



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“MEJORAMIENTO DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA DE LA
FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA),
MEDIANTE EL DESARROLLO DE DISPERSIONES SÓLIDAS *IN*
VITRO, UTILIZANDO TRES TIPOS DE POLÍMEROS
HIDROFÍLICOS.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

VALERIA ISABEL RODRÍGUEZ VINUEZA

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz que guía mi vida, mi fortaleza para seguir adelante por darme la sabiduría que necesito para enfrentar mis dudas y ser el motor y partícipe de mis alegrías y triunfos.

A mis padres y hermana por darme la confianza para lograr mis metas, enseñarme y corregirme con amor siendo mi ejemplo y mi mayor apoyo.

A mi mejor amiga porque el tiempo hizo crecer nuestra amistad, por compartir juntas gratos y tristes momentos, aunque lejos siempre estarás presente en mi mente y en mi corazón Johanna T.

AGRADECIMIENTO

A Dios y mis padres por darme la vida, la bendición de poder alcanzar mis objetivos personales y profesionales, por apoyarme incondicionalmente con sus consejos, amor y su confianza.

A mis amigos y familiares por ser parte de mi formación y experiencia profesional.

A mi tutor y colaborador BQF. Carlitos Pazmiño, M.Sc. y BQF. Diego Vinueza T, M.Sc. por su apoyo vital en esta investigación. Gracias por su paciencia, tiempo, dedicación y por compartir sus conocimientos para ayudarme a alcanzar mi objetivo profesional.

Y a todos quienes de una u otra manera fueron parte de mi enseñanza aprendizaje, y colaboraron para la realización de esta investigación.

Yo, Valeria Isabel Rodríguez Vinuesa, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

VALERIA ISABEL RODRÍGUEZ VINUEZA

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“MEJORAMIENTO DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA), MEDIANTE EL DESARROLLO DE DISPERSIONES SÓLIDAS *IN VITRO*, UTILIZANDO TRES TIPOS DE POLÍMEROS HIDROFÍLICOS”** de responsabilidad de la señorita egresada Valeria Isabel Rodríguez Vinueza, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. César Ávalos Infante
**DECANO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS**

Dr. Francisco Portero
**DIRECTOR DE LA ESCUELA
DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

BQF. Carlitos Pazmiño M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Diego Vinueza T. M.Sc.
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Eduardo Tenelanda
**COORDINADOR
SISBIB - ESPOCH**

NOTA DE TESIS ESCRITA -----

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	
ÍNDICE DE DE ANEXOS	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 <i>Banisteriopsis caapi</i>	1
1.1.1 Descripción general	1
1.1.2 Propiedades medicinales	2
1.1.3 Composición química	2
1.2 HARMINA Y SUS DERIVADOS	3
1.2.1 Acción farmacológica	3
1.3 SOLUBILIDAD DE LOS FÁRMACOS	4
1.3.1 Importancia de la solubilidad en la Farmacocinética	4
1.3.2 Clasificación de fármacos escasamente solubles	5
1.4 DISPERSIONES SÓLIDAS.	5
2. PARTE EXPERIMENTAL	7
2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN	7
2.2 MATERIALES Y REACTIVOS	7
2.2.1 Material vegetal	7
2.2.2 Recolección de la muestra	7
2.2.3 Muestra Estándar	8
2.2.4 Materiales de laboratorio	8
2.2.5 Reactivos	9

2.3	EQUIPOS	9
2.4	POLÍMEROS	9
2.5	TÉCNICAS Y MÉTODOS	10
2.5.1	OBTENCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i> .	10
2.5.1.1	Extracción de la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	10
2.5.1.2	Aislamiento e identificación de la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i> . Evaluación de un barrido espectral UV y elaboración de la curva de	12
2.5.1.3	calibración de la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	14
2.5.2	REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE PRE FORMULACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i> , MEDIANTE ENSAYOS DE SOLUBILIDAD ACUOSA, PERMEABILIDAD, PROPIEDADES AL ESTADO SÓLIDO (DSC, IR, MICROSCOPIA ÓPTICA), Y ENSAYO DE DISOLUCIÓN.	14
2.5.2.1	Ensayo de solubilidad acuosa	15
2.5.2.2	Ensayo de permeabilidad	15
2.5.2.3	Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA)	16
2.5.2.4	Ensayo de disolución	16
2.5.3	DESARROLLO DE LA MATRIZ DE COMBINACIONES DE LOS ELEMENTOS QUE CONFORMAN LAS DISPERSIONES SÓLIDAS, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS <i>IN VITRO</i> .	17
2.5.3.1	Ensayo de solubilidad acuosa de las DS	20
2.5.3.2	Ensayo de permeabilidad a la mejor DS	20
2.5.3.3	Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA) de la mejor DS	21
2.5.3.4	Ensayo de disolución de la mejor DS	21
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.		
3.1	OBTENCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>BANISTERIOPSIS CAAPI</i> .	23
3.1.1	Determinación de los parámetros óptimos asociados al proceso de extracción de la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i> a diferentes pH mediante cromatografía en capa fina (TLC).	23
3.1.2	Determinación cualitativa de alcaloides mediante tamizaje fitoquímico	25
3.1.3	Identificación de la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	26

	mediante cromatografía en placa preparativa.	
3.1.4	Evaluación de un barrido espectral UV y elaboración de la curva de calibración de la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	27
3.2	REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE PRE FORMULACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>BANISTERIOPSIS CAAPI</i>, MEDIANTE ENSAYOS DE SOLUBILIDAD ACUOSA, PERMEABILIDAD, PROPIEDADES AL ESTADO SÓLIDO (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA), Y ENSAYO DE DISOLUCIÓN.	30
3.2.1	Ensayo de solubilidad acuosa	32
3.2.2	Ensayo de permeabilidad	33
3.2.3	Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA)	34
3.3	DESARROLLO DE LA MATRIZ DE COMBINACIONES DE LOS ELEMENTOS QUE CONFORMAN LAS DISPERSIONES SÓLIDAS, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS <i>IN VITRO</i>.	36
	Ensayo de solubilidad acuosa de las DS	36
3.3.1		
3.3.2	Ensayo de permeabilidad a la mejor DS	39
	Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA) de la mejor DS	40
3.3.3		
3.3.4	Ensayo de disolución de la mejor DS	42
4.	CONCLUSIONES	44
5.	RECOMENDACIONES	46
	BIBLIOGRAFIA	47
	ANEXOS	53

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AT	Alcaloides totales
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
DS	Dispersión Sólida
FS	Fin del solvente
HCL	Ácido clorhídrico
IR	Infrarrojo
LOG P	Logaritmo de permeación
MA	Muestra aplicada
MI	Muestra inferior
min	Minutos
mL	Mililitros
MS	Muestra superior
nm	Nanómetros
P	Coefficiente de reparto
PEG 1450	Polietilenglicol 1450
pH	Potencial de Hidrógeno
PVP k- 30	Polivinilpirrolidona
Rf	Franja de referencia
RPM	Revoluciones por minuto
SH	Estándar de Harmina
°T	Temperatura
TGI	Tracto gastrointestinal
TLC	Cromatografía en capa fina
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO Nº 1.	PREPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE VOLUMEN A TOMAR PARA CADA UNA DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS.	18
CUADRO Nº 2.	PREPARACIÓN DE LA MATRIZ DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS	19
CUADRO Nº 3.	DATOS DEL BARRIDO DE pH MEDIANTE TLC	24
CUADRO Nº 4.	RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUIMICO	25
CUADRO Nº 5.	COMPARACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS MEDIANTE PLACA PREPARATIVA CON EL ESTÁNDAR DE HARMINA	27
CUADRO Nº 6.	DATOS DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD	32
CUADRO Nº 7.	DATOS DEL ENSAYO DE PERMEABILIDAD	33
CUADRO Nº 8.	DATOS DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS	37
CUADRO Nº 9.	RESUMEN DEL TEST ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD APLICADO A LAS 15 DISPERSIONES REALIZADAS	38
CUADRO Nº 10.	DATOS DEL ENSAYO DE PERMEABILIDAD REALIZADO A LA MEJOR DS.	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO Nº1	BARRIDO ESPECTRAL DEL ESTÁNDAR DE HARMINA 98 % DE PUREZA (BATCH CPC20140312). 1ppm	28
GRÁFICO Nº2	BARRIDO ESPECTRAL DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i>	28
GRÁFICO Nº3	CURVA DE CALIBRACIÓN DEL EXTRACTO ESPECIAL ÓPTIMO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i>	29
GRÁFICO Nº4	BARRIDO ESPECTRAL DEL TERCER EXTRACTO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i>	30
GRÁFICO Nº5	BARRIDO ESPECTRAL DEL TERCER EXTRACTO DE la fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i> EN AGUA	31
GRÁFICO Nº6	ESPECTRO INFRARROJO DE ESTÁNDAR DE HARMINA Y DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i> (AT EXPRESADOS COMO HARMINA).	34
GRÁFICO Nº7	ESPECTRO INFRARROJO DE LA MEJOR DS	40
GRÁFICO Nº8	ENSAYO DE DISOLUCION APLICADO A LA MEJOR DS Y A LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Banisteriopsis caapi</i> (AT EXPRESADOS COMO HARMINA.)	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1.	<i>Banisteriopsis caapi</i> (AYAHUASCA)	1
FIGURA N° 2.	Estructura química de la harmina	2
FIGURA N° 3.	Estructura química de la harmalina	3
FIGURA N° 4.	Barrido de pH	23
FIGURA N° 5.	TLC harmine	24
FIGURA N° 6.	Cromatografía en Placa preparativa	26
FIGURA N° 7.	Cromatografía en Placa Preparativa Revelada	26
FIGURA N° 8.	M 1 I: Muestra 1 inferior de la placa preparativa; SH: Estándar de Harmina	26
FIGURA N° 9.	A: Estándar de harmina visto al microscopio óptico con lente de 10x B: Estándar de harmina visto al microscopio óptico con lente de 40x	35
FIGURA N° 10	C: Alcaloides totales expresados como Harmina visto al microscopio óptico con lente de 10X D: Alcaloides totales expresados como Harmina visto al microscopio óptico con lente de 40X	35
FIGURA N° 11	E: Mejor DS vista al microscopio óptico con el lente de 10 X F: Mejor DS vista al microscopio óptico con el lente de 40 X	41

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFIA N° 1	MATERIA PRIMA VEGETAL DE <i>Banisterioosis caapi</i>	58
FOTOGRAFIA N° 2	ESTANDAR DE HARMINA 98 % DE PUREZA (BATCHCPC20140312)	58
FOTOGRAFIA N° 3	PROCESO DE EXTRACCION DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE <i>Banisterioosis caapi</i>	59
FOTOGRAFIA N° 4	ENSAYO DE SOLUBILIDAD DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE <i>Banisterioosis caapi</i>	60
FOTOGRAFIA N° 5	ENSAYO DE PERMEABILIDAD DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE <i>Banisterioosis caapi</i>	60
FOTOGRAFIA N° 6	INFRARROJO DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE <i>Banisterioosis caapi</i>	61
FOTOGRAFIA N° 7	POLIMEROS Y SUS COMBINACIONES	61
FOTOGRAFIA N° 8	DISPERSIONES SOLIDAS	62
FOTOGRAFIA N° 9	SOLUCIONNES TAMPON	62
FOTOGRAFIA N° 10	PROCESO DE ENCAPSULACION A MANO	63
FOTOGRAFIA N° 11	ENSAYO DE DISOLUCION	64

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1	CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ESTANDAR DE HARMINA 98 % DE PUREZA (BATCH CPC20140312).	53
ANEXO N° 2	BARRIDO ESPECTRAL UV DE LOS POLÍMEROS HIDROFÍLICOS: POLIETILENGLICO (PEG), POLIVINILPIRROLIDONA (PVP k- 30) Y LA MEJOR DISPERSION SÓLIDA	54
ANEXO N° 3	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DE LA MEJOR DISPERSION SÓLIDA	56
ANEXO N° 4	ESPECCTRO INFRARROJO DE LOS POLÍMEROS HIDROFÍLICOS: POLIETILENGLICO (PEG) Y POLIVINILPIRROLIDONA (PVP k- 30).	57
ANEXO N° 5	EVIDENCIA FOTOGRAFÍAS.	58

RESUMEN

Se realizó el mejoramiento de las características de solubilidad acuosa de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), mediante la obtención de un sistema optimizado de dispersiones sólidas *in vitro*, utilizando diferentes tipos de polímeros hidrofílicos, con la finalidad de mejorar sus características de biodisponibilidad; investigación desarrollada en el laboratorio de Productos Naturales Fitoquímica, de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. A escala de laboratorio la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) se obtuvo el alcaloide beta carbolínico de la harmina, siendo identificado y aislado del vegetal *Banisteriopsis caapi*, frente al estándar de referencia Harmina 98 % de pureza (BATCH CPC20140312). Se determinaron sus características biofarmacéuticas, mediante ensayos de solubilidad acuosa, permeabilidad, propiedades al estado sólido y ensayo de disolución, dando como resultado una baja solubilidad y una alta permeabilidad lo que permitió ubicar a los AT expresados como harmina dentro la clasificación Biofarmacéutica *Clase II*.

Se desarrollaron 15 dispersiones sólidas de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* más los polímeros hidrófilos y al evaluar sus características biofarmacéuticas *in vitro* se obtuvo una DS con una solubilidad superior a la del principio activo puro y las demás DS.

Mediante la aplicación de dispersiones sólidas se obtuvo una disminución en el tamaño de sus partículas, pasando de cristales a cristales amorfos con mayor humectabilidad, características que permitieron mejorar su solubilidad y perfil de disolución y por tanto mejoran su biodisponibilidad.

La aplicación de las dispersiones sólidas en tecnología farmacéutica muestran un resultado eficiente. Por lo que se recomienda aplicarlo para mejorar otros principios activos de características poco solubles, así como evaluar la actividad farmacológica de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) y la mejor DS ya que posee propiedades farmacológicas que podrían ayudar a minimizar trastornos neurodegenerativos.

SUMMARY

Improved characteristics of water solubility of the alkaloid fraction *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) was performed by obtaining an optimized solid dispersions in vitro, using various types of hydrophilic polymers, in order to improve their bioavailability characteristics ; research conducted in the laboratory of Phytochemistry Natural Products, School of Pharmacy and Biochemistry of the Polytechnic School of Chimborazo.

A laboratory scale the alkaloid fraction of *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) the beta carbolínico alkaloid harmine was obtained, being identified and isolated from the plant *Banisteriopsis caapi* compared to reference standard Harmina 98% purity (BATCH CPC20140312). Their biopharmaceutical characteristics were determined by testing of aqueous solubility, permeability, the solid state properties and dissolution test, resulting in a low solubility and high permeability allowing to locate the AT expressed as harmine in the Biopharmaceutical Classification Class II.

15 solid dispersions of the alkaloid fraction Caapi *Banisteriopsis* more hydrophilic polymers developed and to evaluate their biopharmaceutical characteristics in vitro is obtained a higher DS with a pure active principle the other DS and solubility. By applying solid dispersions a decrease in their particle size, from crystal to amorphous crystals with higher wettability characteristics which allowed improving their solubility and dissolution profile and thus improving their bioavailability was obtained. The application of solid dispersions in pharmaceutical technology shows an efficient outcome. It is recommended to apply it to improve other poorly soluble actives characteristics and assess the pharmacologic activity of alkaloid fraction of *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) and the best DS because it has pharmacological properties that could help minimize neurodegenerative disorders.

INTRODUCCIÓN

Los alcaloides son metabolitos insolubles o escasamente solubles en agua (Dalton, 1979). Esta insolubilidad dificulta su disponibilidad en la acción farmacológica, imprescindible para algunos tratamientos, sobre los cuales los alcaloides son de gran interés (Roberts & Vink, 1998). Esta realidad, genera la necesidad de buscar nuevas estrategias que permitan mejorar su biodisponibilidad.

De entre los alcaloides, la harmina y harmalina son principios activos, que se ubican en la categoría de fármacos con una alta permeabilidad, a pesar de su poca solubilidad (Amidon, 1995,). Actúan como inhibidores de la monoaminooxidasa (MAO), efecto que favorece la regulación metabólica de neurotransmisores en el tejido nervioso (González & Ortega, 1978). Estas características le proporcionan un potencial farmacológico contra algunos trastornos neurológicos, tales como estados depresivos, convulsivos, Parkinson, Alzheimer, entre otros (De la Cuba, 1994).

Si añadimos los altos costes que derivan de los tratamientos de este tipo de enfermedades neurodegenerativas (Fernández, Crehuet Navajas, & Farouk, 1992). El uso de estos metabolitos resulta una alternativa terapéutica interesante para su estudio.

Sin embargo, para estos alcaloides su biodisponibilidad oral es baja, mejorar su solubilidad en agua permitiría que la harmina y sus derivados fuesen metabolitos más eficaces en su acción terapéutica. En consecuencia, proporcionaría que los procesos farmacocinéticos de disolución, absorción y eliminación tengan mayor efectividad (Baselt, 2004).

Aproximadamente del 35 al 40% de los fármacos que se encuentran disponibles en el mercado presentan una baja solubilidad. La gran mayoría de fármacos muy poco solubles se extienden de forma progresiva, y alrededor del 90% de los componentes activos en desarrollo son pobremente solubles (Guiadager, 2009).

Es más, los fármacos en agua, con nula o escasa solubilidad, sufren de complicaciones en la biodisponibilidad oral. Sin embargo, el uso de las micelas,

microemulsiones, dispersiones sólidas y nanosuspensiones permite optimizar la solubilidad de los medicamentos poco solubles (Potta, Minemi, Nukala, & Peinado, 2010).

Para la harmina y harmalina, esto puede ser corregido desarrollando formulaciones que contienen a los principios activos en medio de una matriz polimérica. En este sentido, se obtendría una mezcla molecular conocida como dispersión sólida de fármacos muy poco solubles. Estas dispersiones sólidas han sido calificadas, como una de las mejores alternativas para lograr la biodisponibilidad de estos compuestos (Chiou & Riegelman, 1961). Esto se consigue por una disminución de la dimensión de la partícula, un incremento de la humectabilidad de las mismas y una menor energía de activación para su liberación (Richard & Clark Luig, 2002).

Por otro lado, se conoce que los principios activos que le dan el uso farmacológico a *Banisteriopsis caapi* son los alcaloides. Éstos se encuentran en los tallos y las terminaciones del vegetal. Está formada por harmina (como alcaloide mayoritario), y sus derivados: harmalina, harmol, harmalol, vasina, d-1,2,3,4 tetrahidroharmina (Perrot & Raymond-Hamet, 1927).

Por lo que, resulta interesante plantear su uso, para obtener fracciones de extractos de este vegetal, rico en harmina y derivados dispuestos en dispersiones sólidas, para mejorar su solubilidad y su biodisponibilidad.

Con los antecedentes presentados se plantean los siguientes objetivos en la investigación:

General

- Mejorar las características de solubilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), mediante la obtención de un sistema optimizado de dispersiones sólidas *in vitro*, utilizando diferentes tipos de polímeros hidrofílicos.

Específicos

1. Obtener, aislar e identificar la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.
2. Realizar los estudios de preformulación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, mediante ensayos de solubilidad acuosa, permeabilidad, propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA) y ensayo de disolución.
3. Desarrollar la matriz de combinaciones de los elementos que conforman las dispersiones sólidas, mediante la aplicación del diseño experimental y evaluar sus características físicas, químicas y biofarmacéuticas *in vitro*, aplicando los ensayos de la preformulación para la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.
4. Escoger una dispersión sólida optimizada basada en los estudios realizados en la investigación

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Banisteriopsis caapi*

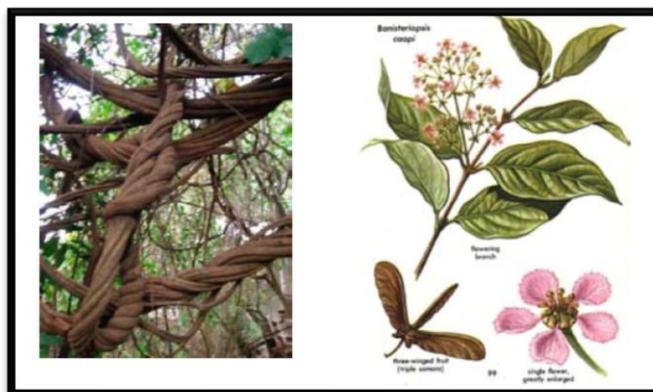
1.1.1 Descripción general

Es una variedad vegetal de tipo enredadera que corresponde a la “*familia Malpighiaceae*” (Spruce, 1851). Esta planta adopta algunas denominaciones que provienen de voces indígenas como: “*ayahuasca, yagé, yagugue, caapi, mariri o pildé*” (Farzin D, 2006).

Se caracteriza por ser una planta trepadora, forma ramas de gran tamaño, presenta una corteza lisa de color pardo. Posee hojas verdes de 8 a 18 cm de largo y pequeñas flores de color rosado (Cuatrecasas, 1958).

Su nombre hace referencia a la bebida que posee efectos alucinógenos, utilizada por pueblos indígenas de América del Sur por sus supuestas propiedades proféticas y mágicas (Schultes, 1969).

La bebida alucinógena es preparada mediante la infusión de *Banisteriopsis caapi*, principalmente de sus tallos y hojas. A este brebaje se le añaden otras plantas como: *Banisteriopsis inebrians* y *Peganum harmala*, las cuales contribuyen a potenciar su efecto (Naranjo, 1970).



FUENTE: Schultes R, 1976 Ethnobotany Hallucinogenic Plants

FIGURA N° 1. *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA)

1.1.2 Propiedades medicinales

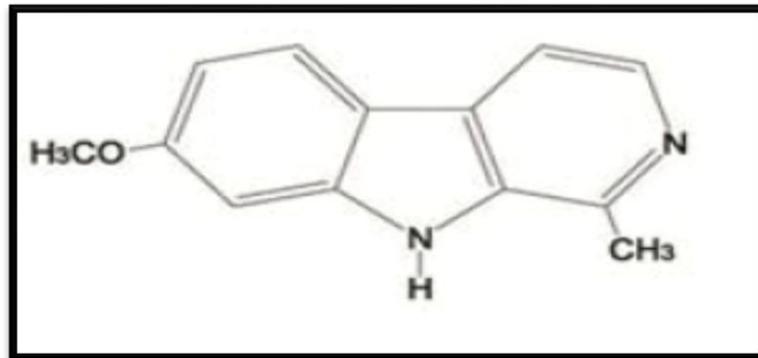
Banisteriopsis caapi tiene una potente acción sobre el sistema nervioso, por cuanto podría estar indicada en el tratamiento de algunas afecciones neurológicas. (Alzugaray & Alzugaray, 1984).

La efectividad sobre el consumo de *Banisteriopsis caapi*, ha sido sujeto de estudio por profesionales psicólogos y psiquiatras por varios años (Naranjo, 1967).

Se han realizado algunos estudios y evaluaciones acerca de las propiedades que posee *Banisteriopsis caapi* como posible tratamiento contra el mal de Parkinson (Ott, 2004).

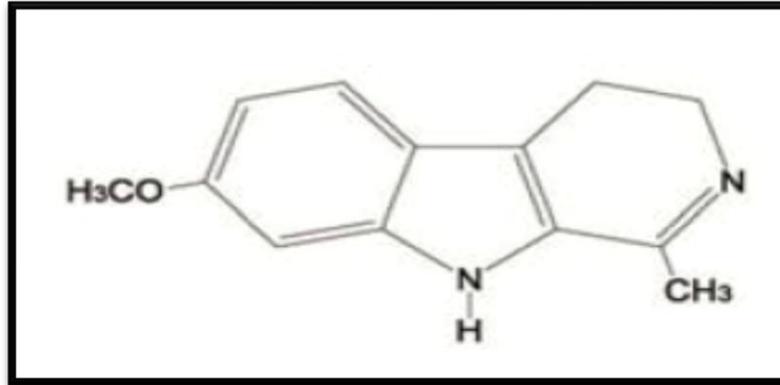
1.1.3 Composición química

El componente químico representativo del vegetal de *Banisteriopsis caapi* es la harmina. En menor cantidad se encuentran otros metabolitos derivados de su componente mayoritario: harmalina y d-1, 2, 3,4 tetrahydroarmina (Holchstein & Paradies, 1957).



FUENTE: PEREZ DE LOS COBOS J, 2006 TRATADO SET DE TRANSTORNOS ADICTIVOS

FIGURA N° 2. Estructura química de la harmina



FUENTE: PEREZ DE LOS COBOS J, 2006 TRATADO SET DE TRANSTORNOS ADICTIVOS

FIGURA N° 3. Estructura química de la harmalina

1.2 HARMINA Y SUS DERIVADOS

Harmina, harmalina y tetrahydroharmina son un tipo de alcaloides del grupo de las betas carbolinas (Taiz & Zeiger, 2006, págs. 558-564). Son consideradas sustancias alucinógenas que pueden modificar transitoriamente la percepción del pensamiento y el humor (Rodríguez, 2005).

La harmina fue identificada en la especie vegetal de *Peganum harmala* (Fritsche, 1847). En estudios posteriores se demostró la presencia de algunos derivados de este alcaloide en la misma planta (Berzelius, 1881). Estos metabolitos también han sido localizados en tejidos de mamíferos como: cerebro, plaquetas y glándulas adrenales de ratas y plasma humano (Airakasinen & Kari, 1981).

Los alcaloides beta carbolínicos son moléculas liposolubles e insolubles en agua, lo cual dificulta su absorción y eliminación en el organismo (Velasco & Alvarez, 1988).

1.2.1 Acción farmacológica

La enzima monoaminoxidasa se encuentra en las células del organismo participando en la descomposición de aminas biógenas¹. Cuando existe un desequilibrio funcional de la monoaminoxidasa, se producen trastornos neurológicos como la depresión (Vallejo & Urretavizcaya, 2000). Para estos casos, se utilizan tratamientos con inhibidores de esta enzima, los cuales permiten restablecer el equilibrio emocional mediante la acumulación de epinefrina y norepinefrina en el organismo (Pletscher, Besendorf, Bachtold, & Gay, 1959).

¹ Aminas biógenas: son neurotransmisores derivados de aminoácidos (Campbell & Reece, 2007).

Los alcaloides de la harmina y sus derivados provocan un efecto estimulante tras su utilización, induciendo un cambio en el estado de ánimo de la persona (Rodd, 2008). El efecto es producido porque estos componentes actúan como inhibidores de las enzimas monoaminooxidas (Deulofeu, 1967).

La utilización de harmina y sus derivados presentes en algunas plantas pueden modificar los estados de conciencia. Con ello, pueden provocar resultados terapéuticos muy favorables en el tratamiento de enfermedades como estados depresivos y la farmacodependencia (Zabala & Lopez, 1995).

1.3 SOLUBILIDAD DE LOS FÁRMACOS

La solubilidad es la cantidad máxima de soluto que llega a disolverse en un volumen determinado de disolvente (Aulton, 2004). En farmacia la solubilidad hace referencia al agua. Esto se debe a que los fluidos biológicos del organismo son de naturaleza acuosa (Yalkowsky, 1999).

Existen varios factores que influyen en la solubilidad de los principios activos como: la estructura molecular, temperatura y pH (Jenner & Testa, 1980). Estos factores pueden ser modificados en la industria farmacéutica. Con el objetivo de incrementar la solubilidad y por tanto la biodisponibilidad de los fármacos (Pérez, Guevara, Cárdenas, Pinzón, Barbosa, & Martínez, 2003).

1.3.1 Importancia de la solubilidad en la Farmacocinética

La acción de los fármacos no depende sólo de la capacidad de desarrollar una respuesta terapéutica en el organismo de un ser vivo (Pla & Moreno, 1982). A su vez, es función de sus propiedades farmacocinéticas. Éstas desempeñan un papel muy importante en la biodisponibilidad, efectividad y toxicidad de los fármacos (Avendaño, 2001).

La solubilidad es fundamental en los procesos de absorción y eliminación de fármacos (Sáez, Hernández, & López, 2003). El requisito fundamental para que se absorba un principio activo es que éste se encuentre disuelto en el lugar de absorción (Cadórniga, 1983). Dado que la mayoría de fármacos son eliminados por vía renal, su solubilidad acuosa es importante en este punto de la farmacocinética (Winter, 1994).

1.3.2 Clasificación de fármacos escasamente solubles

El Sistema de Clasificación de Biofarmacéuticos (BCS) permite clasificar a las sustancias farmacéuticas, tomando en cuenta su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. Existen tres elementos primordiales que determinan la velocidad y alcance de la absorción del fármaco: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal, desde una forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata. De acuerdo al BCS, las sustancias farmacéuticas se clasifican de la siguiente manera (FDA, 1997).

- *“Clase I: alta solubilidad y alta permeabilidad*
- *Clase II: baja solubilidad y alta permeabilidad*
- *Clase III: alta solubilidad y baja permeabilidad*
- *Clase IV: baja solubilidad y baja permeabilidad”*

1.4 DISPERSIONES SÓLIDAS.

Las dispersiones sólidas son mezclas que contienen al menos dos compuestos diferentes. Por lo general, estos componentes son una matriz hidrofílica usada como transportador y un principio activo de naturaleza hidrofóbica (Shevale Pankaj & Jadhav Prakash, 2013).

Las dispersiones sólidas logran mejorar la biodisponibilidad de compuestos poco solubles (Chiou & Riegelman, 1961). Esto se consigue gracias a una reducción de la dimensión de la partícula, un incremento en la humectabilidad de las mismas y una menor energía de activación para su liberación (Richard & Clark Luig, 2002).

Las dispersiones sólidas formadas, cuando entran en contacto con los líquidos del organismo, permiten que la matriz se disuelva muy rápido y libere al principio activo de forma molecular (Vasconcelos, Sarmiento, & Costa, 2007).

Al ser la baja solubilidad uno de los más grandes desafíos en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, una perspectiva de solución para este problema es el uso de polímeros como agentes solubilizantes.

En la formación de dispersiones sólidas, la matriz hidrofílica está constituida por polímeros como: manitol, urea, ácido succínico, polivinilpirrolidona, ácido ascórbico,

polietilenglicol, entre otros. Estas sustancias permiten acelerar la velocidad de disolución del fármaco (Janssens, Denivelle, Rombaut, & Van den Mooter, 2008).

Estos polímeros han sido utilizados como excipientes solubilizantes para formulaciones orales. Tienen por naturaleza la característica de ser hidrofóbicos e hidrofílicos, lo que quiere decir que tienen a la vez sitios hidrofóbicos e hidrofílicos, que les permiten unirse con gran facilidad a compuestos de solubilidad baja y disolverse rápidamente en medios acuosos como lo es el tracto gastrointestinal (TGI) (Ismat, 2010).

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales – Fitoquímica, Tecnología Farmacéutica y Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 MATERIALES Y REACTIVOS

2.2.1 Material vegetal

La materia prima es el material vegetal de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), especie de clima tropical presente en toda la región Amazónica del Ecuador (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1992).

Para el estudio de investigación, el material vegetal de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), se obtuvo en la provincia de Orellana, de los jardines botánicos y medicinales Mushu Yura en la ciudad del Coca. Dicha zona, presenta un clima cálido húmedo, con temperatura que oscila entre 20° a 40° C y una altitud de 254 m.s.n.m (Estrada; Seré, 1988).

2.2.2 Recolección de la muestra

La recolección de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), se realizó pasado el mediodía y con un ritual² de permiso a la madre naturaleza (Naranjo P. , 1983).

Las partes del vegetal que fueron aprovechadas para la investigación son sus tallos secos, las cuales eran cortados a mano pudiendo ser recolectadas en cualquier época

² Ritual: Consiste en una plegaria invocando el respeto hacia la planta y su uso. Se realiza al interior de una choza ubicada en el centro del jardín botánico, por un guía que dirige la ceremonia (Naranjo, 1970).

del año. Se procedió molerlos en un molino de mano y dejarlos en un lugar fresco y seco, protegidos de la luz (Fericgla, 1998).

2.2.3 Muestra Estándar

Estándar de HARMINA 98 % de pureza (BATCH CPC20140312), procedente de China. (Ver anexo 1)

2.2.4 Materiales de laboratorio

- Pipetas
- Termómetro
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Gradillas
- Embudo simple
- Embudos de separación
- Varilla de agitación
- Papel filtro
- Probeta
- Tampones
- Guantes
- Mascarilla
- Placas porta y cubre objetos
- Reverbero
- Pera de succión
- Recipientes ámbar
- Balones de aforación
- Balones esmerilados
- Espátula
- Pinzas para tubos
- Papel aluminio
- Parafilm

2.2.5 Reactivos

- Agua destilada
- Etanol (al 96%)
- Reactivos para identificación de alcaloides: Mayer y Dragendorff
- Éter etílico
- Ácido clorhídrico al 2%
- Metanol
- Hidróxido de amonio
- Cloroformo
- Acetona
- Dietilamina
- N- Octanol
- Propilenglicol
- Soluciones tampón a pH: 2.0 y 7.4

2.3 EQUIPOS

- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Peachímetro
- Estufa
- Equipo disolutor
- Equipo de Soxhlet
- Equipo de destilación: rotavapor
- Espectrofotómetro UV.
- Equipo de permeación
- Microscopio óptico

2.4 POLÍMEROS

- Polietileglicol (PEG1450)
- Povidona (PVP k-30)

2.5 TÉCNICAS Y MÉTODOS

A continuación, se muestran los métodos y técnicas que se emplearon para la obtención de cada uno de los objetivos planteados en la investigación.

2.5.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*.

En el proceso de obtención de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*. Se realizaron varios procedimientos con los cuales se obtuvo de manera eficaz la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* a escala de laboratorio.

2.5.1.1 Extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*

➤ **Proceso de extracción líquido -líquido**

Se realizó una extracción líquido -líquido mediante la utilización del equipo de Soxhlet, se partió de 50 g de vegetal de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), previamente molida en un balón de 500mL con 150mL de metanol en una relación 1:3 de vegetal y solvente hasta realizar alrededor de 10 enjuagues, garantizando de esta manera la extracción exhaustiva de los alcaloides del vegetal en metanol.

➤ **Proceso de concentración**

La concentración del extracto metanólico obtenido se realizó en el Rotavapor, a una temperatura no mayor a de 70 °C, a 150 rpm, durante 40 min. Se colocó el balón que contenía el extracto metanólico en el equipo previo establecidas las condiciones del proceso. Se concentró el extracto hasta obtener 10 mL del volumen inicial del extracto metanólico.

➤ **Proceso de acidificación**

Al extracto metanólico concentrado se le añadió HCL al 2 % para su reconstitución en una relación 1:3 del extracto y HCL al 2%, se filtró para obtener de esta manera el extracto acuoso.

➤ **Proceso de alcalinización**

Al extracto acuoso se procedió a realizar un ajuste de pH hasta tener un pH igual a 10 con una solución de hidróxido de amonio concentrado. Se añade el hidróxido de amonio concentrado al extracto acuoso gota a gota hasta llegar al pH de 10 y en agitación constante para la lograra la homogeneidad del extracto.

➤ **Proceso extracción con éter etílico y purificación**

Al extracto acuoso obtenido y ajustado su pH a 10 se trasvasa a un embudo de separación añadiendo éter etílico, agitado durante varios minutos hasta que los alcaloides de la fase acuosa pasen a la fase etérea, se deja en reposo algunos minutos hasta que se separen las fases para proceder a recogerlas individualmente cada fase, obteniendo de esta manera el extracto etéreo. Al extracto etéreo se le realizó enjuagues con agua alcalinizada en un embudo de separación para lograr la purificación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

➤ **Proceso de concentración del extracto etéreo**

Después de recoger todas las fases etéreas purificadas se procedió a realizar otra concentración en el rotavapor. A una temperatura no mayor a de 70 °C, a 150 rpm, durante 20 min. Se colocó el balón que contenía el extracto etéreo en el equipo, previo establecidas las condiciones del proceso. Se concentró el extracto hasta sequedad del volumen inicial quedando en las paredes del balón fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

➤ **Proceso de reconstitución de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.**

El residuo que quedo de la concentración a sequedad del extracto etéreo es la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, a este residuo se lo reconstituyó añadiéndole 250 mL de metanol y se almacenó protegidos de la luz bajo cadena de frío hasta y durante su uso.

2.5.1.2 Aislamiento e identificación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

➤ Determinación del proceso de extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* a diferentes pH mediante cromatografía de capa fina (TLC).

Previo a la determinación de extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* a pH 10 se realizó un ensayo de barrido en función del pH.

Se añadió durante el proceso de alcalinización a la fase acuosa poco a poco la solución de hidróxido de amonio concentrado hasta llegar uno a uno a los diferentes pH: 1, 5, 7, 8, 9 y finalmente 10 durante agitación constante. Después de alcanzar cada pH se realizó dos extracciones con éter etílico de manera consecutiva en embudos de separación para posteriormente recoger las fases etéreas y acuosas a diferentes pH.

Las fases etéreas a diferentes pH: 1, 5, 7, 8, 9 y 10 se las recogió en frascos ámbar y fueron conservadas en cadena de frío. De cada una de las fases etéreas se procedió a realizar una cromatografía en capa fina (TLC), para lo cual se usó placas de Sílice gel 60F 254 de 10 cm x 2 cm.

Según las condiciones cromatográficas en cada placa a 1 cm del borde inferior de la misma se colocó con un capilar una cantidad suficiente de muestra de extracto etéreo a diferentes pH. Se dejó secar las placas con las muestras colocadas por algunos minutos y se procedió a eluir las en un sistema de solventes determinado para alcaloides de la harmina.

La fase móvil utilizada en el sistema de solventes está constituida por: cloroformo, acetona, dietilamina, en una relación (50:40:10). Las placas se colocaron dentro de una cuba que contiene el sistema de solventes de la fase móvil y se deja que el solvente alcance una altura de 2cm antes del borde superior de la placa. Una vez que el solvente alcanzado la distancia necesaria se retiran las placas de la cuba y se deja secarlas a temperatura ambiente. Se observa en cada una de las placas las manchas obtenidas en la cámara cromatográfica de UV 254-365 nm. Por último las manchas observadas en las placas fueron reveladas con Dragendorff como agente revelador para alcaloides y se calculó los R_f respectivos.

➤ **Determinación cualitativa de alcaloides mediante tamizaje fitoquímico.**

Ensayo de Dragendorff, Mayer: permite reconocer en un extracto vegetal la presencia de alcaloides. Al extracto metanólico se procedió a evaporarlo a sequedad y el residuo reconstituirlo con 1 mL de HCL al 1 % en agua, se filtró y se procedió a dividir este filtrado en 3 tubos de ensayo.

Al tubo uno se lo consideró como referencia y al tubo dos y tres se le añadió reactivos de Dragendorff 2 gotas y Mayer 3 gotas respectivamente. En los dos casos la presencia de turbidez, precipitado es indicativo de la presencia de alcaloides.

➤ **Identificación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* mediante cromatografía en placa preparativa.**

Después de determinar que los alcaloides de la harmina presentes en el vegetal de *Banisteriopsis caapi* se encuentra en un pH igual a 10 se procedió a realizar una cromatografía en placa preparativa.

Al extracto acuoso nuevamente se ajusta el pH a 10, se realiza la extracción con éter etílico, se recogió la fase etérea, se filtró y se procedió a evaporar el éter etílico a °T ambiente hasta reducirlo a la mitad del contenido inicial.

El concentrado etéreo se procedió a sembrarlo en banda sobre una placa de Sílice gel 60F 254 de 10 cm x 20 cm., utilizando el mismo sistema de solventes como fase móvil cloroformo, acetona, dietilamina, en una relación (50:40:10). Fue revelada con Dragendorff como agente revelador para alcaloides solo una parte de toda la placa, se dejó secar a °T ambiente y se trazó unas líneas alrededor de las manchas reveladas para identificar cada una. Se procedió a raspar cada mancha identificada en la placa y recoger el residuo en tubos de ensayo, a los cuales se les añadió 5 mL de metanol, se filtró y el filtrado se evaporo hasta tener una mínima cantidad. Mientras tanto se procedió a colocar en tubo de ensayo una cantidad ínfima del estándar de harmina 98 % de pureza (BATCH CPC20140312), con 0.5 mL de metanol y se realizó una cromatografía de capa fina en otra placa con las muestras concentradas obtenidas y el estándar de harmina. Se utilizó el mismo sistema de solventes y revelado.

2.5.1.3 Evaluación de un barrido espectral UV y elaboración de la curva de calibración de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*

Se realizó una segunda extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, para este proceso la extracción fue realizada de manera cuantitativa hasta obtener el extracto metanólico 250 mL se almacenó protegidos de la luz, bajo cadena de frío hasta y durante su uso.

Los 250 mL de extracto metanólico obtenidos constituyen la solución madre de la cual partimos con una concentración de 1800 ppm determinada cuantitativamente.

A la solución madre se le realizó la lectura de su espectro de absorción en el espectrofotómetro UV- Visible en la región de 200 a 400 nm.

A partir de la concentración de la solución madre se realizó varias disoluciones a diferentes concentraciones: 180, 10, 7, 5, 3, 1 ppm, a las mismas que se les realizó también el espectro de absorción y la lectura de sus absorbancias a una longitud de onda definida.

Se preparó también una solución madre de 250 ppm de estándar de harmina 98 % de pureza (BATCH CPC20140312), seguido de una dilución para llegar a una concentración de 1 ppm, la misma que fue leída en el espectrofotómetro UV- Visible en la región de 200 a 400 nm.

2.5.2 REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*, MEDIANTE ENSAYOS DE SOLUBILIDAD ACUOSA, PERMEABILIDAD, PROPIEDADES AL ESTADO SÓLIDO (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA), Y ENSAYO DE DISOLUCIÓN.

Para los ensayos de preformulación se realizó una tercera extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

La concentración en ppm de este tercer extracto metanólico se determinó realizando dos diluciones de 1 mL en 10 mL de metanol y 1 mL de esta disolución en 25 mL de metanol, se procedió con la lectura de su absorbancia en espectrofotómetro UV- Visible a una longitud de onda definida. El valor de la absorbancia obtenida fue

reemplazado en la ecuación de la curva de calibración realizada anteriormente, encontrando de esta manera la concentración en ppm del tercer extracto metanólico.

Previo al ensayo de solubilidad acuosa y permeabilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, se realizó dos disoluciones de 1mL de extracto metanólico en 25 mL de agua y 1mL de esta disolución en 10 mL de agua. Se procedió a la lectura de su barrido espectral con el fin de conocer a la longitud de onda a la que se debe leer las muestras de estos dos ensayos de pre formulación.

2.5.2.1 Ensayo de solubilidad acuosa

Para esta prueba se tomó 5.4 mL de extracto metanólico que contienen 10 mg de alcaloides totales expresados como harmina, en un tubo de ensayo, se evaporó el metanol a sequedad, se colocó 5.4 mL más de extracto metanólico en el mismo tubo y se procedió de la misma manera, después se reconstituyó el residuo con 10 mL de agua, se dejó en agitación constante a 1500 rpm tapado y protegidos de la luz por una hora y posteriormente en reposo por 48 horas. Este ensayo fue realizado por duplicado.

Pasadas las 48 horas de reposo, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 50 rpm, se realizó una dilución tomando 1 mL del sobrenadante y aforándolo a 10 mL con agua. La dilución fue leída en el espectrofotómetro UV- Visible.

2.5.2.2 Ensayo de permeabilidad

Previo a este ensayo se realizó una saturación de 25mL de la solución de n- octanol con 25 mL de agua en un embudo de separación, se agitó y dejó en reposo por 24 horas.

La permeabilidad se realizó en un vaso de precipitación se puso 22 mL de extracto metanólico que contiene 40 mg de alcaloides totales expresados como harmina, se evaporó el metanol hasta tener un 1 mL del volumen inicial de extracto metanólico, se añadió a este residuo 10 mL de agua manteniendo al vaso en agitación constante por 15 min, después se trasvaso el contenido del vaso a un embudo de separación y se añadió 10 mL más de agua, se agitó y agregó los 25 mL de solución de n- octanol saturada previamente, dejando en reposo por 48 horas.

Pasadas las 48 horas de reposo, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 50 rpm, y se realizó la lectura del sobrenadante en el espectrofotómetro UV- Visible.

2.5.2.3 Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA)

➤ **IR (Infrarrojo)**

En la celda de este instrumento fue colocado a mano con la ayuda de pipetas Pasteur las muestras de extracto metanólico que contenía la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, el estándar de harmina 98% de pureza (BATCH CPC20140312), los polímeros usados para las dispersiones sólidas PVP k-30 y PEG

Se obtuvo un barrido (*scan*) a una resolución de 4 cm^{-1} de los picos más representativos de las muestras analizadas.

➤ **Microscopía Óptica**

La muestra fue colocada en una placa portaobjetos y se observó al microscopio óptico de 10 x y 40 x.

2.5.2.4 Ensayo de disolución

Para este ensayo se realizó una dilución previa de 10 μL del extracto metanólico en 25 mL de HCL 1 N y se realizó un barrido espectral en el UV – visible de esta muestra para determinar su concentración.

Se trabajó en un medio de composición establecida cuyo pH es 1 a 8. Este pH es parecido al de los líquidos gastrointestinales, para lo cual se preparó una disolución tampón a pH 2.0 según como lo indica la Real Farmacopea Española. Para realizar el ensayo respectivo se preparó un volumen de medio necesario para garantizar condiciones Sink.

Para llevar a cabo el ensayo de disolución fueron encapsulados a mano 3 mg de extracto metanólico que contenía la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* en capsulas de gelatina blanda.

Se tomó 7.5 mL de extracto metanólico que contenía la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, se evaporó el metanol y el residuo se reconstituyó con 2.25 mL de Propilenglicol al 80 %, este procedimiento fue realizado para 5 cápsulas y en cada una el volumen a colocar fue de 0.45 mL.

Una vez preparadas las cápsulas de gelatina blanda que contienen la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* y la solución tampón se realizó el ensayo en el equipo disolutor.

Durante el ensayo se mantuvieron constantes las condiciones de pH, temperatura a 37 – 38 °C, agitación 50 rpm y composición del medio. Esto se realizó para poder imitar en un momento dado el proceso de disolución en el organismo.

El ensayo tuvo una duración de 30 min. La valoración de la cantidad de principio activo disuelto, se midió tomando muestras del líquido a intervalos de tiempo predeterminados: 5, 10, 20 y 30 min.

Las muestras obtenidas fueron filtradas y se realizó la lectura de sus absorbancias en el espectrofotómetro UV- Visible.

2.5.3 DESARROLLO DE LA MATRIZ DE COMBINACIONES DE LOS ELEMENTOS QUE CONFORMAN LAS DISPERSIONES SÓLIDAS, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS *IN VITRO*.

Los polímeros hidrofílicos que se usaron como transportadores fueron:

Polímero 1: Polietilenglicol (PEG 1450)

Polímero 2: Povidona (PVP) k-30

Polímero 3: La mezcla de Polietilenglicol (PEG 1450) + Povidona (PVP) k-30

Se prepararon soluciones de polímero 1: Polietilenglicol (PEG 1450), polímero 2: Povidona (PVP) k-30 y la mezcla de polímero 1 más polímero 2 al 10 % en metanol.

Se realizaron proporciones 1:1, 1:5, 1:10 entre los polímeros y fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*. Para obtener la relación indicada en cada proporción se calculó el volumen a tomar de cada solución de polímero, sabiendo, que de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* se debía tomar 5.4 mL que contienen 10 mg de alcaloides totales expresados como harmina.

CUADRO N° 1. PREPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE VOLUMEN A TOMAR PARA CADA UNA DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS.

Polímeros		Fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>
Proporción	Volumen a tomar mL	Volumen a tomar mL
1:1	0.1	5.4
1:5	0.5	5.4
1:10	1	5.4

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

Las mezclas para obtener las dispersiones sólidas preparadas a diferentes proporciones de fracción alcaloidea y el polímero, se detallan a continuación:

CUADRO Nº 2. PREPARACIÓN DE LA MATRIZ DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS

DISPERSIONES SÓLIDAS (DS)		
Polímero 1: Polietilenglicol (PEG) + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>		
1:1	1:5	1:10
Polímero 2: Povidona (PVP) k-30 + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>		
1:1	1:5	1:10
Polímero 1: Polietilenglicol (PEG) + Polímero 2: Povidona (PVP) k-30		
7.5:2.5	5:5	2.5:7.5
Polímero 1: Polietilenglicol (PEG) + Polímero 2: Povidona (PVP) k-30 + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>		
7.5:2.5		
1:1	1:5	1:10
Polímero 1: Polietilenglicol (PEG) + Polímero 2: Povidona (PVP) k-30 + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>		
5:5		
1:1	1:5	1:10
Polímero 1: Polietilenglicol (PEG) + Polímero 2: Povidona (PVP) k-30 + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>		
2.5:7.5		
1:1	1:5	1:10

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

Una vez realizada la matriz de combinaciones que conforman las dispersiones sólidas se procedió a evaluar sus características físicas, químicas y biofarmacéuticas *in vitro*, aplicando los ensayos de la preformulación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

2.5.3.1 Ensayo de solubilidad acuosa de las DS

Se prepararon las dispersiones sólidas a las diferentes proporciones dispuestas tomando 5.4 mL de extracto metanólico, en un tubos de ensayo más los 0.1; 0.5 y 1 mL de cada una de las tres soluciones de los polímeros, se procedió a realizar una agitación por 10 min para homogenizar la fracción alcaloidea y los polímeros. Se evaporó el metanol a sequedad, después se reconstituyó el residuo con 10 mL de agua, se dejó en agitación constante a 1500 rpm tapado y protegidos de la luz por una hora y posteriormente en reposo por 48 horas.

Pasadas las 48 horas de reposo, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 50 rpm, se realizó una dilución tomando 1 mL del sobrenadante y aforándolo a 10 mL con agua. La dilución fue leída en el espectrofotómetro UV- Visible.

De los resultados obtenidos en el ensayo se escogió la dispersión sólida que presentó la mejoría más alta en su solubilidad con respecto a la solubilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

A la dispersión sólida que presentó la más alta mejoría en su solubilidad se le realizó la evaluación de sus características físicas, químicas y biofarmacéuticas mediante los ensayos de pre formulación realizadas a la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*.

2.5.3.2 Ensayo de permeabilidad de la mejor DS

Se preparó la mejor DS, se evaporo el metanol hasta 1 mL de su volumen inicial, se reconstituyó con 10 mL de agua durante agitación, el contenido se trasvaso a un embudo de separación y se añadió 10 mL se la solución de n- octanol previamente saturada, dejando en reposo por 48 horas.

Pasadas las 48 horas de reposo, la muestra fue centrifugada 10 min a 50 rpm, y se realizó la lectura del sobrenadante en el espectrofotómetro UV- Visible.

2.5.3.3 Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA) de la mejor DS

➤ IR (Infrarrojo)

En la celda de este instrumento fue colocado a mano con la ayuda de pipetas Pasteur la muestra de la mejor Dispersión Sólida

Se obtuvo un barrido (*scan*) a una resolución de 4 cm^{-1} de los picos más representativos de la muestra analizada.

➤ Microscopía Óptica de la mejor DS

La muestra de la mejor Dispersión Sólida fue colocada en una placa portaobjetos y se observó al microscopio óptico de 10 x y 40 x.

2.5.3.4 Ensayo de disolución de la mejor DS

Para llevar a cabo el ensayo de disolución fueron encapsulados a mano la preparación de la mejor DS partiendo del mismo principio que contengan 3mg de extracto metanólico de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* en cápsulas de gelatina blanda.

Se tomó 15 mL de extracto metanólico que contenía la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, en un vaso de precipitación, se añadió 3 mL de los polímeros, durante agitación constante a 1500 rpm por 15 min, el metanol fue evaporado y el residuo se reconstituyó con 4.5 mL de Propilenglicol al 80 %, este procedimiento fue realizado para 10 cápsulas y en cada una el volumen a colocar fue de 0.45 mL.

Una vez preparadas las cápsulas de gelatina blanda que contiene la mejor DS de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* con los polímeros y la solución tampón se realizó el ensayo en el equipo disolutor.

Durante el ensayo se mantuvieron constantes las condiciones de pH, temperatura a 37 – 38 °C, agitación 50 rpm y composición del medio. Esto se realizó para poder imitar en un momento dado el proceso de disolución en el organismo.

El ensayo tuvo una duración de 30 min. La valoración de la cantidad de principio activo disuelto, se midió tomando muestras del líquido a intervalos de tiempo predeterminados: 5, 10, 20 y 30 min.

Las muestras obtenidas fueron filtradas y se realizó la lectura de sus absorbancias en el espectrofotómetro UV- Visible.

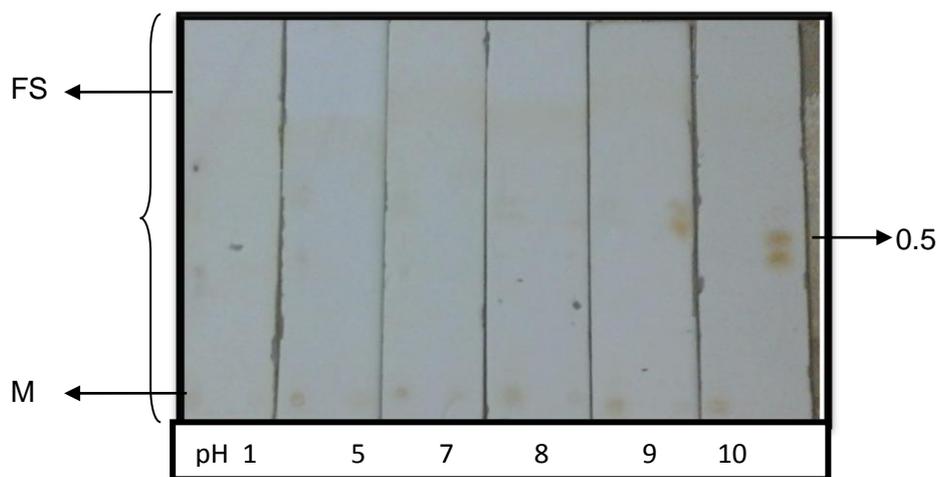
CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*.

En esta investigación la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* obtenida a escala de laboratorio y bajo los métodos empleados fue satisfactoria, dado que en este proceso se logró establecer el pH óptimo de extracción para estos componentes.

3.1.1 Determinación de los parámetros óptimos asociados al proceso de extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* a diferentes pH mediante cromatografía en capa fina (TLC).



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

FIGURA N°4. Barrido de pH

CUADRO N° 3. DATOS DEL BARRIDO DE pH MEDIANTE TLC

pH	Número de manchas observadas	Rf~ ± 2	Compuesto observado	Color	Referencia
1	1 2	0.38 0.70	Harmalina	Café	Sistema de solvente: cloroformo, acetona, dietilamina (50: 40: 10) Harmalol: Rf ~ 0.05 Harmaline: Rf~0.4 (T ₂) Harmina: Rf~ 0.45 (T ₄) Harmano: Rf~ 0.55 (T ₃)
5	1 2 3	0.44 0.66 0.73	Harmina	Café	
7	1 2 3	0.60 0.66 0.40	Harmalina	Café	
8	1 2 3	0.44 0.62 0.68	Harmina	Café	
9	1 2 3	0.44 0.61 0.72	Harmina	Café	
10	1 2 3	0.44 0.52 0.62	Harmina Harmano	Café Café	

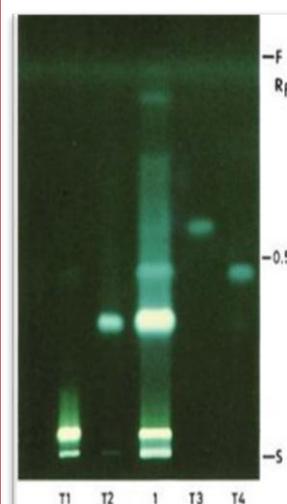


FIGURA N°5 TLC HARMINE

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

La cromatografía en capa fina (TLC) permitió la observación de las manchas características de los compuestos representativos del vegetal de *Banisteriopsis caapi*.

En la placa de pH 10 se observa dos manchas color café visiblemente claras, la primera con un Rf= a 0.44 y la segunda con un Rf= 0.52. Frente a los valores de referencia se determinó que la primera mancha corresponde al alcaloide de la harmina del vegetal de *Banisteriopsis caapi* y fue identificado a un pH de 10, siendo este pH el óptimo para su extracción.

3.1.2 Determinación cualitativa de alcaloides mediante tamizaje fitoquímico.

Las pruebas comprobatorias para la presencia de alcaloides en el extracto obtenido dieron el siguiente resultado:

CUADRO Nº 4. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUIMICO

ENSAYO	METABOLITO	RESULTADO
Prueba de Dragendorff	Alcaloides	+++
Prueba de Mayer	Alcaloides	+++

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

(+++)= Alta evidencia

(++)= Mediana evidencia

(+)= Escasa evidencia

(-)= Negativo no hay evidencia de tal metabolito

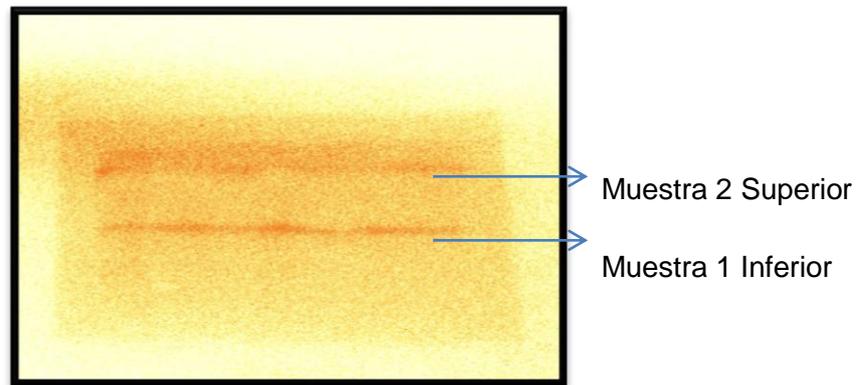
Según los resultados obtenidos en el cuadro Nº 4 se puede determinar que la presencia de alcaloides en el extracto obtenido es alta, los mismo que corresponden a los metabolitos secundarios del vegetal de *Banisteriopsis caapi* que le dan el potencial farmacológico a esta planta.

3.1.3 Identificación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* mediante cromatografía en placa preparativa.



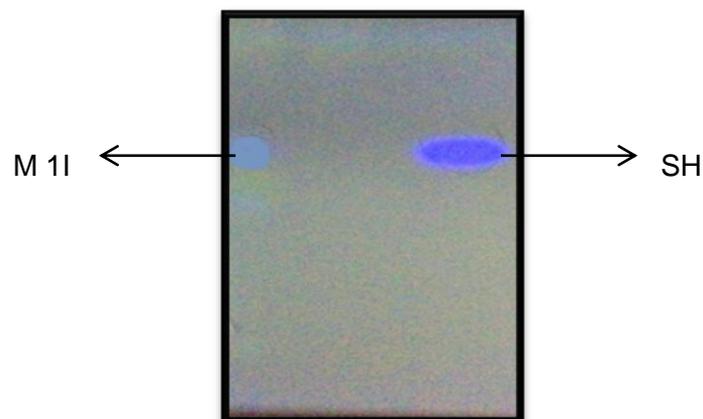
FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

FIGURA N° 6. Cromatografía en Placa preparativa



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

FIGURA N° 7. Cromatografía en Placa Preparativa Revelada



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

FIGURA N° 8. M 1 I: Muestra 1 inferior de la placa preparativa; SH: Estándar de Harmina

CUADRO N° 5. COMPARACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS MEDIANTE PLACA PREPARATIVA CON EL ESTÁNDAR DE HARMINA

Muestra	Mancha	Compuesto aislado	Color observado en la cámara UV	Rf
Muestra 1	Inferior de la placa preparativa (MI)	HARMINA	Azul fluorescente	0.46
Estándar de harmina		HARMINA	Azul fluorescente	0.46

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

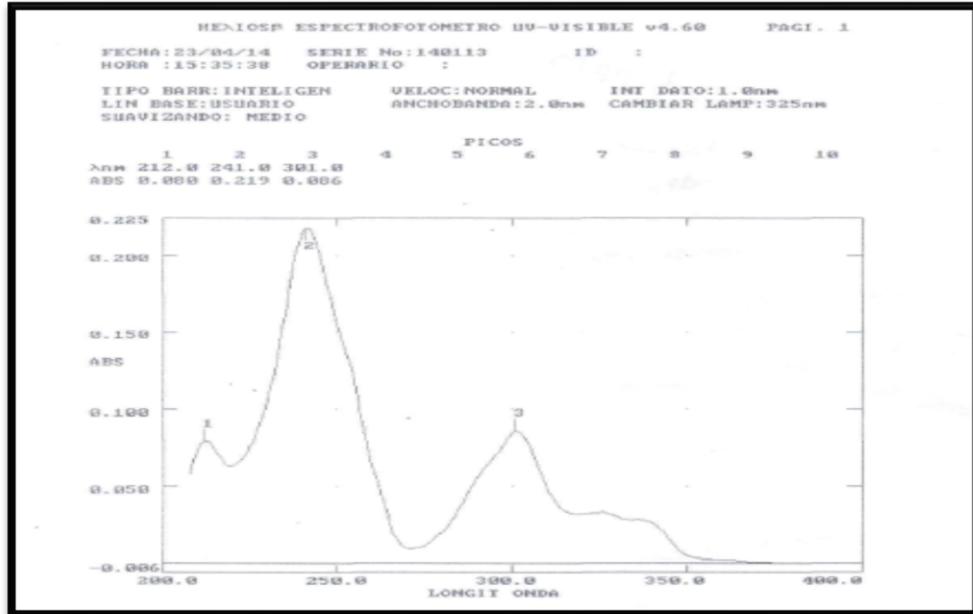
Mediante la cromatografía en placa preparativa se pudo observar que el compuesto aislado corresponde al alcaloide beta carbolínico Harmina, dado que la mancha que corresponde a la muestra 1 inferior de la placa preparativa obtenida del vegetal *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) tiene el mismo Rf 0.46 y se presenta a la misma altura que el estándar de harmina 98 % de pureza (BATCH CPC20140312).

3.1.4 Evaluación de un barrido espectral UV y elaboración de la curva de calibración de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*

En la segunda extracción realizada de manera cuantitativa se obtuvo 450 mg de alcaloides totales expresados como harmina de 50 g de vegetal de *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA). La concentración a la que se encuentra este extracto es de 1800 ppm. En concordancia con lo anterior, el porcentaje de Alcaloides Totales Expresados como Harmina corresponde al 0.9 %.

Con el fin de determinar la máxima absorción del extracto especial óptimo y el estándar de harmina entre 200 y 400 nm e identificación de su respectiva longitud de onda se determinó el espectro UV, dando los siguientes datos:

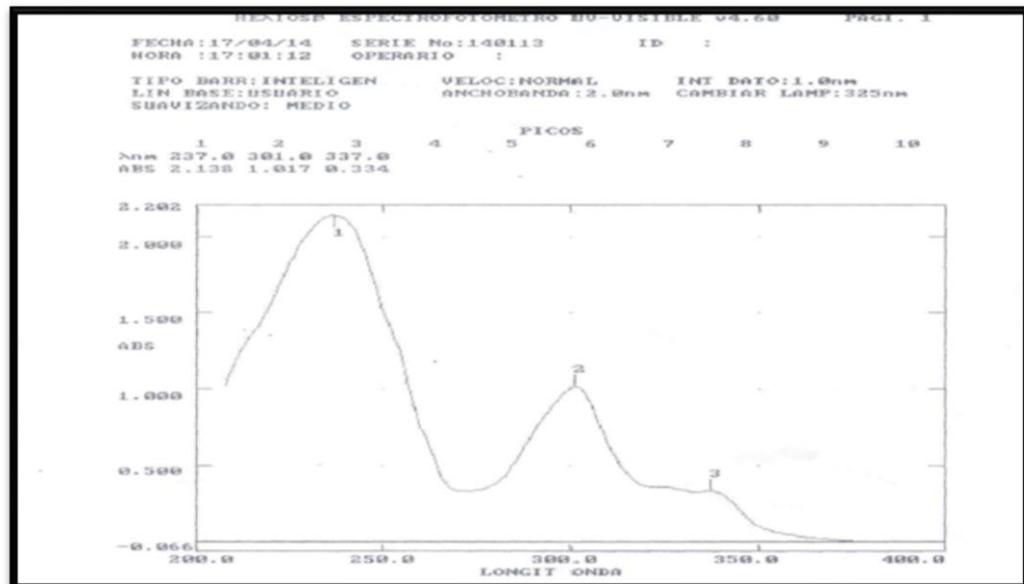
GRÁFICO Nº1. BARRIDO ESPECTRAL DEL ESTÁNDAR DE HARMINA 98 % DE PUREZA (BATCH CPC20140312). 1ppm



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En este barrido se observó 3 picos de absorción a 212.0, 241.0 y 301.0 nm respectivamente, de la región 301,0 nm en adelante no presenta ningún pico.

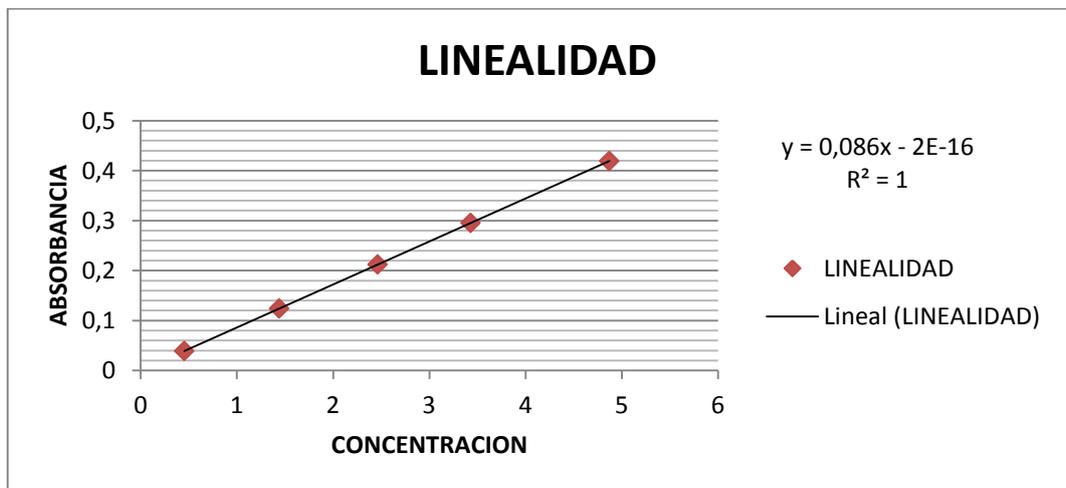
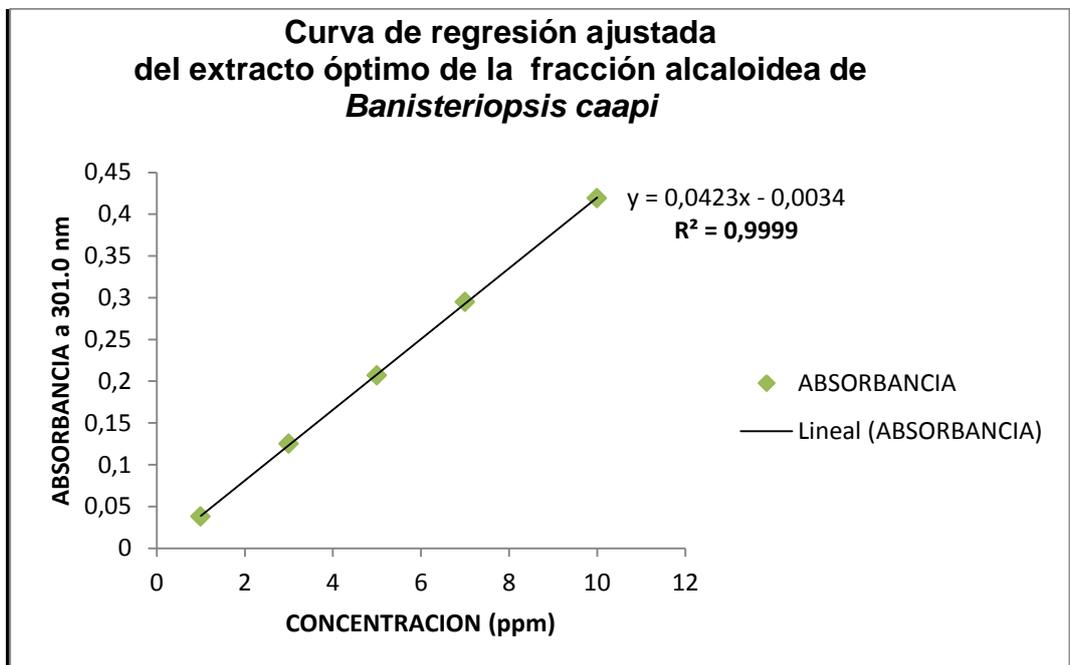
GRÁFICO Nº 2. BARRIDO ESPECTRAL DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En el gráfico N° 2 se identificaron tres picos de absorción a 237.0, 301.0 y 337.0 nm respectivamente, de la región 337.0 nm en adelante no presenta ningún pico. Siendo el pico de absorción a 301.0 nm el pico característico que está presente tanto en el estándar como en el extracto óptimo obtenido a escala de laboratorio. La longitud de onda predeterminada para realizar la curva de calibración fue de 301.0 nm.

GRÁFICO N° 3. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



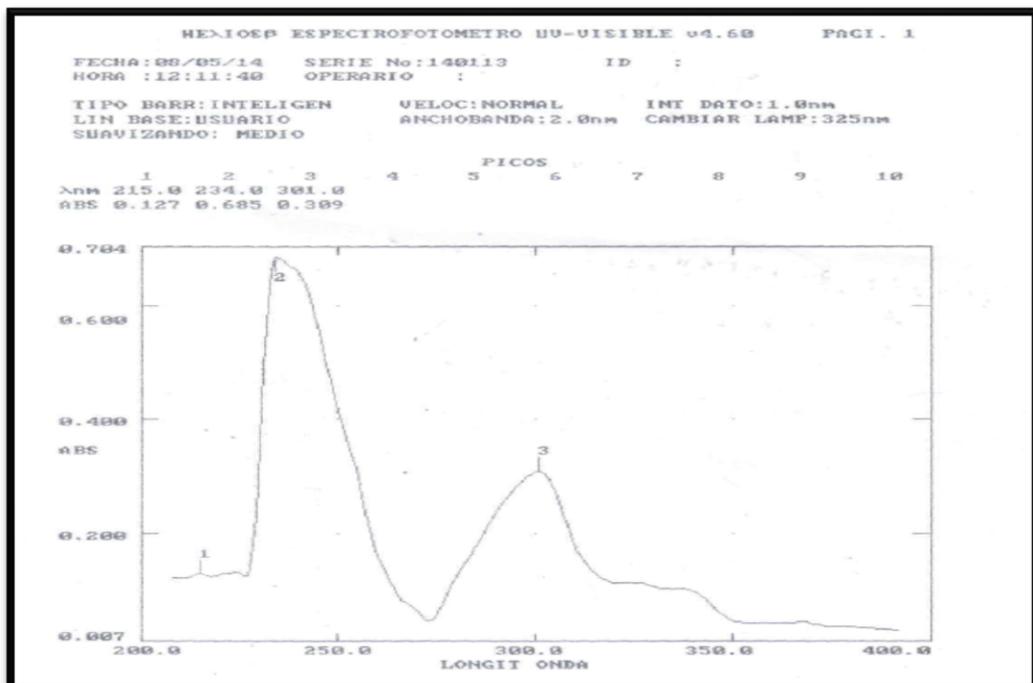
FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En el gráfico N° 3 de la curva de calibración podemos observar una línea recta, que posee una correspondencia directamente proporcional entre la concentración y la absorbancia. El grado de coeficiente de correlación es de $R^2 = 0.9999$ lo que nos indica que este método nos permite la cuantificación de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* en los rangos entre 1 y 100 ppm.

3.2 REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*, MEDIANTE ENSAYOS DE SOLUBILIDAD ACUOSA, PERMEABILIDAD, PROPIEDADES AL ESTADO SÓLIDO (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA), Y ENSAYO DE DISOLUCIÓN.

Se realizó una tercera extracción de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, su concentración fue determinada en la ecuación obtenida en la curva de calibración.

GRÁFICO N° 4 BARRIDO ESPECTRAL DEL TERCER EXTRACTO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En el gráfico N° 5 se observa el pico representativo que se mantiene en 301.0 nm con una absorción de 0.309. Los datos obtenidos fueron reemplazados en la ecuación de la curva de calibración permitieron obtener la concentración a la que se encuentra este tercer extracto.

Longitud de onda: 301.0

Absorbancia: 0.309

Y: Absorbancia

X: concentración

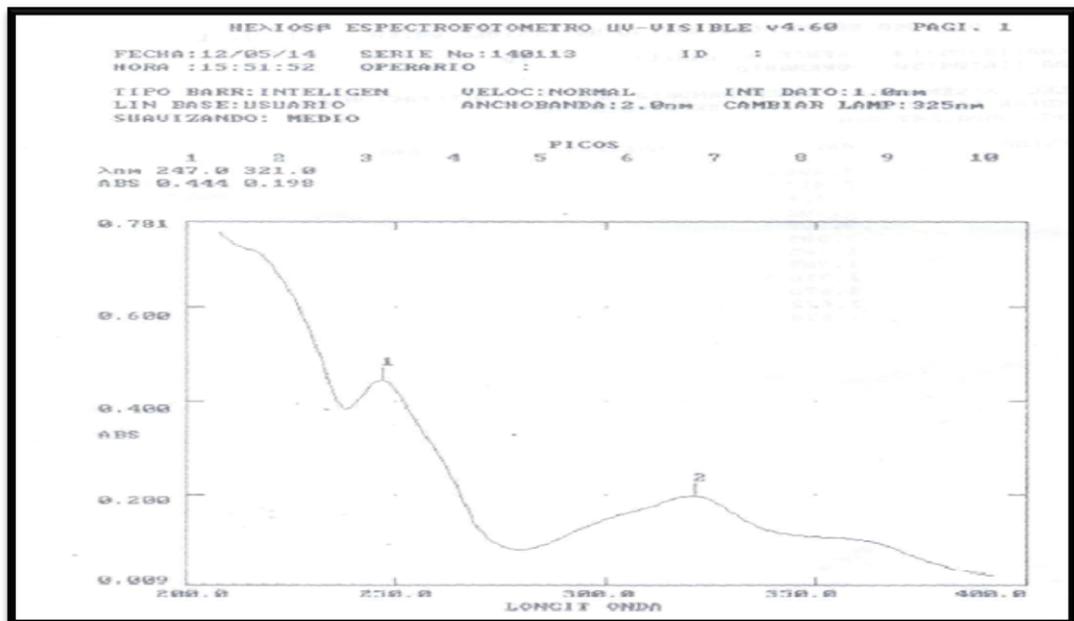
Ecuación: $y = 0.0423x - 0.0034$

X= 1846.3356 ppm

La concentración del tercer extracto que fue utilizado en los estudios de preformulación fue de 1846.3356 ppm.

Previo a los ensayos de preformulación se realizó la lectura espectral en el UV de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* en agua dando los siguientes resultados:

GRÁFICO N °5 BARRIDO ESPECTRAL DEL TERCER EXTRACTO DE la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* EN AGUA



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En el gráfico N°6 se observa el pico característico a 321nm con una Absorbancia de 0.198, estos datos fueron tomados como datos estándar. El pico representativo tuvo un desplazamiento batocrómico debido a que el medio en el que se encuentra la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* es agua.

3.2.1 Ensayo de solubilidad acuosa

CUADRO N° 6 DATOS DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD

Concentración del estándar:	7, 3852x10 ⁻³ mg/mL
Absorbancia del estándar:	0,198
Concentración de la muestra	7, 4224 x10 ⁻³ mg/mL
Absorbancia de la muestra:	0,199
Concentración práctica de la solubilidad:	0, 074224 mg/ mL
Concentración teórica:	1,99 mg / mL
% de solubilidad	3, 729 %

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

Tan sólo el **3, 729 %** de la **facción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*** (AT expresados como harmina) se disuelve en agua por cada mg de principio activo.

Lo que indica la pobre solubilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* en agua. Con esta baja solubilidad este principio activo en una fórmula farmacéutica oral tendría problemas en su biodisponibilidad lo que afectaría a la efectividad de la misma.

3.2.2 Ensayo de permeabilidad

CUADRO N° 7. DATOS DEL ENSAYO DE PERMEABILIDAD

Concentración del estándar:	7, 3852x10 ⁻³ mg/MI
Absorbancia del estándar:	0,198
Concentración en fase acuosa	6, 448 x10 ⁻³ mg/MI
Absorbancia de la muestra:	0,173
Concentración en fase oleosa	1, 6196 mg / mL
Coefficiente de reparto (P)	251, 1789
Logaritmo de permeabilidad (Log P)	2, 4
Log P(octanol/water), teórico de la Harmina	3.6

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

De los resultados obtenidos a escala de laboratorio se puede definir que la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (AT expresados como harmina) posee una permeabilidad de 2.4 con referencia al dato teórico de 3.6. La permeabilidad obtenida es alta por lo que el principio activo muestra un carácter a fin a la lipofilidad. Esto permite que el fármaco tenga una alta distribución en el organismo pudiendo concentrarse en medio lipófilos durante más tiempo del indicado tendiendo la posibilidad de llegar ser tóxicos.

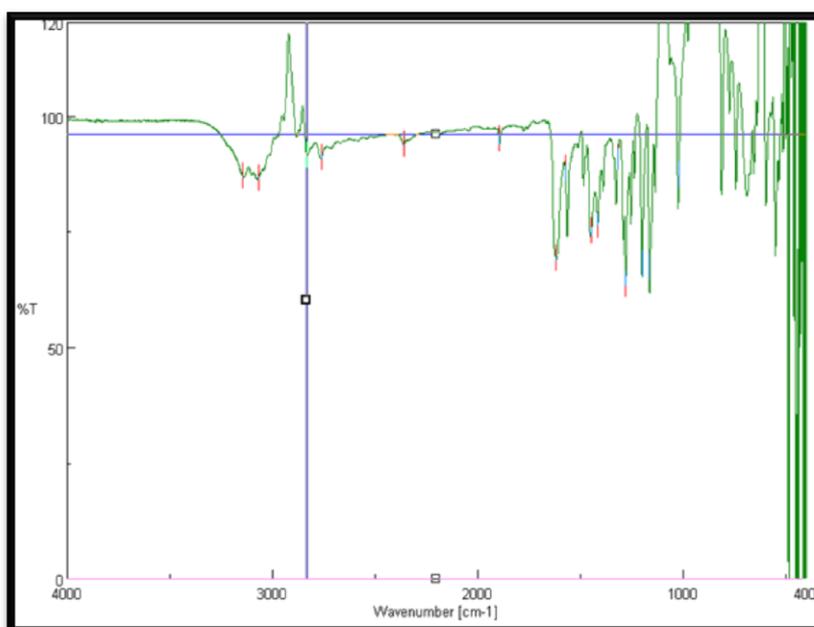
De los datos de solubilidad y permeabilidad obtenidos de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* se puede justificar a escala de laboratorio que el principio activo más relevante que es la harmina está dentro de la clase número II del sistema de clasificación biofarmacéutica: “Clase II: baja solubilidad y alta permeabilidad”

3.2.3 Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA)

➤ IR (Infrarrojo)

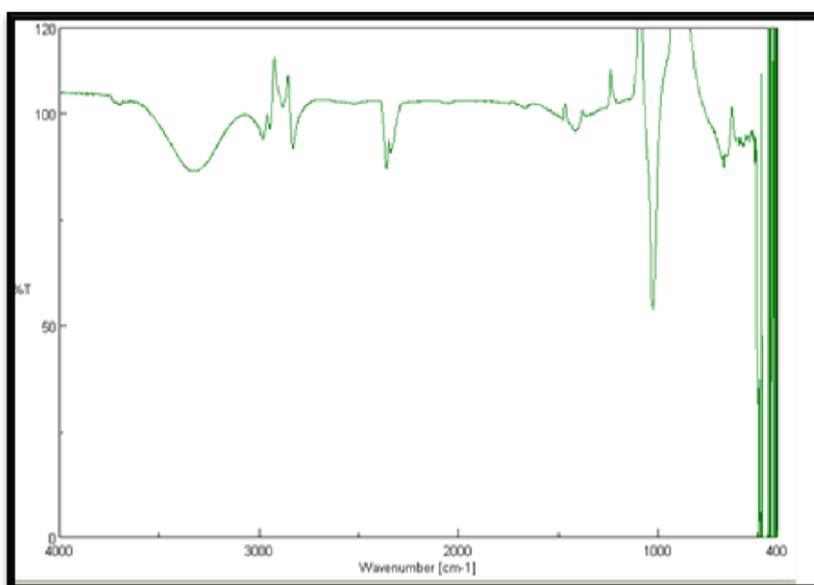
GRÁFICO N° 6. ESPECTRO INFRARROJO DE ESTÁNDAR DE HARMINA Y DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi* (AT EXPRESADOS COMO HARMINA).

ESTÁNDAR DE HARMINA



Wavenum...	%T
3145.33	86.8196
3067.23	86.5575
2832.92	91.5352
2759.64	90.9871
2358.52	93.7331
1895.68	94.9406
1618.95	69.1209
1572.66	88.5362
1447.31	75.1056
1415.49	76.3695
1317.14	90.9813
1280.5	63.5939
1197.58	67.9171
1165.76	67.4132
1020.16	87.1435

FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi* (AT EXPRESADOS COMO HARMINA.)



Wavenum...	%T
2978.52	94.0504
2942.84	96.3924
2880.17	101.36
2832.92	92.0935
2358.52	86.8252
2332.48	91.5136
1478.17	98.2078
1415.49	95.6099
1020.16	56.0451
671.106	88.1621

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En el gráfico N° 6 se observan los picos de absorción en el espectro infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} , para el estándar de harmina y la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (AT expresados como harmina) se identifican los siguientes picos representativos de los siguientes grupos funcionales: Éter: 1020.16, Anillo aromático: 1576.66, Ciclopentano: 1618.95, Indol: 3300, Imina: 2358. cm^{-1}

➤ **MICROSCOPIA ÓPTICA**

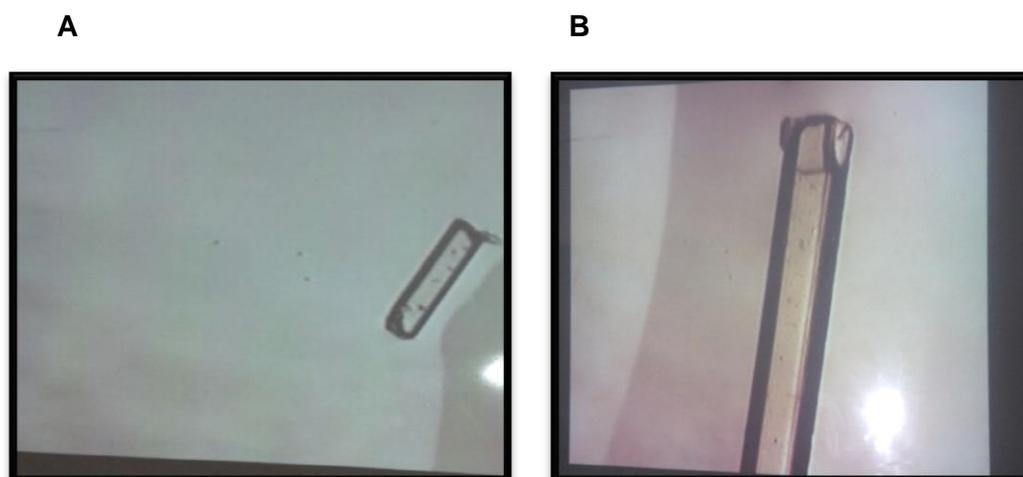
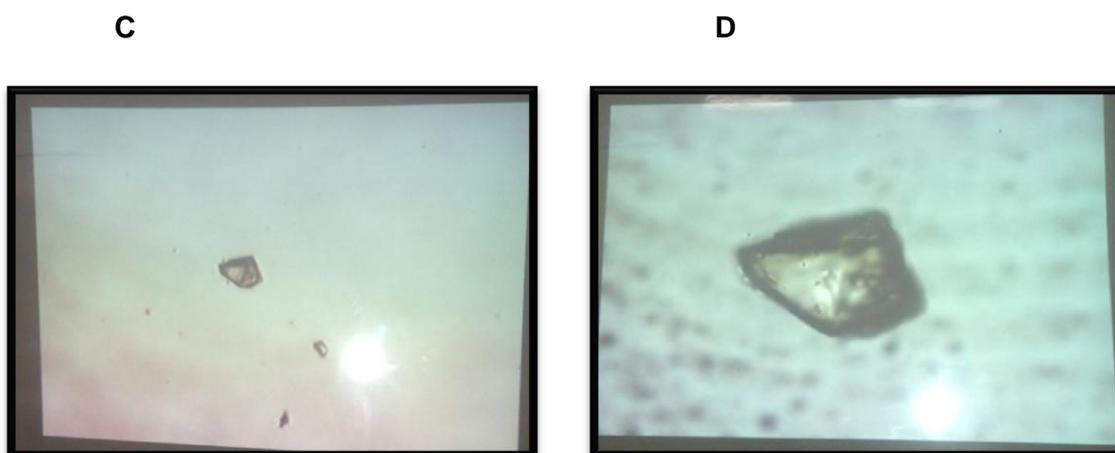


FIGURA N° 9. A: Estándar de harmina visto al microscopio óptico con lente de 10x

B: Estándar de harmina visto al microscopio óptico con lente de 40x



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

FIGURA N°10. C: Alcaloides totales expresados como Harmina visto al microscopio óptico con lente de 10X

D: Alcaloides totales expresados como Harmina visto al microscopio óptico con lente de 40X

En la figura N° 9 el estándar de harmina presenta unos cristales gran tamaño tanto en el lente de 10 X como el de 40 X se puede observar que los cristales están incluso fuera del campo de observación por su gran tamaño.

En la figura N° 10 se observan los alcaloides totales expresados como harmina con una característica similar al estándar, sus cristales son de gran tamaño tanto al lente de 10 como de 40 X.

Las partículas tanto del estándar de harmina como de los AT expresados como harmina poseen una birrefringencia cristalina que es una característica de luminosidad debido a su gran tamaño.

3.3 DESARROLLO DE LA MATRIZ DE COMBINACIONES DE LOS ELEMENTOS QUE CONFORMAN LAS DISPERSIONES SÓLIDAS, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS *IN VITRO*.

Antes de realizar los ensayos se les realizó un barrido espectral a los polímeros en evidencia que sus picos representativos no interfieran con el principio activo. (Ver anexo 2)

3.3.1 Ensayo de solubilidad acuosa de las DS

CUADRO N° 8. DATOS DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS

DISPERSIÓN SÓLIDA	% DE SOLUBILIDAD
PEG + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	
1:1	3.036
1:5	3.71
1:10	5.77
PVP k-30 + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	
1:1	7.23
1:5	13.08
1:10	12.24
PEG + PVP k 30 (7,5: 2, 5) + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	
1:1	10.46
1:5	10.38
1:10	11.60
PEG + PVP k 30 (5: 5) + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	
1:1	11.17
1:5	13.34
1:10	11.11
PEG + PVP k 30 (2, 5: 7,5) + fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	
1:1	4.94
1:5	11.22
1:10	*16.65

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

➤ **TEST ESTADÍSTICO: ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR, TUKEY HSD AL 95% DE CONFIANZA**

CUADRO N° 9. RESUMEN DEL TEST ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD APLICADO A LAS 15 DISPERSIONES REALIZADAS.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
DS 1	3	0,488	0,16266667	3,3333E-07
DS 2	3	0,595	0,19833333	3,3333E-07
DS 3	3	0,924	0,308	0
DS 4	3	1,158	0,386	0,000001
DS 5	3	2,094	0,698	0
DS 6	3	1,96	0,65333333	4,9333E-05
DS 7	3	1,675	0,55833333	2,3333E-06
DS 8	3	1,663	0,55433333	9,3333E-06
DS 9	3	1,858	0,61933333	3,6333E-05
DS 10	3	1,788	0,596	0
DS 11	3	2,137	0,71233333	3,3333E-07
DS 12	3	1,792	0,59733333	3,3333E-07
DS 13	3	0,792	0,264	0,000001
DS 14	3	1,797	0,599	0
DS 15	3	2,666	0,88866667	3,3333E-07

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,837419244	14	0,131244232	19491,71759	2,2422E-55	2,03742044
Dentro de los grupos	0,000202	30	6,73333E-06			
						p-valor
						0.0003E-51
Total	1,837621244	44				

FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

En el cuadro N° 8 se puede observar que a partir de la segunda dispersión sólida existe una mejoría en la solubilidad, lo que indica que el método desarrollado puede ser aplicado para mejorar esta característica de fármacos pocos solubles en agua.

La mejor dispersión sólida obtenida fue la combinación de **PEG 1450 + PVP k 30 (2, 5: 7,5) más la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*** en la proporción 1: 10. El porcentaje de solubilidad fue de 16.65 % .

En el test estadístico análisis de varianza de un factor indica que todas las muestras son diferentes y la DS número 15 es la que presenta la mayor media con una desviación estándar de 0.00057735 por lo que es considerada la mejor DS y presenta el mejor porcentaje de solubilidad mejorada.

Estadísticamente la DS 15 es superior con un valor de p - valor =0.0003x10⁻⁵¹ frente a la solubilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* y a las demás DS

A la mejor DS obtenida se le realizaron estudios de compatibilidad y características biofarmacéuticas para evaluar su efectividad e interacción entre los polímeros y el principio activo y un barrido espectral UV. (Ver anexo 3)

3.3.2 Ensayo de permeabilidad a la mejor DS

CUADRO N° 10. DATOS DEL ENSAYO DE PERMEABILIDAD REALIZADO A LA MEJOR DS.

Concentración del estándar:	7.3852x10 ⁻³ mg/mL
Absorbancia del estándar:	0.198
Concentración en fase acuosa	0.0213 x10 ⁻³ mg/mL
Absorbancia de la muestra:	0.537
Concentración en fase oleosa	0.9757 mg / mL
Coefficiente de reparto (P)	45.807
Logaritmo de permeabilidad (Log P) de la mejor DS	1.66
Logaritmo de permeabilidad (Log P) fracción alcaloidea de <i>Banisteriopsis caapi</i>	2.4
Log P(octanol/water), teórico de la harmina	3.6

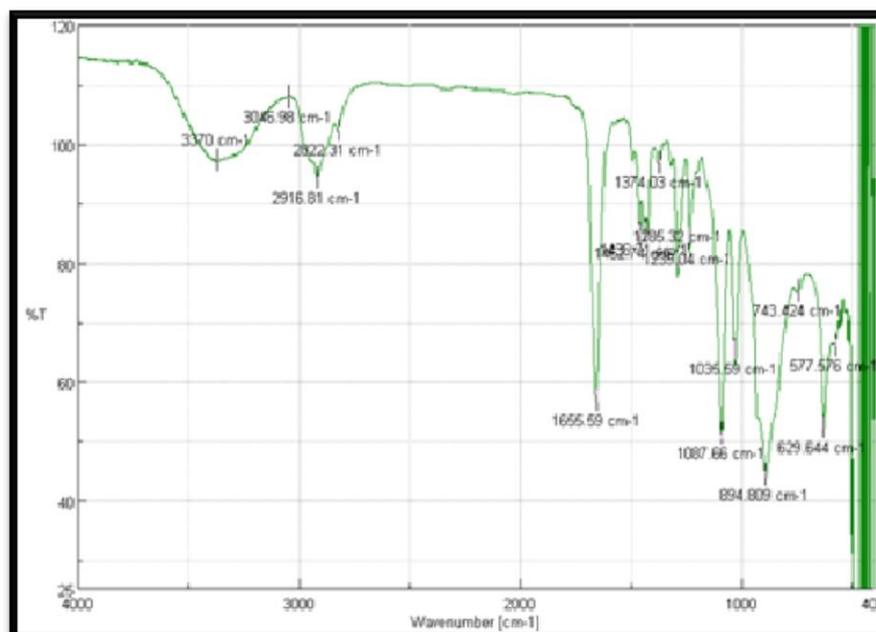
FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

De los resultados obtenidos al realizar este ensayo se puede definir que la mejor DS posee una permeabilidad de 1.6, resultado que es mayor a 1 pero menor al valor de la permeabilidad de la **facción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi***, esto se debe a que en las DS se ha mejorado la solubilidad y con ello la permeabilidad disminuyó pero no se ve comprometida de tal manera que pierda su acción en el organismo.

3.3.3 Propiedades al estado sólido (IR, MICROSCOPIA ÓPTICA) de la mejor DS

➤ IR DE LA MEJOR DS

GRÁFICO N° 7. ESPECTRO INFRARROJO DE LA MEJOR DS



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

El espectro infrarrojo de la mejor DS presenta picos de absorción entre 400 a 4000 cm^{-1} . En el gráfico N° 9 se distinguen los siguientes picos representativos: Éter: 1020.16, Anillo aromático: 1576.66, Ciclopentano: 1618.95, Indol: 3300, Imina: 2358. cm^{-1}

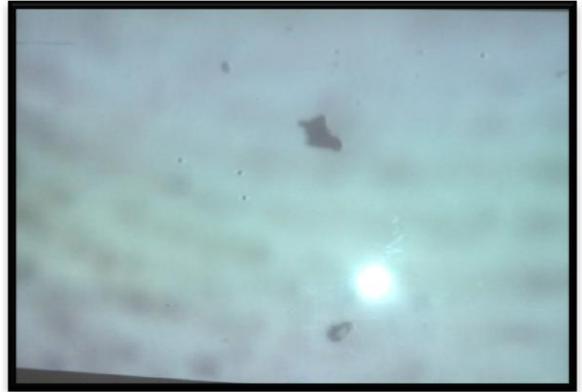
La espectroscopia IR permite determinar la interacción entre los polímeros y el principio activo utilizados en la realización de las DS, con ello se puede establecer que no existe cambios o pérdida de los espectros infrarrojos del principio activo. (Ver anexo 4)

➤ MICROSCOPIA OPTICA DE LA MEJOR DS

E



F



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

FIGURA N° 11. E: Mejor DS vista al microscopio óptico con el lente de 10 X

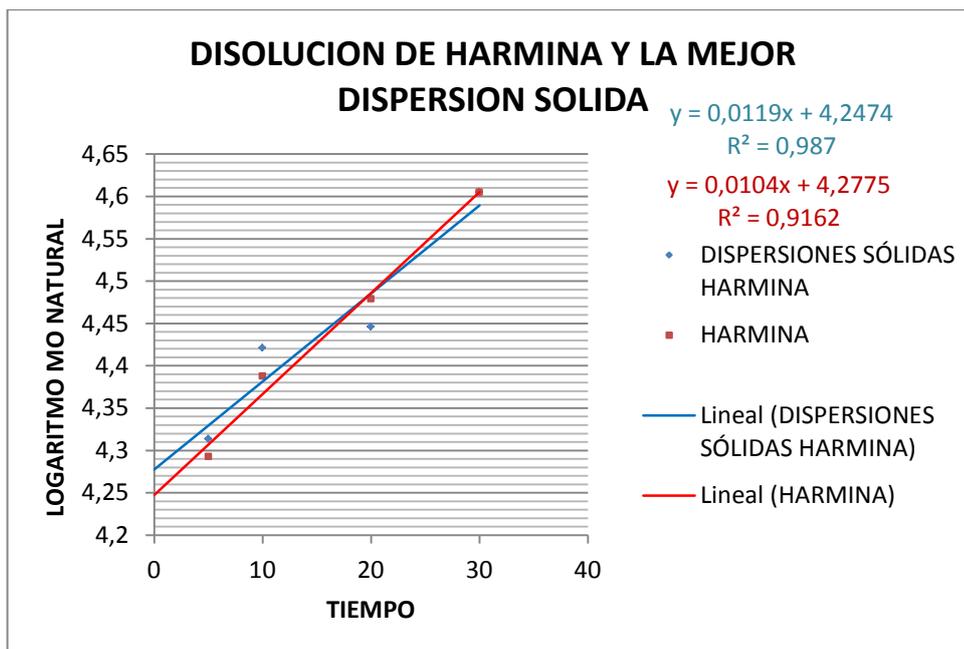
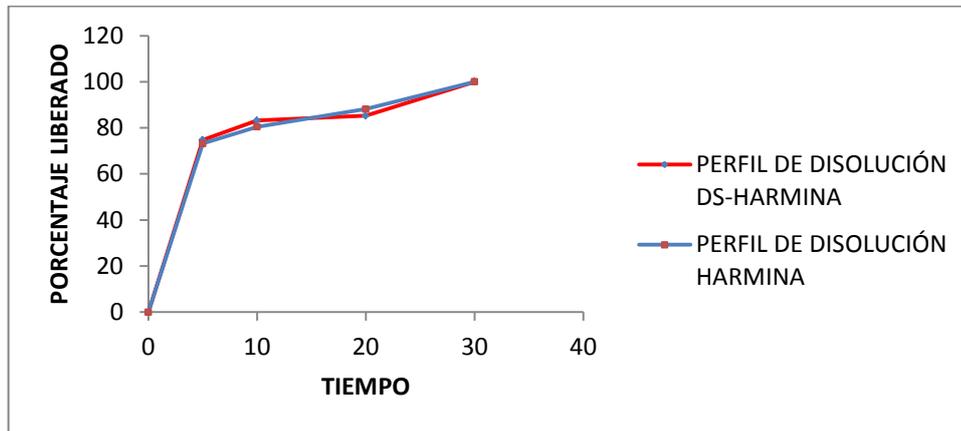
F: Mejor DS vista al microscopio óptico con el lente de 40 X

En la figura N°10 se puede observar la presencia de cristales pero en referencia a los cristales del estándar de harmina y la **fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*** los cristales de la mejor DS son de menor tamaño y amorfos.

El cambio en su morfología es provocado por la disminución del tamaño de sus partículas debido al uso de polímeros hidrofílicos, que mejoran la solubilidad del principio activo. Produciendo un aumento en la velocidad de disolución y por tanto una mayor absorción oral y biodisponibilidad del fármaco.

3.3.4 Ensayo de disolución de la mejor DS

GRÁFICO N° 8 ENSAYO DE DISOLUCION APLICADO A LA MEJOR DS Y A LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi* (AT EXPRESADOS COMO HARMINA.)



FUENTE: RODRIGUEZ V, 2014 ESPOCH

Factor de similitud F2= 83.4196828

El factor de similitud F2 permite comparar el perfil de disolución de dos muestras.

Para la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (AT expresados como harmina.) como muestra de referencia frente a la mejor DS como la muestra de prueba el factor de similitud F2 es de 83.41 un valor mayor a 50 lo que quiere decir que los perfiles de disolución *in vitro* de estas dos muestras son iguales.

Por otro lado, el perfil de disolución de la mejor DS presenta un 13 % de mejoría frente al perfil de disolución de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (AT expresados como harmina.) al comparar sus pendientes.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. El extracto óptimo de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (AT expresados como harmina) obtenido a escala de laboratorio fue caracterizado fitoquímica y cromatográficamente con referencia al estándar de harmina adquirido concluyendo que no se observan diferencias significativas.
2. Los estudios de preformulación realizados a la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, permitieron determinar que la misma pertenece a la clase II de la Clasificación Biofarmacéutica: “baja solubilidad y alta permeabilidad”, características que influirían para que su biodisponibilidad se vea afectada en un forma farmacéutica oral.
3. El desarrollo de las dispersiones sólidas, que contienen a la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* y los polímeros en diferentes proporciones obtenidas no presentaron interferencia entre sus componentes, obteniéndose una DS con una solubilidad superior a las demás y al principio activo puro.
4. La mejor dispersión sólida tiene partículas de menor tamaño y presentan estructura polimorfa lo que favorece de forma evidente a mejorar la solubilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, las partículas de la mejor DS tienen una mayor superficie específica y en consecuencia presentan una mayor velocidad de disolución.
5. Al mejorar la solubilidad de la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*, mediante el desarrollo de dispersiones sólidas concluimos que el método aplicado es una alternativa muy eficiente en tecnología farmacéutica para mejorar la biodisponibilidad de compuestos poco solubles, provocando la disminución de la dimensión de las partículas, un incremento en la humectabilidad de las mismas y una menor energía de activación para su liberación.

6. Las dispersiones sólidas formadas al entrar en contacto con los líquidos del organismo, permiten que la matriz se disuelva muy rápido y libere al principio activo de forma molecular, asegurando una mayor absorción y mejorando su biodisponibilidad.

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere la realización de más investigaciones para la elucidación estructural de los compuestos determinados mediante TLC de los que no se encontró datos de Rf en la bibliografía, mediante la espectrometría de masas y RMN.
2. Evaluar la eficacia farmacológica de la mejor dispersión sólida frente a la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* (AT expresados como harmina).
3. Desarrollar un fitomedicamento que contenga el principio activo del vegetal de *Banisteriopsis caapi*, ya que posee propiedades farmacológicas muy importantes que podrían ayudar a minimizar trastornos neurodegenerativos.
4. Realizar otras combinaciones en la elaboración de las dispersiones sólidas con la utilización de nuevos polímeros y determinar sus características biofarmacéuticas para determinar su efectividad.
5. Sugerir el desarrollo de dispersiones sólidas para mejorar la solubilidad de principios activos poco solubles como un método muy favorable en tecnología farmacéutica.
6. La fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi* presenta alta fluorescencia por lo que se recomienda que se utilice en estudios para la realización de foto protectores.

BIBLIOGRAFIA

AIRAKASINEN, M., KARI, I. Medical Biology. 2^oed, Florida - USA. Trademark Notice. 1981, Pp 21-34.

https://www.google.com.ec/?gfe_rd=cr&ei=fJnfU_PKBcnzgATSxIC4Dw&gws_rd
2014/02/12

ALZUGARAY, D., ALZUGARAY, C. Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Ayahuasca, Sao Paulo - Brasil. Tres. 1984, Pp 245.

AMIDON, G. "A Theoretical Basis For a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability". (Pharmaceutical Research), Vol.12., N^o 3. (USA), Pp 413-420. Marzo 1995.

<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1016212804288>
2014/02/12

ANCÍN-AZPILICUETA, C., ARÁN, V.J., GONZÁLEZ, D. " β -Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO)". (Food and Chemical Toxicology), Vol. 48., N^o 3. (Madrid-España), Pp. **839–845**. March 2010

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509006012>
2014/02/12

AULTON, M. Farmacia La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2^o ed, Madrid- España. Elsevier. 2004, Pp 15-23.

<http://books.google.com.ec/books/about/Farmacia.html?id=r5k1fvgCi7IC>
2014/02/12

AVENDAÑO, C. Introducción a la Química Farmacéutica. Metabolismo de fármacos. 2^aed, Madrid - España. McGraw-Hill. 2001, Pp. 143-148.

AYALA, C., & BRUNETTO, M. "Determination of atenolol in pharmaceutical dosages by Fourier transform infrared spectrometry (FTIR)". (Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia), Vol.32., N^o 3. (Maracaibo-Venezuela), Pp 169. Diciembre 2009

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025407702009000300007&lng=en&nrm=iso&ignore=.html
2014/02/12

BASELT, R. C. Clark's Analysis of Drugs and Poisons. Chicago- USA. Universidad de California. 2004, Pp 29.

BERZELIUS, J. Tratado de Química: Animal, Mineral y Vegetal. 2ª ed, Madrid-España. Salón del Prado. 1881, Pp 444-458.

http://books.google.com.ec/books/about/Tratado_de_qu%C3%ADmica.html?id=hDKyRTBAxy4C

2014/02/12

BRUNETON, J. Fitoquímica Plantas Medicinales. 2º ed, Zaragoza- España. ACRIBIA. 2001, Pp. 793-812.

CADÓRNIGA, R. Fundamentos de Farmacología Clínica. 2º ed, Madrid-España. Reverté. 1983, Pp. 6-31.

<http://books.google.com.ec/books?id=9LI5uBecRQQC&pg=PA45&dq=CAD%C3%93RNIGA>

2014/02/12

CHIOU, W., & RIEGELMAN, S. "Pharmaceutical applications of solid dispersion systems". (Journal of Pharmaceutical Sciences), Vol. 60., Nº 3. (USA), Pp. 1281–1302, September 1971.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.2600600902/full>

2014/02/12

CUATRECASAS, J. "Estructura y composición florística de tres robledales en la región norte de la cordillera central de Colombia". (Revista de Biología Tropical), Vol. 57., Nº 4. (Medellín-Colombia), Pp 343-364. Diciembre. 2009

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442009000400020&script=sci_arttext

2014/02/12

DALTON, D. The Fundamental Chemistry. New York- USA. Dekker. 1979, Pp 123.

<http://www.iberlibro.com/Alkaloids-fundamental-chemistry-biogenetic-approach-Dalton/7862628277/bd>

2014/02/13

DE LA CUBA, A. "Inhibidores de la Monoaminoxidasa en tratamientos de la depresión". (Revista de Neuro-Psiquiatría), Vol. 57., Nº 2. (Perú), Pp 123-128. 1994-

<http://www.upch.edu.pe/famed/revista/index.php/RNP/article/view/1089/1102>

2014/02/13

FARZIN D, M. N. "Antidepressant-like effect of harmaline and other beta-carbolines in the mouse forced swim test" (European Neuropsychopharmacology), Vol. 16., Nº 5. (España), Pp. 324-328. Julio 2006.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X05001379>

2014/02/13

FERNÁNDEZ, R., CREHUET NAVAJAS, M., & FAROUK, A. Epidemiología de las enfermedades neurodegenerativas medicina preventiva y salud pública. 11ª ed, Elsevier Masson. arcelona – España. 1992, Pp. 897-906.

<http://media.axon.es/pdf/68463.pdf>

2014/02/13

FREIFELDER, D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona-España Reverté. 2003, Pp. 21-50.

http://books.google.com.ec/books?id=iW0yHGmEJwC&printsec=frontcover&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

2014/02/13

FRITSCH, J. Untersuchungen über die Samen von *Peganum Harmala*. (Journal für Praktische Chemie), Vol. 86., Nº 1. (USA), Pp. 100–110. 1862. 8 Noviembre 2004.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prac.18620860118/abstract>

2014/02/13

GONZÁLEZ, J., & ORTEGA, F. Action of neuroleptics in the serum M.A.O. of the rat. (Action of neuroleptics in the serum M.A.O. of the rat), Vol. 6., Nº 1. (España), Pp. 377.

Jul-Aug 1978.

<http://www.biomedsearch.com/nih/Action-neuroleptics-in-serum-MAO/31764.html>

2014/02/13

GUIADAGER, N. Uso de polímeros para mejorar la solubilidad de fármacos escasamente solubles. (Pharmaceutical Technology en Español), Vol. 7., Nº 4. (DF-México), Pp 4. Septiembre - Octubre 2009

http://www.pharmatechespanol.com.mx/articulo/24.uso_de_polimeros_para_mejorar_la_solubilidad_de_farmacos_escasamente_solubles

2014/02/13

GUISADO, E., GIL, M., CAMACHO, M., & TORRES, A. Estudio de la solubilidad en medio acuoso. (Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica). (Madrid- España, Pp. 161-164. 2002

http://www.sefig.org/doc/Congreso%20Granada/TF/042_TF.pdf

2014/02/13

HARTSTRA, J., FRANKE, J., & A DE ZEEUW, R. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Chicago- USA. Universidad de California. 1992, Pp 38.

LE-NGOC VO, C., PARK, C., & JIN LEE, B. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics), Vol. 85., Nº 3. (España), Pp. 799–813. Abril 2013.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641113003007>
2014/02/13

NARANJO, P. "Ayahuasca". Religión y medicina. Quito- Ecuador. Universitaria. 1970, Pp. 37.

OTT, J. Pharmacotheon Drogas Enteogénicas, sus Fuentes Vegetales y su Historia. DF- México. La liebre de Marzo. 2004. Pp 142-144.

http://catbull.com/alamut/Bibliothek/1997_ott_7105_1.pdf
2014/02/13

PÉREZ, D.C., GUEVARA, C.C., CÁRDENAS, C.A., PINZÓN, J.A., BARBOSA, H.J., MARTÍNEZ, F. Solubilidad y volúmenes de desplazamiento del acetaminofén en mezclas binarias formadas por agua, etanol y propilenglicol a 25.0 °C. (Rev. Col. Cienc. Quím. Farm), Vol. 32., Nº 2. (Bogotá-Colombia), Pp. 116-136. Noviembre 2003.

<http://www.bdigital.unal.edu.co/13948/1/1668-7514-1-PB.pdf>
2014/02/14

POTTA, S., MINEMI, G., NUKALA, S., PEINADO, C. Preparation and characterization of ibuprofen solid lipid nanoparticles with enhanced solubility. (Journal of Microencapsulation), Vol. 28., Nº 1. (España), Pp 634-640. Diciembre 2011.

<http://lib.kums.ac.ir/documents/10129/39807/J-555-Feb-1.pdf>
2014/02/14

RICHARD A., CLARK, L. Farmacología. 4.º ed, Boston-USA. Boston Globe. 2002. Pp 322-337.

<http://es.scribd.com/doc/63835712/PPT-Finkel-Cap-01>
2014/02/14

ROBERTS, M., & WINK, M. Alkaloids. Biochemistry, Ecology. Medicinal Applications. New York- EEUU. Plenum Press. 1998, Pp. 435.

[MF Roberts, M Wink - 1998 - books.google.com](http://books.google.com)
2014/02/14

RODD, R. Diario de drogas psicoactivas. Reevaluación de la Cultural y Significado psicofarmacológico de Banisteriopsis caapi : Preparación, clasificación y uso entre los Piaroa del sur de Venezuela, 40(3), (Septiembre de 2008). Pp. 301-307.

http://www.who.int/substance_abuse/publications/neuroscience_spanish.pdf
2014/02/14

RODRÍGUEZ CAVALLINI, E., GAMBOA, M., HERNANDEZ, F., & GARCÍA, J. Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2005, Pp. 57.

<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=JUIGA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000876>

2014/02/16

SÁEZ, V., HERNÁNDEZ, E., & LÓPEZ, L. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales poliméricos. (Revista Iberoamericana de Polímeros), Vol. 5, N° 1. (España), Pp. 118. Abril 2003.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000258&pid=S01205609200800010000700098&lng=en

2014/02/16

SCHOULTES, R. Science. Malpighiaceae "The beta-Carboline Hallucinogens of South America". (Journal of Psychoactive Drugs), Vol. 14, No. 3. (USA), Pp. 205-220. Jul.-Sep 1982.

<http://catbull.com/alamut/Bibliothek/7725docid6838.pdf>

2014/02/16

SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá-Colombia. CAB. 2000 . Pp. 71-82.

SHEVALE PANKAJ, A., & JADHAV PRAKASH, D. Solid Dispersion Poorly soluble drug. (Internacional Journal of Farmaceutical Research and BIO-SCIENCE), Vol. 2., N° 3. (USA), Pp. 114-143. Mayo 2013

<http://www.ijprbs.com/issuedocs/2013/6/IJPRBS%20333.pdf>

2014/02/16

SPRUCE, R. "Notes of Botanist on the Amazon and Andes". London. Mac Millan. 1851, Pp. 37-58.

<https://docs.google.com/document/d/1q3ZOnnU5I7YCR4sYpb1BIKtVe2iDj7db1ZBbA0d1GNE/preview?pli=1>

2014/02/16

TAIZ, L., ZEIGER, E. Fisiología vegetal. 3ªed, Castellón de la Plana- España. Book Print Digital. 2006, Pp 558-564.

VALLEJO, J., URRETAVIZCAYA, M. Trastornos afectivos: ansiedad y depresión. 2ªed, Barcelona- España. Masson. 2000, Pp 308-327.

VASCONCELOS, T., SARMENTO, B., & COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. (Drug Discovery Today), Vol. 12., N° 2. (España), Pp. 1068–1075. Diciembre 2007.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644607003753>

2014/02/16

VELASCO, A., ALVAREZ, J. Compendio de Psiconeurofarmacología. 2ºed, Madrid-España. Diaz de Santos. 1988, Pp. 283-286.

BLANT, S., WAGNER, H. Plant Drug Analysis. 2º ed, Munich -Germany. Springer. 1996, Pp. 30-32

ANEXOS

ANEXO N° 1. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ESTANDAR DE HARMINA 98 % DE PUREZA (BATCH CPC20140312).



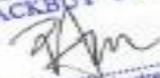
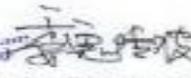
CHINA PACKBUY CO.,LTD

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name:	Harmine CAS: 442-51-3	Botanical Source:	<i>Peganum harmala L.</i>
Batch Number:	CPC20140312	Used Part:	Seed
Batch Quantity:	2kg	Analysis Date:	20140315
Manufacture Date:	20140312	Expiry Date:	20160311

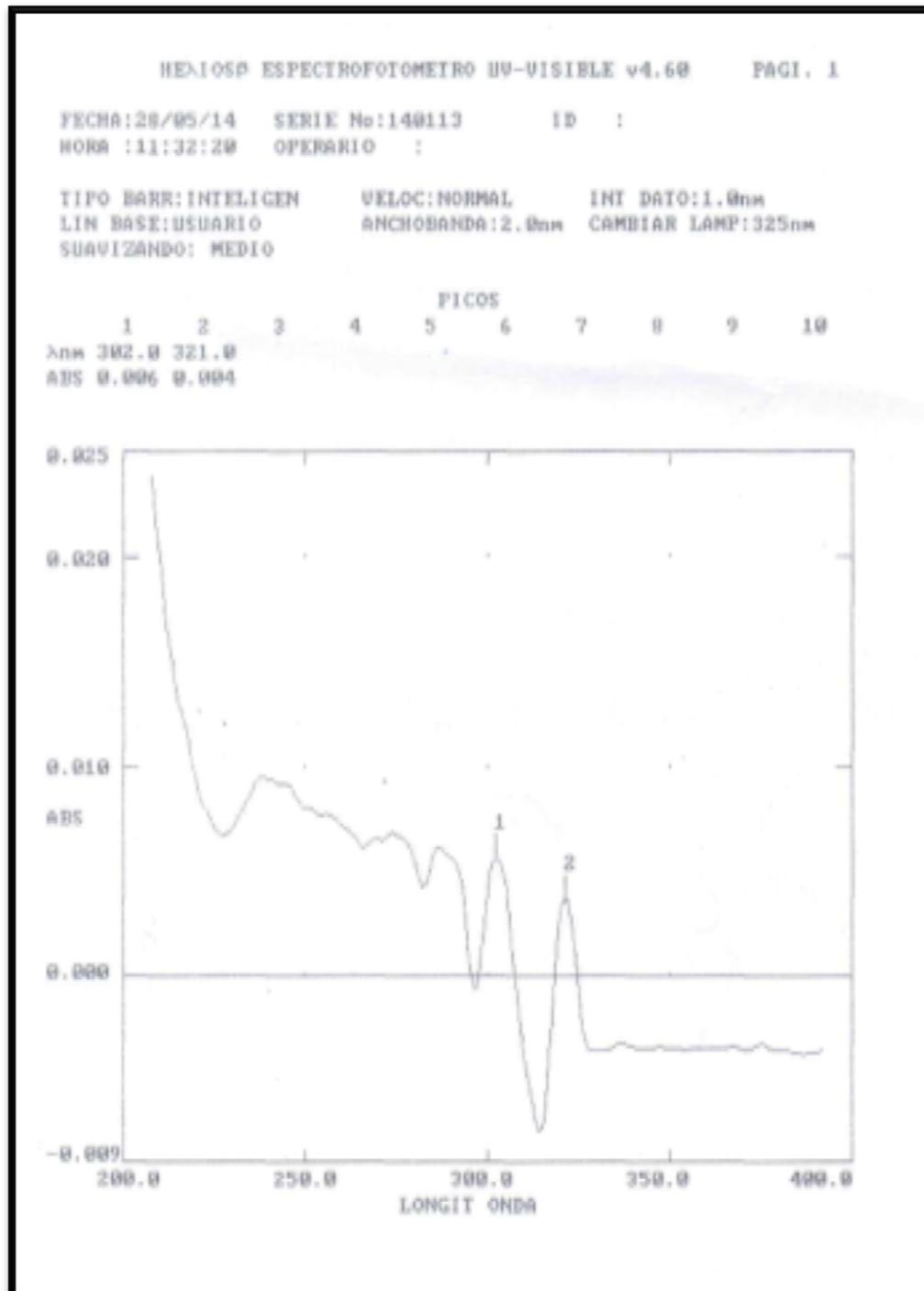
ANALYSIS	SPECIFICATION	RESULTS
Appearance	Light yellow fine powder	Complies
Odor	Characteristic	Complies
Assay (Harmaline, HPLC)	>98%	98.7%
Solvent Used	Ethanol & Water	Complies
Sieve analysis	100% pass 80 mesh	Complies
Bulk Density	50-60g/100mL	51-55g/100mL
Loss on Drying	<1.0%	0.96%
Residue on Ignition	<0.1%	0.08%
Heavy Metal	<10ppm	Complies
Arsenic	<2ppm	Complies
Lead	<2ppm	Complies
Hg	<2ppm	Complies
Microbiology		
Total Plate Count	<100cfu/g	Complies
Yeast & Mold	<100cfu/g	Complies
E. Coll.	Negative	Complies
Salmonella	Negative	Complies
Staphylococcus	Negative	Complies

Conclusion	Conform with specification
Storage	Store in cool & dry place
	Keep away from strong light and heat
Shelf life	24 Months when properly stored

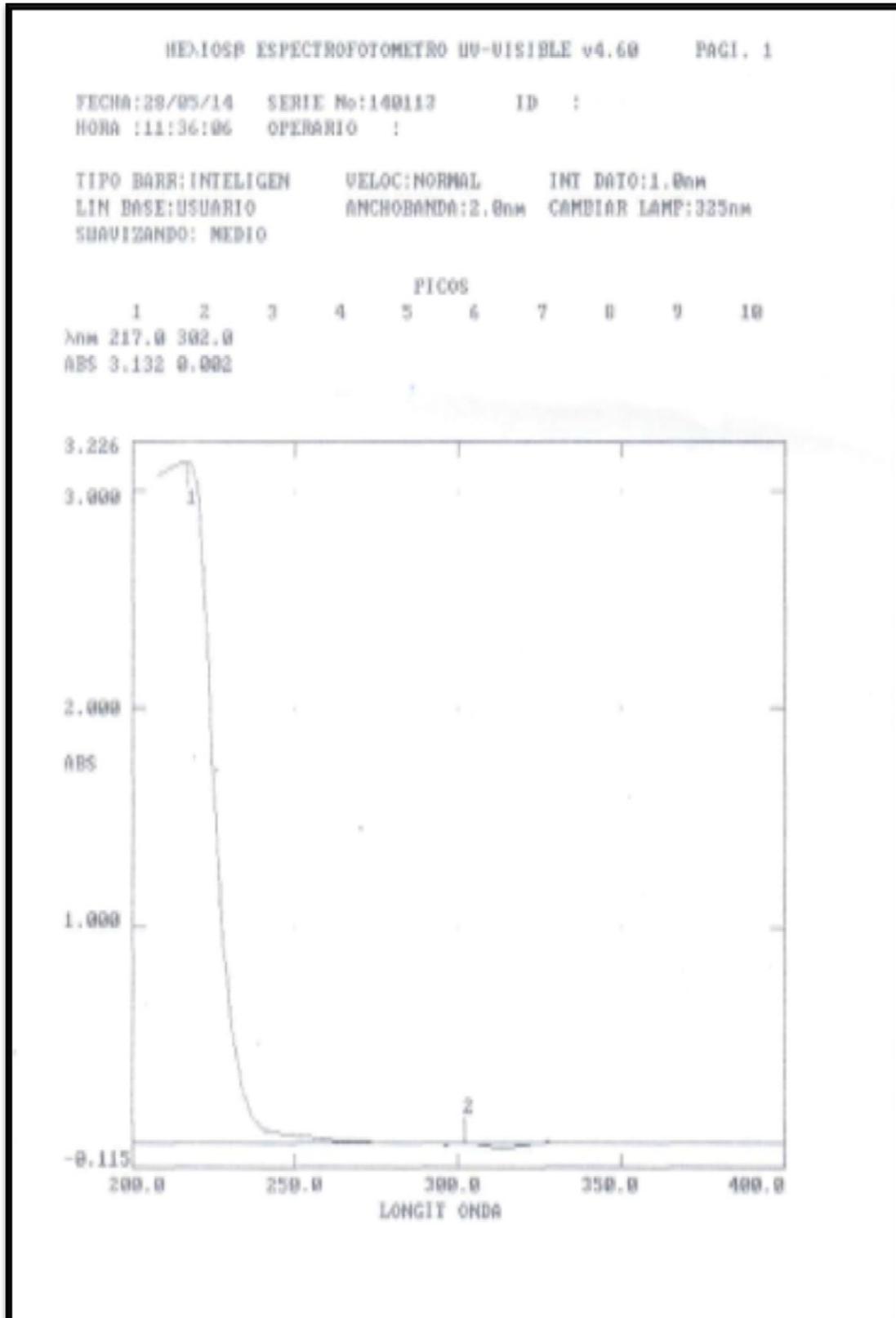
Reviewed by QA Manager/Date  For and on behalf of
CHINA PACKBUY CO., LIMITED  Approved By Quality Director/Date 

**ANEXO N° 2. BARRIDO ESPECTRAL UV DE LOS POLÍMEROS HIDROFÍLICOS:
POLIETILENGLICO (PEG 1450), POLIVINILPIRROLIDONA (PVP k- 30) Y LA
MEJOR DISPERSION SÓLIDA**

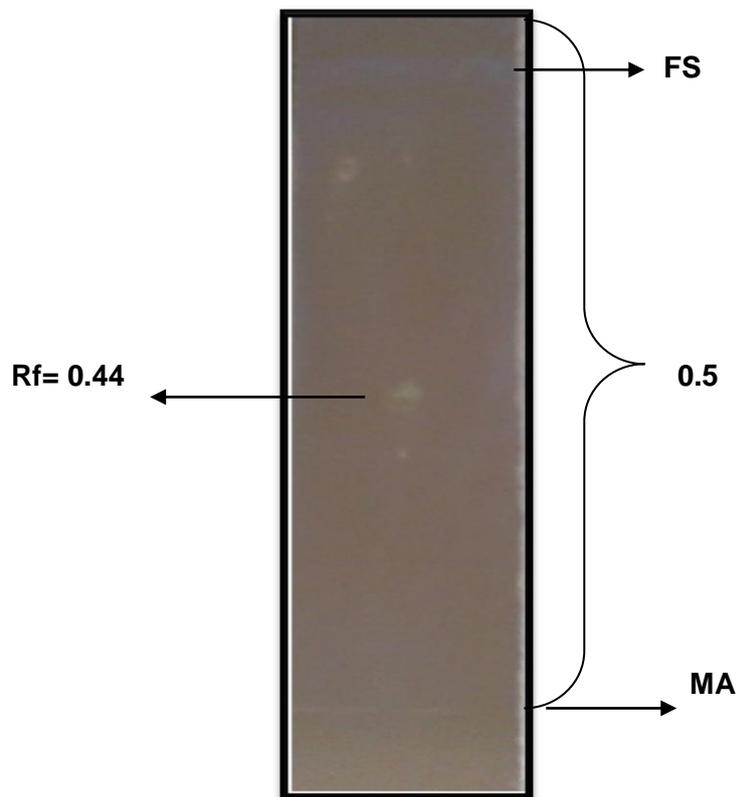
➤ **POLIETILENGLICOL (PEG 1450)**



➤ **POLIVINILPIRROLIDONA (PVP k- 30)**



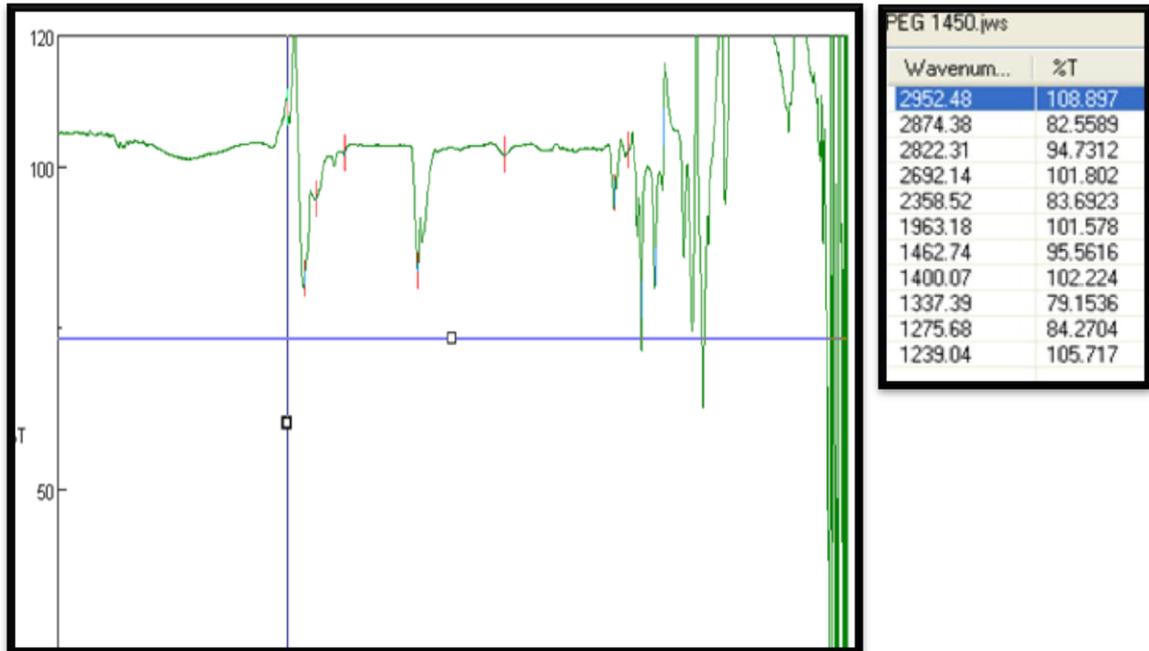
ANEXO N° 3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DE LA MEJOR DISPERSION SÓLIDA



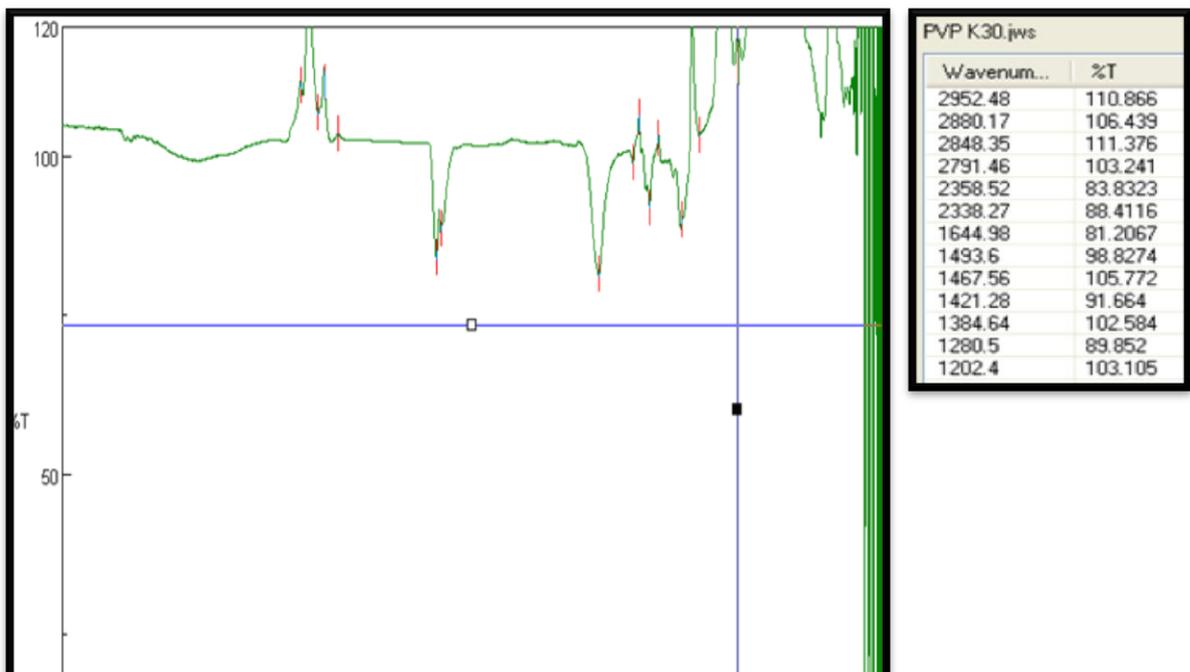
TLC DE LA MEJOR DS: PEG 1450 + PVP k 30 (2, 5: 7,5) más la fracción alcaloidea de *Banisteriopsis caapi*

**ANEXO N° 4. ESPECTRO INFRARROJO DE LOS POLÍMEROS HIDROFÍLICOS:
POLIETILENGLICOL (PEG 1450) Y POLIVINILPIRROLIDONA (PVP k- 30).**

➤ **POLIETILENGLICOL (PEG 1450)**



➤ **POLIVINILPIRROLIDONA (PVP k- 30)**



ANEXO Nº 5. EVIDENCIAS FOTOGRAFIAS

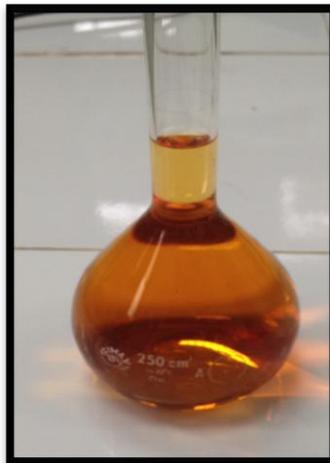
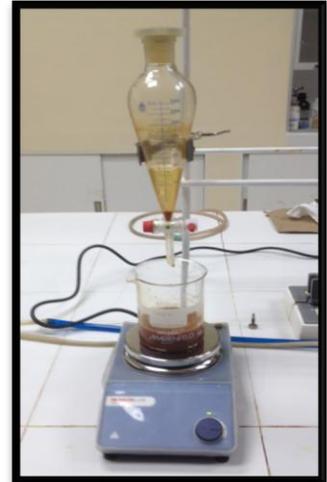
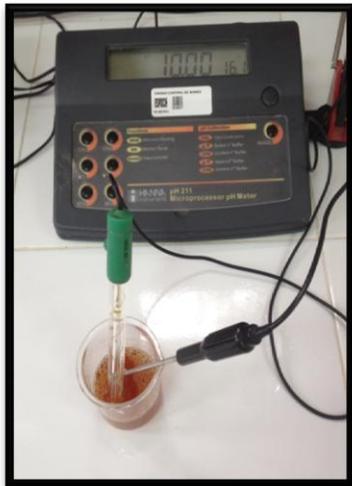
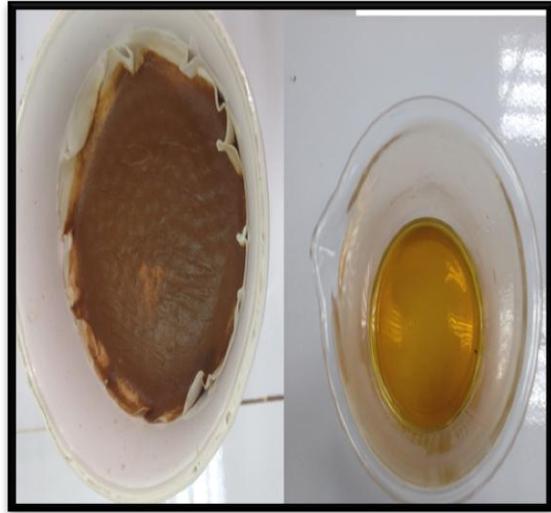


FOTOGRAFIA No 1. MATERIA PRIMA VEGETAL DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA)



FOTOGRAFIA No 2. ESTANDAR DE HARMINA 98% DE PUREZA (BATCHCPC20140312)





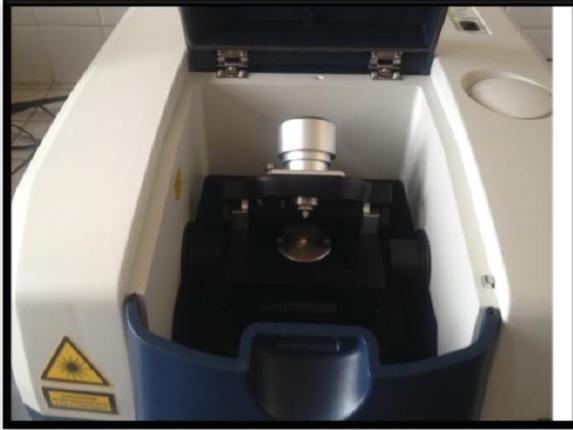
FOTOGRAFIA No 3. PROCESO DE EXTRACCION DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



FOTOGRAFIA No 4. ENSAYO DE SOLUBILIDAD DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



FOTOGRAFIA No 5. ENSAYO DE PERMEABILIDAD DE LA FRAAACION ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



FOTOGRAFIA No 6. INFRARROJO DE LA FRACCION ALCALOIDEA DE *Banisteriopsis caapi*



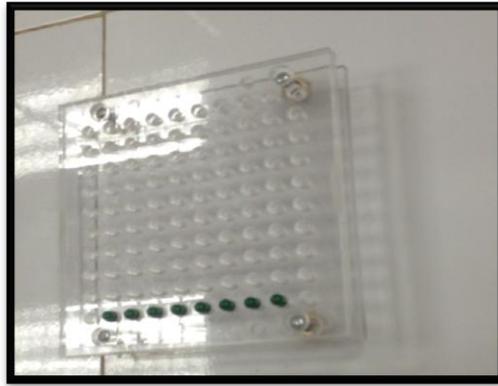
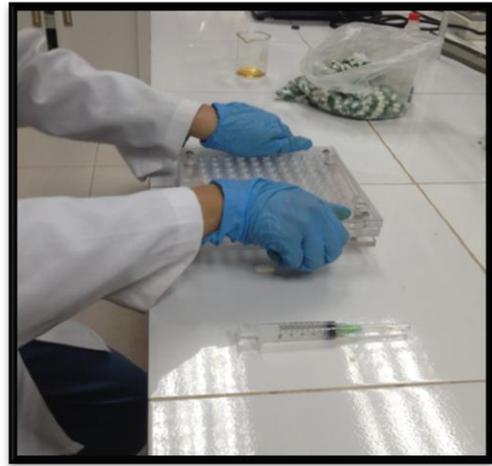
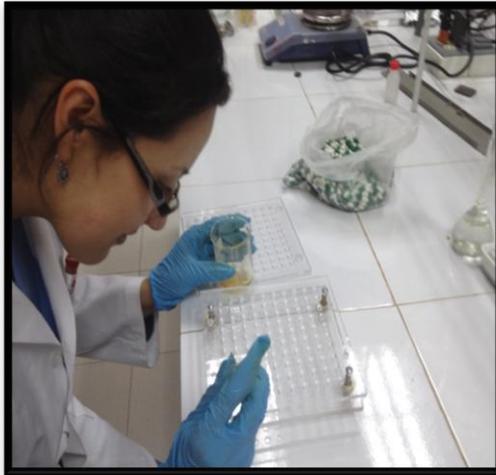
FOTOGRAFIA No 7. POLIMEROS Y SUS COMBINACIONES



FOTOGRAFIA No 8. DISPERSIONES SOLIDAS



FOTOGRAFIA No 9. SOLUCIONES TAMPON



FOTOGRAFIA No 10. PROCESO DE ENCAPSULACION A MANO





FOTOGRAFIA No 11. ENSAYO DE DISOLUCION