation in plant cell walls. *Anal Biochem.* 139:212-217.
33. **Meñaca C.** 2010. Evaluación de la calidad de las pectinas cítricas obtenidas a partir de las cáscaras de naranja, de las variedades valencia y común, en estado de maduración grado cinco (5). Tesis de grado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
34. **MINSAL.** Reglamento Nacional de Control de Productos Farmacéuticos. 2005
35. **Mollea C.**, Chiampo F., Conti R. 2008, Italia. Extraction and characterization of pectin from cocoa husk: A preliminary study. *Food Chem.* 107:1353-1356.
36. (a) **Morris G.**, Kok M., Harding S., Adam G. 2010. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* Vol. 27:257-284
37. (b) **Morris G.**, Ralet M.C., Bonnin E., Thibault J. F., Harding S. 2010. Physical characterization of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta Vulgaris*) pectin. *Carb Pol.* 82:1161-1167.
38. **Muñoz F.** 2011. Extracción y caracterización de la pectina obtenida a partir del fruto de dos ecotipos de Cocona (*Solanum sessiliflorum*), en diferentes grados de madurez; a nivel de planta piloto. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
39. **Murata Y.**, Miyashita M., Kofuji K., Miyamoto E., Kawashima S. 2004. Drug release properties of a gel bead prepared with pectin and hydrolysate. *J Con Rel.* 95:61-66.
40. **Nikolic M.**, Mojovic L. 2007. Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes. *Food Chemistry.* 101:1-9.
41. **Novosel'skaya I.L.**, Voropaeva N.L., Semenova L.N., Rashidova S. 2000. Trends in the sciences and application of pectins. *Chemistry of Natural Compounds.* Vol. 36, N°1.
42. **Pagan J.** 1999. Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón. *Servei de Publicacions Universitat de Lleida.* 1-138.

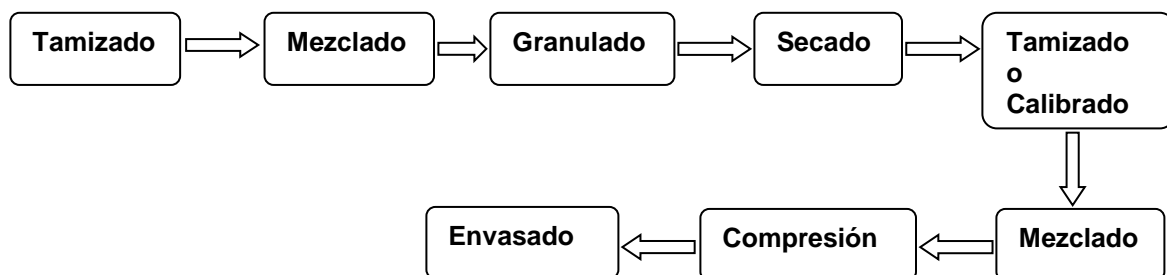
43. **Rathod H.**, Patel V., Shah D. 2011. Pectin based insitu gelling system of salbutamol for oral sustained drug delivery. IJPRD. 53-58.
44. **Real Farmacopea Española.** 2ª ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo y Ministerio de la Presidencia. 2003.
45. **Rojas M.**, Vallejo V., y Ernesto J. 2008. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. Revista Ingeniería e Investigación. Vol. 28. N°1:57-71.
46. **Rovaris E.**, Silva I., Gonzaga L., Amante E., Teófilo R., Ferreira M., Amboni R. 2008. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora Edulis Flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology, Bioresource Technology. 99:5561–5566.
47. **Sainz R.B.**, Fernando S. 2008. Maceración enzimática de tejidos vegetales. Acción de protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* sobre cáscara de pomelo. Seminario de investigación. Universidad Nacional de Quilmes.
48. **Salbu L.** 2011. Compressibility and compactibility of pectin powders-A study of their potential as direct compression excipients in tablets. University of Tromso. Thesis for the degree of Philosophiae Doctor.
49. **Salbu L.**, Bauer-Brandl A., Tho I. 2010. Direct compression behavior of low and high methoxylated pectins. PharmSciTech. Vol 11, N°1.
50. **Silva C.** 2011. Evaluación de pectinas derivadas de residuos agroindustriales como fuente potencial de sistemas de liberación modificada. Tesis de grado. Facultad de farmacia. Universidad de Valparaíso.
51. **Soriano M.** 2004. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus Subtilis*. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología.
52. **Sriamornsak P.** 2003. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. Silpakorn University International Journal. 3:206-222.

53. **Suñe J.M.** 2002. Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. En: Curso de formación continuada para farmacéuticos de hospital. Fundación Promoción Médica. Barcelona. 3, 27-65. (<http://www.ub.es>, consultado el 03/12/2012)
54. **Urias V.**, Rascón A., Lizardi J., Carvajal E., Gardea A., Ramírez B. 2010. A novel pectin material: Extraction, Characterization and Gelling properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 11:3686-3695.
55. **USP 29.** 2006. U.S. Pharmacopeia. <http://www.pharmacopeia.cn/> (página visitada el 16 de diciembre del 2012)
56. **USP 30.** 2007. U.S. Pharmacopeia. <http://www.pharmacopeia.cn/> (página visitada el 21 de diciembre del 2012)
57. **Villanova J.C.O.**, Ayres E., Orécife R.L. 2011. Design of prolonged release tablets using new solid acrylic excipients for direct compression. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 79:664-673
58. **Woo K.**, Chong Y., Li Hong S., Tang P. 2010. Pectin extraction and characterization from Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*): A preliminary study. *Journal of Biological Sciences*. 10(7): 631-636.
59. **Yapo B.** 2011. Pectic substance: from simple pectic polysaccharides to complex pectins-A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*. 86:373-385
60. **Yapo B.**, Wathelet B., Paquot M. 2007. Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocolloids*. 21:245-255.
61. **Yapo B.** 2009. Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*. 42:1197-1202.
62. **Zapata D.**, Escobar C., Cavalitto S., Hours R. 2009. Evaluación de la capacidad de solubilización de pectina de cáscara de limón usando Protopectinasa-SE. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Vol. 16:67-74.

## 8 Anexos.

### Anexo 1. Preparación de Comprimidos.

Se utilizará el método de compresión vía húmeda, que es sintetizado en el siguiente flujograma:



Posteriormente se debe realizar un control de calidad del producto terminado el cual comprende los siguientes puntos:

1. Identidad de principio activo
2. Uniformidad de contenido: cantidad de fármaco por unidad de dosis
3. Variación de peso: entrega el peso promedio del lote de producción y está relacionado con la dosis del comprimido.
4. Dureza permiten conocer la resistencia a la manipulación. Un durómetro mide la fuerza requerida para fracturar la tableta al aplicar diametralmente en ella la fuerza generada por un resorte.
- 5.- Test de desintegración: mide el tiempo que tarda una tableta en romperse en pequeñas partículas o gránulos para aumentar el área superficial. El equipo de desintegración tiene un dispositivo con 6 tubos de vidrio de 3 pulgadas de largo abierto en la parte superior y sostenidos por un tamiz de 10 mesh. En cada tubo se coloca un comprimido y la canasta se sumerge en un vaso de 1 L con agua, a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Este dispositivo sube y baja con una frecuencia de entre 28 y 32 ciclos por minutos.

**Anexo 2.** Cálculos para análisis de disolución de paracetamol.

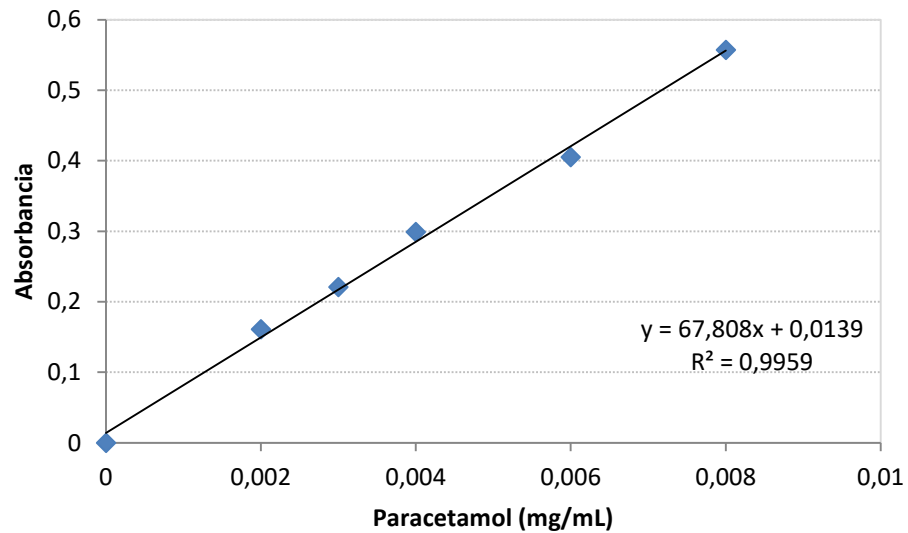
Se preparó una solución estándar de paracetamol para realizar una curva de calibrado para los cálculos posteriores:

Volumen Inicial (mL)	Volumen Final (mL)	Absorbancia (u.a)	Concentración (mg/mL)
0,2	25	0.161	0.0020
0,3	25	0.221	0.0030
0,4	25	0.299	0.0040
0,6	25	0.405	0.0060
0,8	25	0.557	0.0080

**Pendiente:** 67,8080

**Intercepto:** 0,0139

**Coefficiente de correlación:** 0,9979



## Tablas con los datos de disolución

- **Comprimido control (sin pectina)**

t (min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.374	0.0064	0.0501	0.0000	49.4620	59.4927
15	10	0.506	0.0073	0.0687	0.0529	68.9212	82.3874
30	10	0.518	0.0075	0.0721	0.1260	69.6203	84.5542
45	10	0.535	0.0078	0.0747	0.2010	72.0496	87.5880
60	10	0.554	0.0081	0.0764	0.2787	75.5883	90.9710

- **Comprimido con pectina de bajo metoxilo (20-34%)**

t(min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.209	0.0027	0.0274	0.0000	24.6964	30.8705
15	10	0.355	0.0050	0.0500	0.0274	44.9929	56.2411
30	10	0.451	0.0065	0.0647	0.0774	58.3249	72.9061
45	10	0.515	0.0074	0.0745	0.1421	67.1752	83.9690
60	10	0.556	0.0081	0.0808	0.2166	72.9222	91.1528

- **Comprimido con pectina de medio metoxilo (55-70%)**

t(min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.049	0.0003	0.0028	0.0000	2.5596	3.1995
15	10	0.129	0.0015	0.0151	0.0028	13.6308	17.0385
30	10	0.184	0.0024	0.0236	0.0180	21.2555	26.5694
45	10	0.251	0.0034	0.0339	0.0416	30.5489	38.1861
60	10	0.281	0.0039	0.0386	0.0755	34.8026	43.5033

- **Comprimido con pectina de pera enzimática**

t(min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.204	0.0027	0.0267	0.0000	24.0738	30.0922
15	10	0.447	0.0064	0.0641	0.0267	57.7208	72.1510
30	10	0.506	0.0073	0.0731	0.0909	65.8787	82.3484
45	10	0.514	0.0074	0.0743	0.1640	67.0586	83.8233
60	10	0.521	0.0075	0.0755	0.2383	68.1706	85.2133

- **Comprimido con pectina de coseta de remolacha enzimática**

t(min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.154	0.0019	0.0191	0.0000	17.1560	21.4450
15	10	0.404	0.0057	0.0574	0.0191	51.6947	64.6184
30	10	0.478	0.0069	0.0688	0.0765	61.9904	77.4880
45	10	0.488	0.0070	0.0704	0.1453	63.5119	79.3899
60	10	0.490	0.0071	0.0706	0.2157	63.7899	79.7373

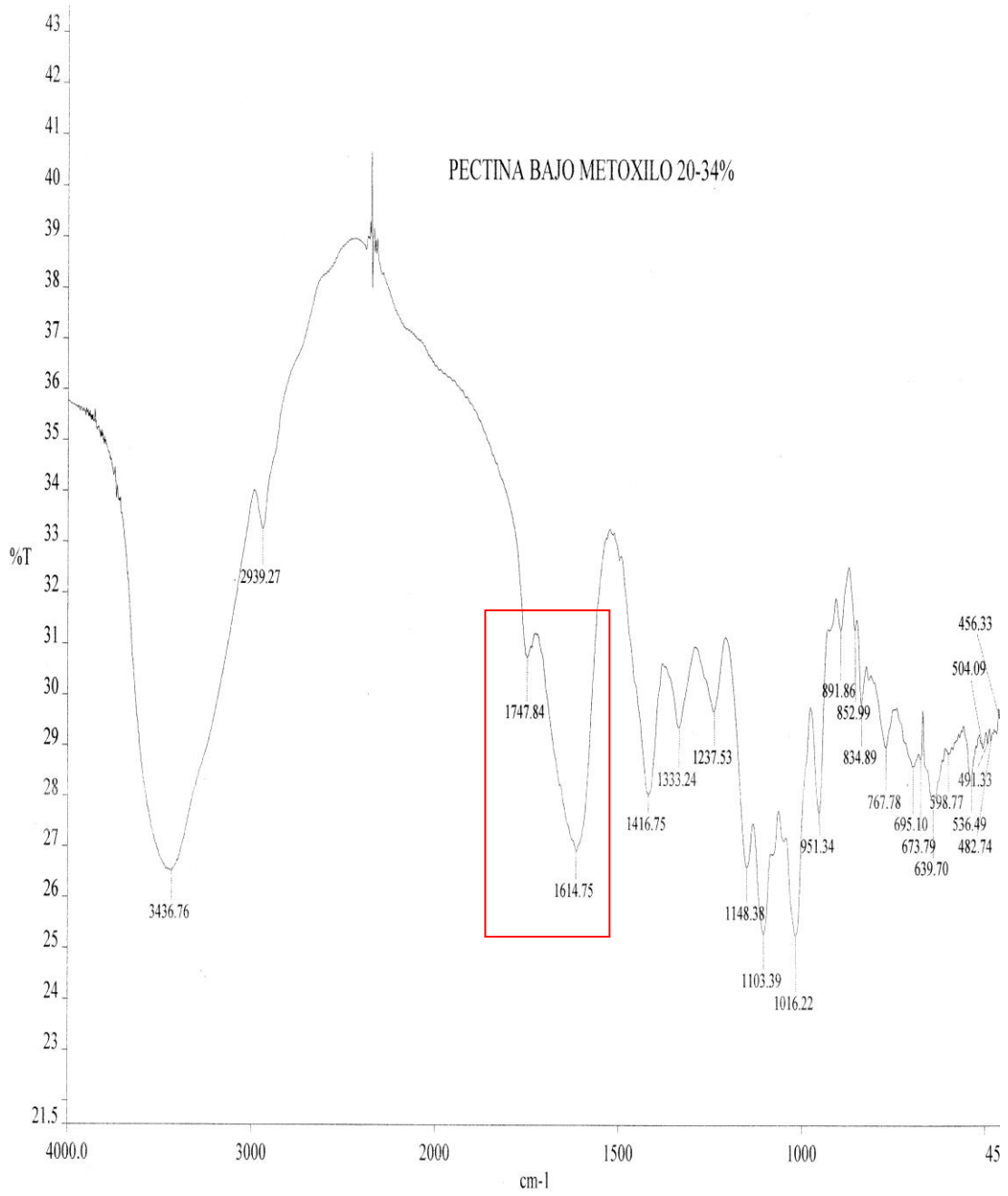
- **Comprimido con pectina de pera ácida**

t(min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.188	0.0024	0.0242	0.0000	21.7909	27.2387
15	10	0.313	0.0043	0.0434	0.0242	39.1095	48.8869
30	10	0.417	0.0059	0.0595	0.0676	53.6111	67.0138
45	10	0.461	0.0066	0.0662	0.1271	59.6890	74.6113
60	10	0.478	0.0069	0.0689	0.1933	62.1764	77.7205

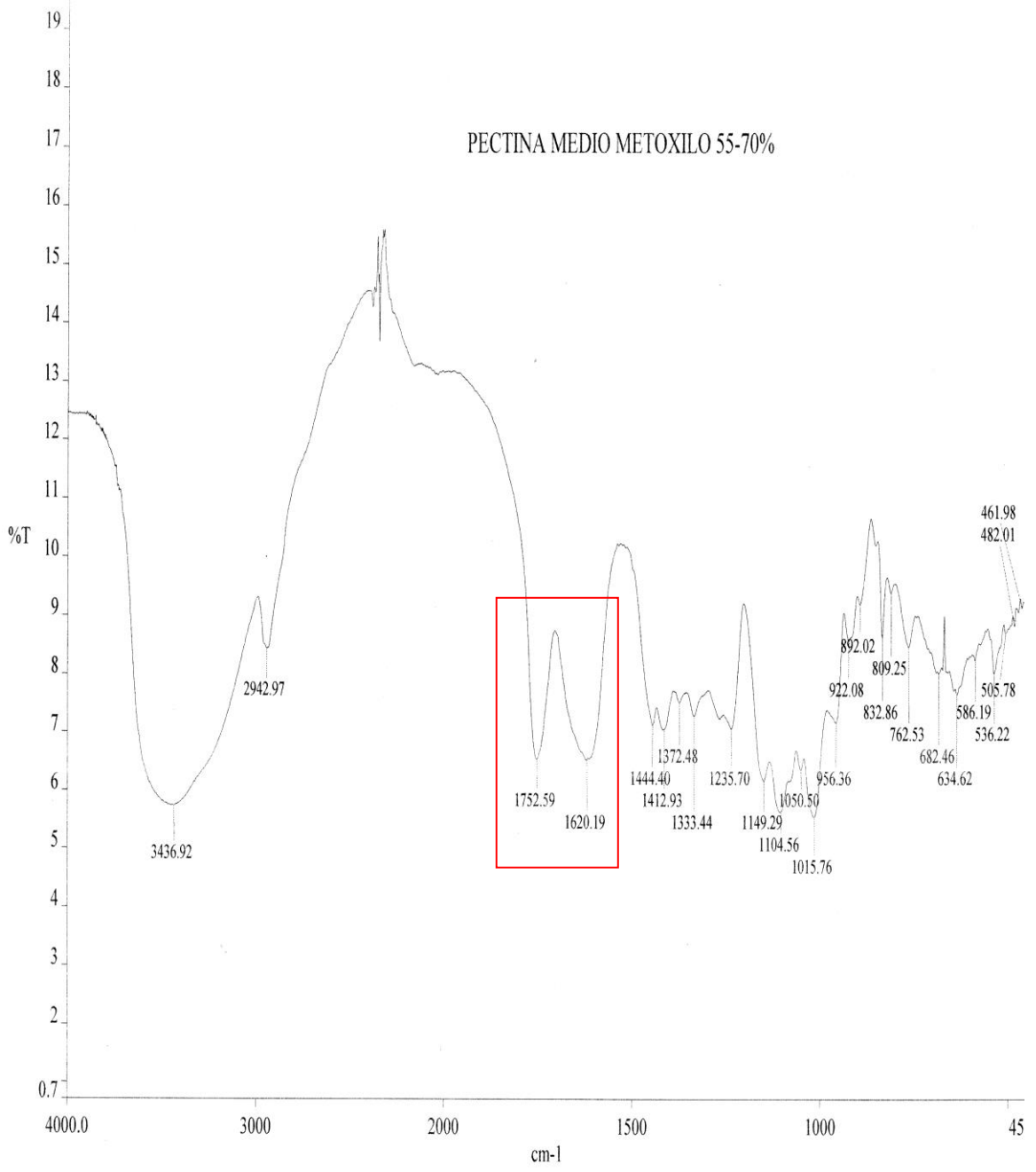
- **Comprimido de pectina de coseta de remolacha ácida**

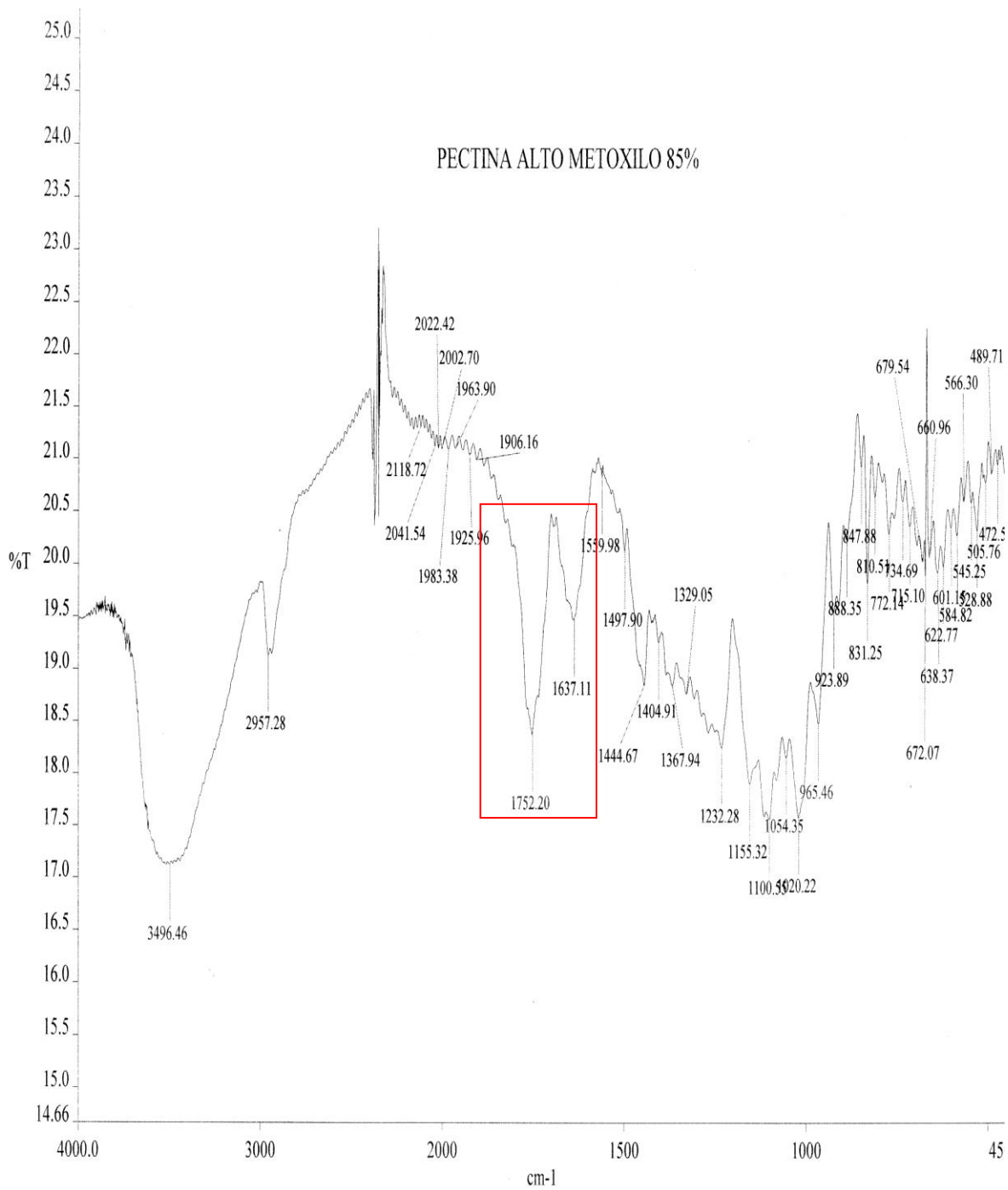
t(min)	FD	Absorbancia	C mg/mL	mg alícuota	mg alícuotas extraídas previa	mg en vaso corregido	% Disuelto
5	10	0.273	0.0037	0.0374	0.0000	33.6203	42.0254
15	10	0.360	0.0051	0.0507	0.0374	45.6945	57.1182
30	10	0.428	0.0061	0.0611	0.0881	55.0842	68.8553
45	10	0.451	0.0065	0.0647	0.1492	58.3967	72.9959
60	10	0.477	0.0069	0.0687	0.2139	62.0586	77.5733

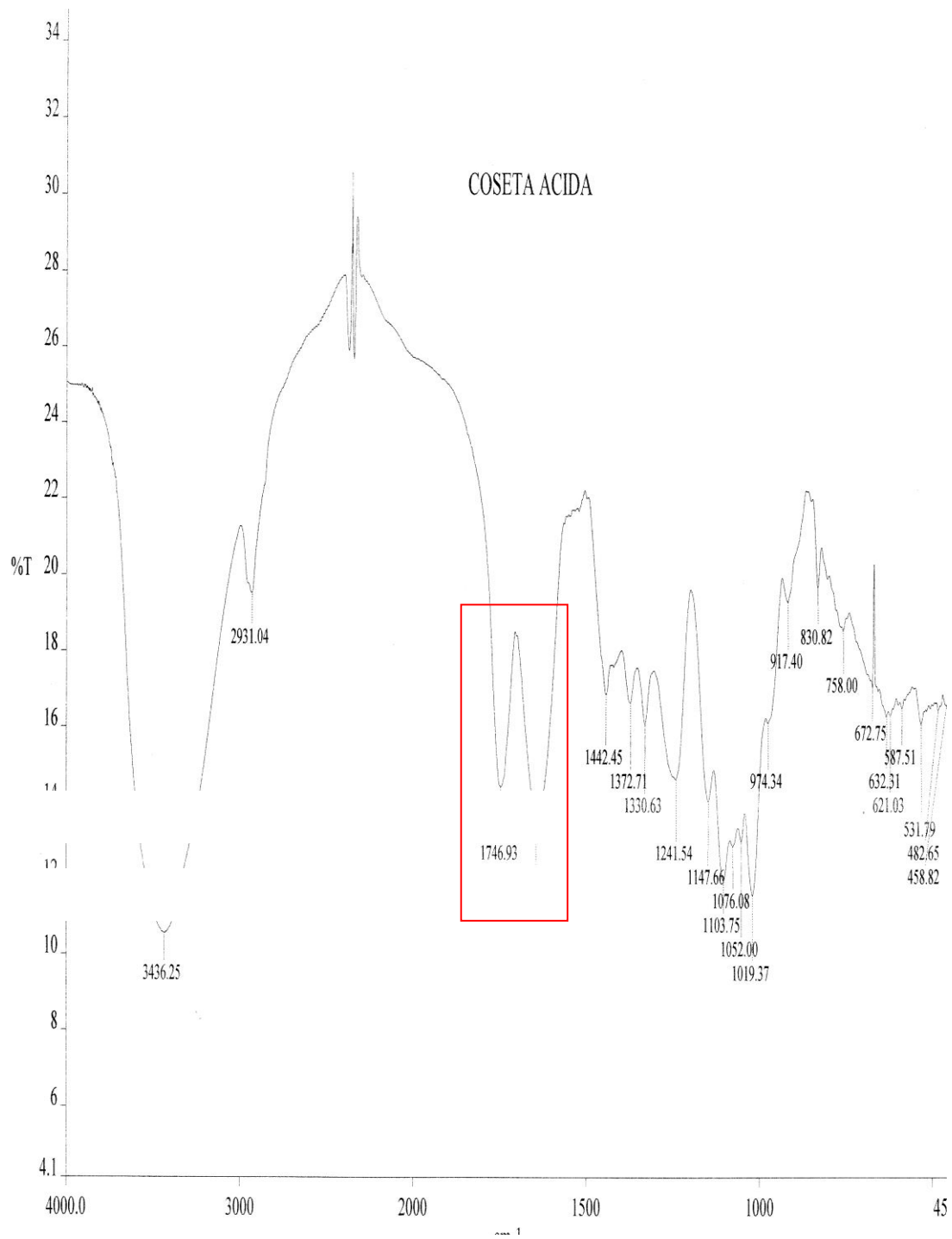
### Anexo 3

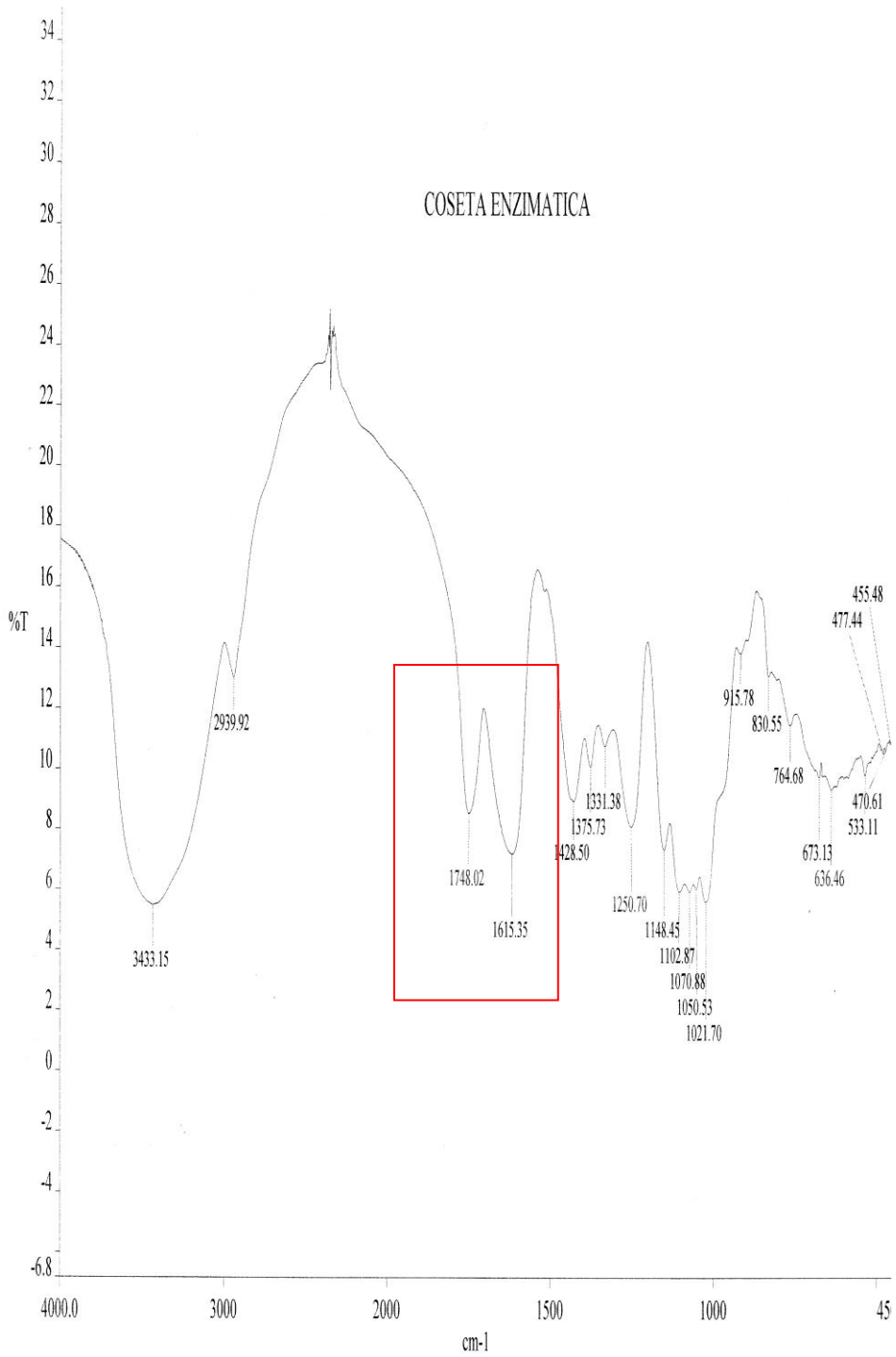


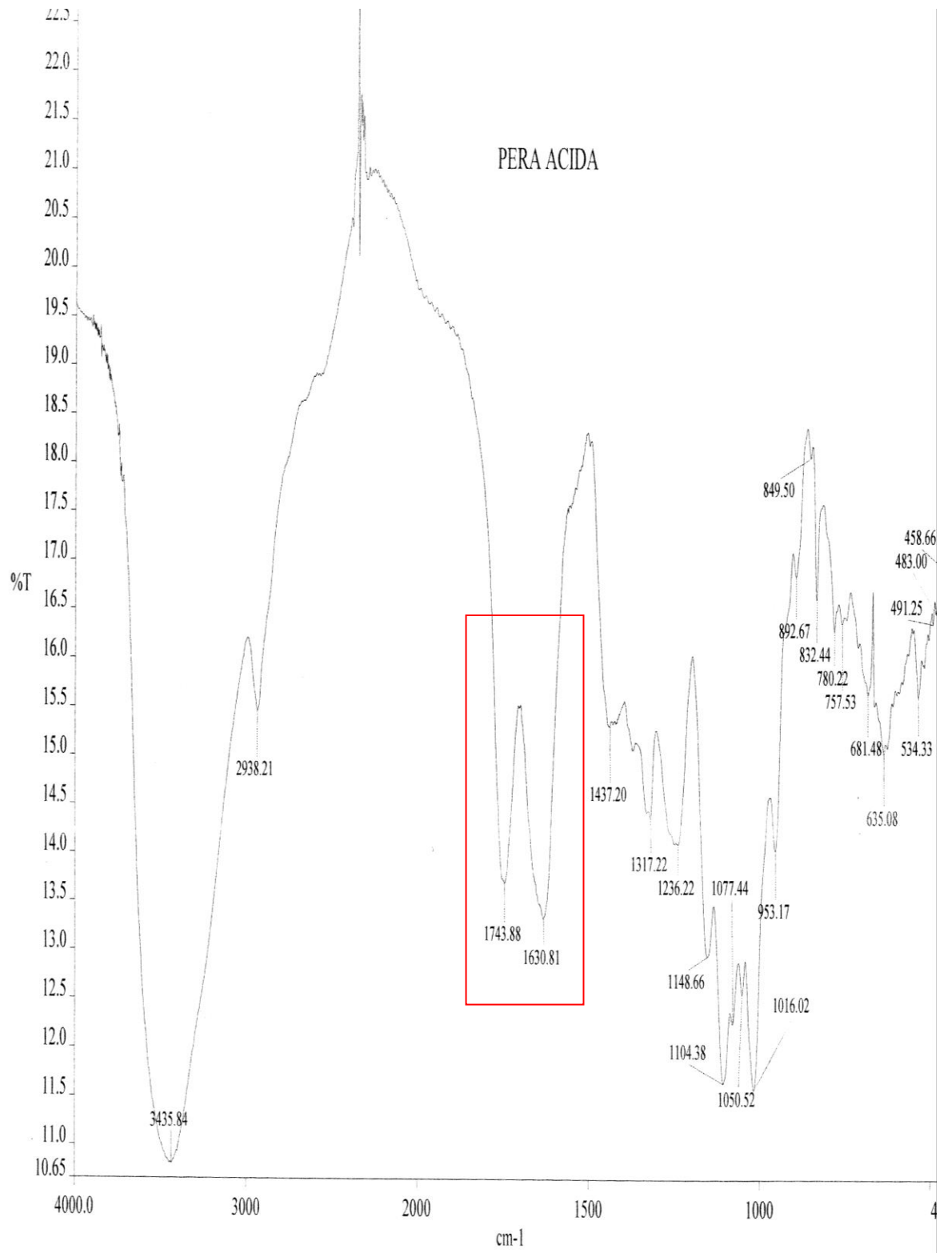
PECTINA MEDIO METOXILO 55-70%

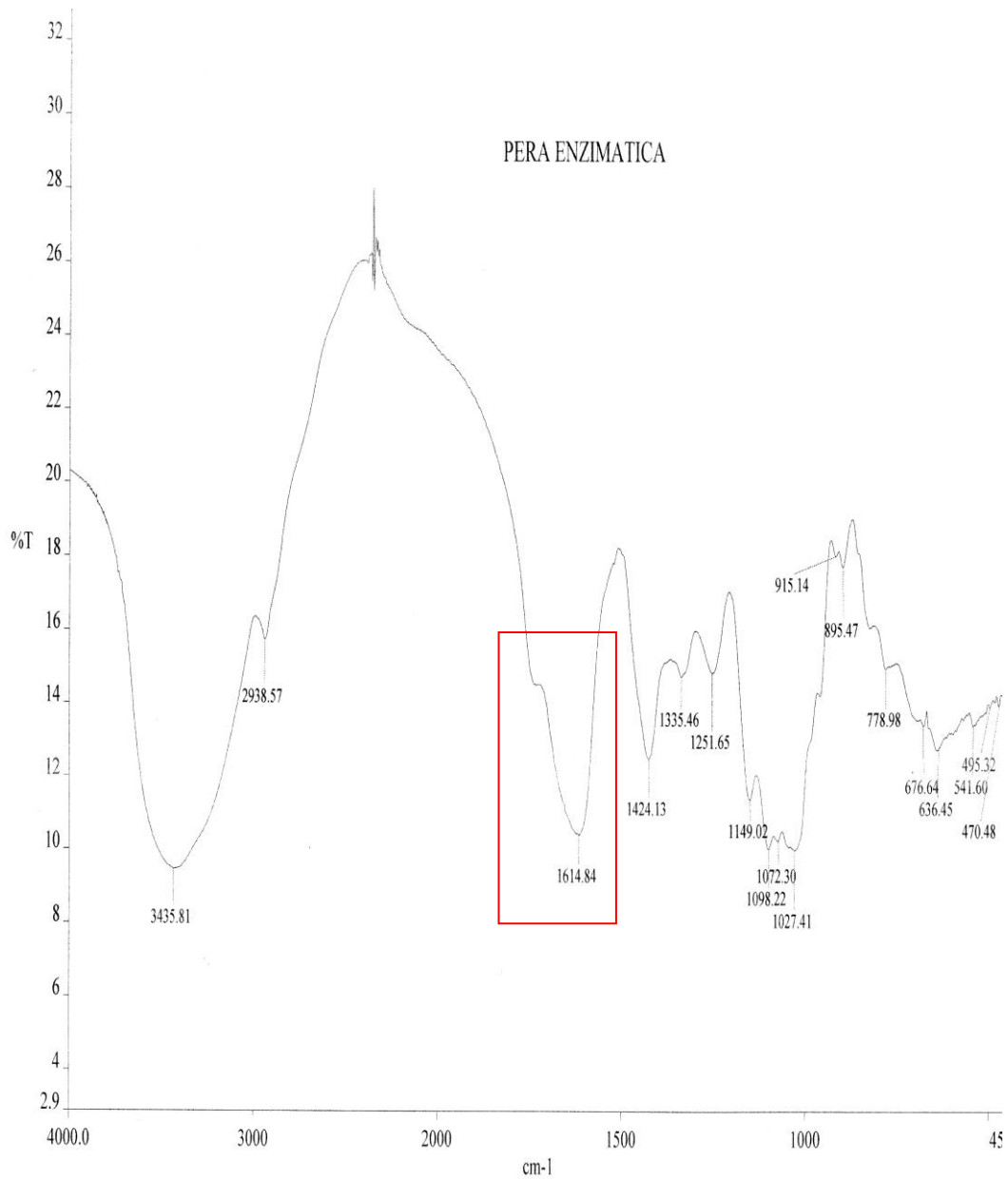












**Anexo 4.** Análisis significativo.

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	4,69	0,0015
Time	47,49	P<0.0001
Column Factor	41,73	0,0029
Subjects (matching)	4,4191	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	**	Yes
Time	***	Yes
Column Factor	**	Yes
Subjects (matching)	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	24	2021	84,19	3,293
Time	4	20450	5113	200,0
Column Factor	6	17970	2995	11,02
Subjects (matching)	7	1903	271,9	10,63
Residual	28	715,8	25,56	

Number of missing values	0
--------------------------	---

<b>Control vs PBM</b>				
Column Factor	Control	PBM	Difference	95% CI of diff.
5	59,49	30,87	-28,62	-61.95 to 4.709
15	82,39	56,24	-26,15	-59.48 to 7.185
30	84,55	72,91	-11,65	-44.98 to 21.68
45	87,59	83,97	-3,619	-36.95 to 29.71
60	90,97	91,15	0,1818	-33.15 to 33.51

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-28,62	3,309	P < 0.05	*
15	-26,15	3,023	P < 0.05	*
30	-11,65	1,347	P > 0.05	ns
45	-3,619	0,4184	P > 0.05	ns
60	0,1818	0,02102	P > 0.05	ns

<b>Control vs PMM</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>Control</b>	<b>PMM</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	59,49	3,199	-56,29	-89.62 to -22.96
15	82,39	17,04	-65,35	-98.68 to -32.02
30	84,55	26,57	-57,98	-91.32 to -24.65
45	87,59	38,19	-49,40	-82.73 to -16.07
60	90,97	43,50	-47,47	-80.80 to -14.14

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	-56,29	6,508	P<0.001	***
15	-65,35	7,555	P<0.001	***
30	-57,98	6,703	P<0.001	***
45	-49,40	5,711	P<0.001	***
60	-47,47	5,488	P<0.001	***

<b>Control vs CA</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>Control</b>	<b>CA</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	59,49	42,03	-17,47	-50.80 to 15.86
15	82,39	57,12	-25,27	-58.60 to 8.062
30	84,55	68,86	-15,70	-49.03 to 17.63
45	87,59	73,00	-14,59	-47.92 to 18.74
60	90,97	77,57	-13,40	-46.73 to 19.93

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	-17,47	2,019	P > 0.05	ns
15	-25,27	2,921	P < 0.05	*
30	-15,70	1,815	P > 0.05	ns
45	-14,59	1,687	P > 0.05	ns
60	-13,40	1,549	P > 0.05	ns

<b>Control vs PA</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>Control</b>	<b>PA</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	59,49	27,24	-32,25	-65.59 to 1.077
15	82,39	48,89	-33,50	-66.83 to -0.1693
30	84,55	67,01	-17,54	-50.87 to 15.79
45	87,59	74,61	-12,98	-46.31 to 20.35
60	90,97	77,72	-13,25	-46.58 to 20.08

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-32,25	3,729	P<0.01	**
15	-33,50	3,873	P<0.01	**
30	-17,54	2,028	P > 0.05	ns
45	-12,98	1,500	P > 0.05	ns
60	-13,25	1,532	P > 0.05	ns

<b>Control vs CE</b>				
Column Factor	Control	CE	Difference	95% CI of diff.
5	59,49	21,45	-38,05	-71.38 to -4.716
15	82,39	64,62	-17,77	-51.10 to 15.56
30	84,55	77,49	-7,066	-40.40 to 26.26
45	87,59	79,39	-8,198	-41.53 to 25.13
60	90,97	79,74	-11,23	-44.56 to 22.10

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-38,05	4,399	P<0.001	***
15	-17,77	2,054	P > 0.05	ns
30	-7,066	0,8169	P > 0.05	ns
45	-8,198	0,9478	P > 0.05	ns
60	-11,23	1,299	P > 0.05	ns

<b>Control vs PE</b>				
Column Factor	Control	PE	Difference	95% CI of diff.
5	59,49	30,09	-29,40	-62.73 to 3.931
15	82,39	72,15	-10,24	-43.57 to 23.09
30	84,55	82,35	-2,206	-35.54 to 31.13
45	87,59	83,82	-3,765	-37.10 to 29.57
60	90,97	85,21	-5,758	-39.09 to 27.57

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-29,40	3,399	P<0.01	**
15	-10,24	1,183	P > 0.05	ns
30	-2,206	0,2550	P > 0.05	ns
45	-3,765	0,4352	P > 0.05	ns
60	-5,758	0,6656	P > 0.05	ns

<b>PBM vs PMM</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PBM</b>	<b>PMM</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	30,87	3,199	-27,67	-61.00 to 5.660
15	56,24	17,04	-39,20	-72.53 to -5.871
30	72,91	26,57	-46,34	-79.67 to -13.01
45	83,97	38,19	-45,78	-79.11 to -12.45
60	91,15	43,50	-47,65	-80.98 to -14.32

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	-27,67	3,199	P < 0.05	*
15	-39,20	4,532	P<0.001	***
30	-46,34	5,357	P<0.001	***
45	-45,78	5,293	P<0.001	***
60	-47,65	5,509	P<0.001	***

<b>PBM vs CA</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PBM</b>	<b>CA</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	30,87	42,03	11,15	-22.18 to 44.49
15	56,24	57,12	0,8771	-32.45 to 34.21
30	72,91	68,86	-4,051	-37.38 to 29.28
45	83,97	73,00	-10,97	-44.30 to 22.36
60	91,15	77,57	-13,58	-46.91 to 19.75

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	11,15	1,290	P > 0.05	ns
15	0,8771	0,1014	P > 0.05	ns
30	-4,051	0,4683	P > 0.05	ns
45	-10,97	1,269	P > 0.05	ns
60	-13,58	1,570	P > 0.05	ns

<b>PBM vs PA</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PBM</b>	<b>PA</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	30,87	27,24	-3,632	-36.96 to 29.70
15	56,24	48,89	-7,354	-40.69 to 25.98
30	72,91	67,01	-5,892	-39.22 to 27.44
45	83,97	74,61	-9,358	-42.69 to 23.97
60	91,15	77,72	-13,43	-46.76 to 19.90

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-3,632	0,4199	P > 0.05	ns
15	-7,354	0,8502	P > 0.05	ns
30	-5,892	0,6812	P > 0.05	ns
45	-9,358	1,082	P > 0.05	ns
60	-13,43	1,553	P > 0.05	ns

<b>PBM vs CE</b>				
Column Factor	PBM	CE	Difference	95% CI of diff.
5	30,87	21,45	-9,425	-42.76 to 23.91
15	56,24	64,62	8,377	-24.95 to 41.71
30	72,91	77,49	4,582	-28.75 to 37.91
45	83,97	79,39	-4,579	-37.91 to 28.75
60	91,15	79,74	-11,42	-44.75 to 21.92

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-9,425	1,090	P > 0.05	ns
15	8,377	0,9685	P > 0.05	ns
30	4,582	0,5297	P > 0.05	ns
45	-4,579	0,5294	P > 0.05	ns
60	-11,42	1,320	P > 0.05	ns

<b>PBM vs PE</b>				
Column Factor	PBM	PE	Difference	95% CI of diff.
5	30,87	30,09	-0,7782	-34.11 to 32.55
15	56,24	72,15	15,91	-17.42 to 49.24
30	72,91	82,35	9,442	-23.89 to 42.77
45	83,97	83,82	-0,1457	-33.48 to 33.19
60	91,15	85,21	-5,939	-39.27 to 27.39

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-0,7782	0,08997	P > 0.05	ns
15	15,91	1,839	P > 0.05	ns
30	9,442	1,092	P > 0.05	ns
45	-0,1457	0,01684	P > 0.05	ns
60	-5,939	0,6866	P > 0.05	ns

<b>PMM vs CA</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PMM</b>	<b>CA</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	3,199	42,03	38,83	5.495 to 72.16
15	17,04	57,12	40,08	6.748 to 73.41
30	26,57	68,86	42,29	8.955 to 75.62
45	38,19	73,00	34,81	1.479 to 68.14
60	43,50	77,57	34,07	0.7389 to 67.40

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	38,83	4,489	P<0.001	***
15	40,08	4,633	P<0.001	***
30	42,29	4,889	P<0.001	***
45	34,81	4,024	P<0.01	**
60	34,07	3,939	P<0.01	**

<b>PMM vs PA</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PMM</b>	<b>PA</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	3,199	27,24	24,04	-9.292 to 57.37
15	17,04	48,89	31,85	-1.483 to 65.18
30	26,57	67,01	40,44	7.113 to 73.78
45	38,19	74,61	36,43	3.094 to 69.76
60	43,50	77,72	34,22	0.8861 to 67.55

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	24,04	2,779	P < 0.05	*
15	31,85	3,682	P<0.01	**
30	40,44	4,676	P<0.001	***
45	36,43	4,211	P<0.001	***
60	34,22	3,956	P<0.01	**

<b>PMM vs CE</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PMM</b>	<b>CE</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	3,199	21,45	18,25	-15.09 to 51.58
15	17,04	64,62	47,58	14.25 to 80.91
30	26,57	77,49	50,92	17.59 to 84.25
45	38,19	79,39	41,20	7.873 to 74.53
60	43,50	79,74	36,23	2.903 to 69.57

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	18,25	2,109	P > 0.05	ns
15	47,58	5,501	P < 0.001	***
30	50,92	5,887	P < 0.001	***
45	41,20	4,763	P < 0.001	***
60	36,23	4,189	P < 0.001	***

<b>PMM vs PE</b>				
Column Factor	PMM	PE	Difference	95% CI of diff.
5	3,199	30,09	26,89	-6.438 to 60.22
15	17,04	72,15	55,11	21.78 to 88.44
30	26,57	82,35	55,78	22.45 to 89.11
45	38,19	83,82	45,64	12.31 to 78.97
60	43,50	85,21	41,71	8.379 to 75.04

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	26,89	3,109	P < 0.05	*
15	55,11	6,371	P < 0.001	***
30	55,78	6,448	P < 0.001	***
45	45,64	5,276	P < 0.001	***
60	41,71	4,822	P < 0.001	***

<b>CA vs PA</b>				
Column Factor	CA	PA	Difference	95% CI of diff.
5	42,03	27,24	-14,79	-48.12 to 18.54
15	57,12	48,89	-8,231	-41.56 to 25.10
30	68,86	67,01	-1,841	-35.17 to 31.49
45	73,00	74,61	1,615	-31.72 to 34.95
60	77,57	77,72	0,1472	-33.18 to 33.48

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-14,79	1,709	P > 0.05	ns
15	-8,231	0,9516	P > 0.05	ns
30	-1,841	0,2129	P > 0.05	ns
45	1,615	0,1867	P > 0.05	ns
60	0,1472	0,01702	P > 0.05	ns

<b>CA vs CE</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>CA</b>	<b>CE</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	42,03	21,45	-20,58	-53.91 to 12.75
15	57,12	64,62	7,500	-25.83 to 40.83
30	68,86	77,49	8,633	-24.70 to 41.96
45	73,00	79,39	6,394	-26.94 to 39.73
60	77,57	79,74	2,164	-31.17 to 35.50

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	-20,58	2,379	P > 0.05	ns
15	7,500	0,8671	P > 0.05	ns
30	8,633	0,9980	P > 0.05	ns
45	6,394	0,7392	P > 0.05	ns
60	2,164	0,2502	P > 0.05	ns

<b>CA vs PE</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>CA</b>	<b>PE</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	42,03	30,09	-11,93	-45.26 to 21.40
15	57,12	72,15	15,03	-18.30 to 48.36
30	68,86	82,35	13,49	-19.84 to 46.82
45	73,00	83,82	10,83	-22.50 to 44.16
60	77,57	85,21	7,640	-25.69 to 40.97

<b>Column Factor</b>	<b>Difference</b>	<b>t</b>	<b>P value</b>	<b>Summary</b>
5	-11,93	1,380	P > 0.05	ns
15	15,03	1,738	P > 0.05	ns
30	13,49	1,560	P > 0.05	ns
45	10,83	1,252	P > 0.05	ns
60	7,640	0,8832	P > 0.05	ns

<b>PA vs CE</b>				
<b>Column Factor</b>	<b>PA</b>	<b>CE</b>	<b>Difference</b>	<b>95% CI of diff.</b>
5	27,24	21,45	-5,794	-39.12 to 27.54
15	48,89	64,62	15,73	-17.60 to 49.06
30	67,01	77,49	10,47	-22.86 to 43.81
45	74,61	79,39	4,779	-28.55 to 38.11
60	77,72	79,74	2,017	-31.31 to 35.35

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	-5,794	0,6698	P > 0.05	ns
15	15,73	1,819	P > 0.05	ns
30	10,47	1,211	P > 0.05	ns
45	4,779	0,5524	P > 0.05	ns
60	2,017	0,2332	P > 0.05	ns

<b>PA vs PE</b>				
Column Factor	PA	PE	Difference	95% CI of diff.
5	27,24	30,09	2,854	-30.48 to 36.18
15	48,89	72,15	23,26	-10.07 to 56.60
30	67,01	82,35	15,33	-18.00 to 48.67
45	74,61	83,82	9,212	-24.12 to 42.54
60	77,72	85,21	7,493	-25.84 to 40.82

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	2,854	0,3299	P > 0.05	ns
15	23,26	2,689	P > 0.05	ns
30	15,33	1,773	P > 0.05	ns
45	9,212	1,065	P > 0.05	ns
60	7,493	0,8662	P > 0.05	ns

<b>CE vs PE</b>				
Column Factor	CE	PE	Difference	95% CI of diff.
5	21,45	30,09	8,647	-24.68 to 41.98
15	64,62	72,15	7,533	-25.80 to 40.86
30	77,49	82,35	4,860	-28.47 to 38.19
45	79,39	83,82	4,433	-28.90 to 37.76
60	79,74	85,21	5,476	-27.86 to 38.81

Column Factor	Difference	t	P value	Summary
5	8,647	0,9997	P > 0.05	ns
15	7,533	0,8708	P > 0.05	ns
30	4,860	0,5619	P > 0.05	ns
45	4,433	0,5125	P > 0.05	ns
60	5,476	0,6331	P > 0.05	ns

Tiempo (min)

	5	15	30	45	60
Control vs PBM	*	*	ns	ns	ns
Control vs PMM	***	***	***	***	***
Control vs CA	ns	*	ns	ns	ns
Control vs PA	**	**	ns	ns	ns
Control vs CE	***	ns	ns	ns	ns
Control vs PE	**	ns	ns	ns	ns
PBM vs PMM	*	***	***	***	***
PBM vs CA	ns	ns	ns	ns	ns
PBM vs PA	ns	ns	ns	ns	ns
PBM vs CE	ns	ns	ns	ns	ns
PBM vs PE	ns	ns	ns	ns	ns
PMM vs CA	***	***	***	**	**
PMM vs PA	*	**	***	***	**
PMM vs CE	ns	***	***	***	***
PMM vs PE	*	***	***	***	***
CA vs PA	ns	ns	ns	ns	ns
CA vs CE	ns	ns	ns	ns	ns
CA vs PE	ns	ns	ns	ns	ns
PA vs CE	ns	ns	ns	ns	ns
PA vs PE	ns	ns	ns	ns	ns
CE vs PE	ns	ns	ns	ns	ns