



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad de Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

“Evaluación de la Actividad antiinflamatoria de liposomas obtenidos mediante Secado por aspersion a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara del coco verde (*Cocos nucifera*)”

Autor: Hugo Marcelo Tirado Poveda

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Junio 2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes Darío López Hernández.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad

Ambato, 8 de abril del 2016



.....
Ph.D. Orestes Darío López Hernández.

C.I. 1754784864

TUTOR

Declaración de Autenticidad

Yo, Hugo Marcelo Tirado Poveda, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas



.....
Sr. Hugo Marcelo Tirado Poveda

CI: 180462906-9

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Lic. Mg. Yunis Pérez Betancourt
C.I. 175647274-0



Ph. D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez
C.I. 175347919-3

Ambato, 21 de mayo del 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Sr. Hugo Marcelo Tirado Poveda

CI: 180462906-9

AUTOR

DEDICATORIA

“Nuestro miedo más profundo no es el que seamos capaces; nuestro miedo más profundo es que somos poderosos más allá de lo medible.

Es nuestra luz, no nuestra oscuridad lo que nos asusta. No hay nada noble alrededor del hecho de encogerse para que otras personas no se sientan inseguros a nuestro alrededor. Todos nacimos para manifestar nuestra gloria.

Y mientras permitimos a nuestra luz que brille, inconscientemente les permitimos a los demás hacer lo mismo.

Mientras somos liberados de nuestro propio miedo, nuestra presencia automáticamente libera a otros”.

Nelson Mandela

*Para mi Madre y mi Padre
por darme la vida, cuidar de mi integridad
y forjar los valores en mi persona.
Gracias por el amor y el apoyo incondicional.
Los amo.*

Marcelo

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Marcela Poveda, gracias por el cariño de madre por confiar en mí por darme el ánimo necesario y velar por mi bienestar; a mi padre Víctor Hugo Tirado gracias por ser el forjador del espíritu de bondad, humildad y perseverancia. Todo lo que soy lo he logrado gracias al amor que he recibido de ustedes.

A mis hermanas Cristi y Raquel que me criaron con dulzura gracias por todo este tiempo de vivencias y anécdotas que hemos compartido, a mi hermano Marco gracias por haberme cuidado como a un hijo cuando niño jamás olvidare los detalles que me hicieron apreciar la vida de otra manera, gracias a mis sobrinos por ser el eje de felicidad en el hogar.

A Lorena Vargas Velastegui, la mujer parte fundamental de mi vida, gracias por el amor incondicional, por todos los momentos únicos que vivimos juntos y por ser mi mejor amiga, la persona que me da siempre todo el cariño, la fuerza y el cuidado, eres el motor de mi vida que me hace crecer cada día. Te amo mi gatita.

Al Ph. D. Orestes López gracias por haber confiado en mis capacidades y haberme extendido su amistad como referente de apoyo en todo este tiempo.

A la Ing. Cecilia Carpio por haberme extendido su ayuda en épocas difíciles en la realización del proyecto.

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica.

A la Escuela Politécnica de Chimborazo por brindarme el apoyo para llevar a cabo los análisis del proyecto.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

TRABAJO DE TITULACIÓN

MODALIDAD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PÁGINAS PRELIMINARES

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO	I
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA.....	I
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	IV
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
EL PROBLEMA	2
1.1. TEMA	2
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. GENERAL	4
1.3.2. ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO II.....	5
MARCO TEÓRICO	5
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	5
2.2. HIPÓTESIS.....	7
2.2.1. HIPÓTESIS NULA	7

2.2.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	7
2.3. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS	8
2.3.1. VARIABLE INDEPENDIENTE.....	8
2.3.2. VARIABLE DEPENDIENTE	8
CAPÍTULO III.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. MATERIALES	9
3.2. MÉTODOS	11
3.2.1. RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.....	11
3.2.2. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	11
3.2.3. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL MATERIAL VEGETAL.....	11
3.2.3.1. <i>Color</i>	12
3.2.3.2. <i>Tamaño</i>	12
3.2.3.3. <i>Textura</i>	13
3.2.4. PORCENTAJE DE HUMEDAD	13
3.2.5. PORCENTAJE DE CENIZAS	14
3.2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
3.2.7. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.....	15
3.2.8. ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICO DEL EXTRACTO VEGETAL	16
3.2.8.1. <i>Sólidos Totales</i>	16
3.2.8.2. <i>Polifenoles Totales</i>	17
3.2.8.3. <i>Determinación del pH</i>	20
3.2.9. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL EXTRACTO VEGETAL A ESCALA DE BANCO	20
3.2.10. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO MADRE AL 5% DE SÓLIDOS TOTALES.....	20
3.2.11. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES DEL EXTRACTO MADRE ANTES Y DESPUÉS DE CONCENTRAR AL 5% DE SÓLIDOS TOTALES	21
3.2.12. SECADO POR ASPERSIÓN DEL EXTRACTO HIDROSOLUBLE DE LA CÁSCARA DE COCO VERDE (<i>COCOS NUCIFERA</i>)	21
3.2.13. FORMULACIÓN PARA LA FORMACIÓN DE LIPOSOMAS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN.....	22
3.2.14. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES DEL EXTRACTO EN POLVO Y LIPOSOMAS.....	22
3.2.15. ANÁLISIS DE LIPOSOMAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS Y EFICACIA DEL ENCAPSULAMIENTO.....	22
3.2.16. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	24
3.2.17. ANÁLISIS Y EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPUESTOS CONTENIDOS EN EL EXTRACTO	24

3.2.17.1. Aislamiento y conteo de neutrófilos.....	25
3.2.17.2. Protocolo para la Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria.....	27
CAPÍTULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	32
4.1.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA DEL MATERIAL VEGETAL (<i>COCOS NUCIFERA</i>)	32
4.1.2. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN A ESCALA DE BANCO	35
4.1.3. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, POLIFENOLES EN EL EXTRACTO MADRE Y EL CONCENTRADO AL 5%	40
4.1.4. ANÁLISIS DEL PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN DEL EXTRACTO MADRE DE CÁSCARA DE COCO VERDE (<i>COCOS NUCIFERA</i>) PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO SECO Y LIPOSOMAS	42
4.1.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR ESPECTROSCOPIA IR.....	45
4.1.6. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LIPOSOMAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	50
4.1.7. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO HIDROSOLUBLE SECO Y LIPOSOMAS DE LA CÁSCARA DE COCO VERDE (<i>COCOS NUCIFERA</i>).....	51
4.2. VERIFICACIÓN DE LAS HIPÓTESIS.....	54
CAPÍTULO V	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
5.1. CONCLUSIONES	55
5.2. RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ANEXOS	62
ANEXO 1. REACTOR TIPO AGITADOR CON CALENTAMIENTO DIRECTO.....	62
ANEXO 2. MOLIENDA	62
ANEXO 3. MATERIAL VEGETAL RECOLECTADO	63
ANEXO 4. EXTRACCIONES A ESCALA DE LABORATORIO	63
ANEXO 5. MEDICIÓN DEL pH.....	64
ANEXO 6. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO MADRE	64
ANEXO 7. SECADO POR ASPERSIÓN	65
ANEXO 8. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	65
ANEXO 9. ENSAYO <i>IN VITRO</i>	66
ANEXO 10. PRODUCTO OBTENIDO Y ENVASADO.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Cocos nucifera</i>	6
Tabla II. Denominaciones y tamaño de aberturas de tamices	13
Tabla III. Diseño Experimental Para extracciones preliminares.....	15
Tabla IV. Sólidos Totales presentes en los tratamientos experimentales	17
Tabla V. Preparación de la curva patrón de Ácido Gálico.....	17
Tabla VI. Valores de Absorbancia a 750 nm de la Curva Patrón	18
Tabla VII. Preparación de muestras para Determinación de Polifenoles.....	19
Tabla VIII. Polifenoles Totales presentes en los tratamientos experimentales.....	20
Tabla IX. Grupos Funcionales presentes a distinta longitud de onda	23
Tabla X. Frecuencias ejemplo de grupos de compuestos hetero- oxigenados sencillos	23
Tabla XI. Obtención de Neutrófilos de la Sangre	27
Tabla XII. Preparación de compuestos para evaluar la Actividad Antiinflamatoria .	29
Tabla XIII. Absorbancias de los compuestos de prueba en ensayo Antiinflamatorio	30
Tabla XIV. Caracterización física del material según la coloración antes y después del tratamiento.....	32
Tabla XV. Tamaño de partícula luego de la molienda.....	33
Tabla XVI. Contenido de Humedad y Cenizas de la Cáscara de Coco Verde.....	34
Tabla XVII. Respuesta Experimental en mg de Polifenoles en base seca	36
Tabla XVIII. Análisis de Varianza para Polifenoles expresados en base seca	37
Tabla XIX. Optimización de la Respuesta Experimental	38
Tabla XX. Rangos de pH presentes en los tratamientos y extracto madre	40
Tabla XXI. Sólidos Totales y Polifenoles Totales	41
Tabla XXII. Rendimiento de obtención de Principios Activos mediante el uso del Spray Dryer	42
Tabla XXIII. Contenido de Humedad del Extracto seco y Liposomas.....	43
Tabla XXIV. Polifenoles Totales Obtenidos en el Extracto seco y Liposomas.....	44
Tabla XXV. Longitudes de Onda y grupos Funcionales obtenidos en los Espectros del Infrarrojo	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del punto de recolección de la materia prima	11
Figura 2. Tabla Internacional de Colores	12
Figura 3. Curva Patrón de Ácido Gálico	19
Figura 4. Reducción de Tetrazolio a Formazan	25
Figura 5. Separación de los componentes sanguíneos	25
Figura 6. Recolección de Neutrófilos y Plasma	26
Figura 7. Enfoque de Neutrófilos en Placa Neubauer	27
Figura 8. Cenizas del material vegetal antes y después del proceso de secado	34
Figura 9. Sólidos Totales y muestras para determinación de Polifenoles Totales en ensayos experimentales	36
Figura 10. Diagrama de Pareto de Efectos Incidentes en el experimento	37
Figura 12. Superficie de respuesta de los tratamientos experimentales	39
Figura 13. Sólidos Totales y Polifenoles Totales Antes y Después de Concentrar ...	41
Figura 14. Extracto en Polvo y Liposomas Obtenidos mediante Secado por Aspersión	43
Figura 15. Polifenoles presentes en el Extracto y Liposomas	44
Figura 16. Espectros IR de los compuestos presentes en la muestra del Extracto en Polvo	45
Figura 17. Espectros IR de los compuestos presentes en la muestra de Encapsulante	46
Figura 18. Espectros IR de los compuestos presentes en la muestra de Liposomas ..	46
Figura 19. Compuestos Polifenólicos presentes en extractos vegetales	48
Figura 20. Comparación de Espectros IR para determinar Encapsulación de Polifenoles en Liposomas	49
Figura 21. Morfología y tamaño promedio de las Partículas de Liposomas	50
Figura 22. Preparación de las muestras para ensayo Antiinflamatorio	51
Figura 23. Ensayo Antiinflamatorio	52
Figura 24. Comparación de la Actividad Antiinflamatoria entre el Control de Aspirina, Extracto en polvo y Liposomas	53
Figura 25. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de liposomas de extracto hidrosoluble de cáscara de Coco Verde (<i>Cocos nucifera</i>)	54

RESUMEN

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de liposomas obtenidos mediante secado por aspersion a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara de coco verde (*C. nucifera*). El extracto madre concentrado al 2,82% de sólidos totales presentó 14416 [mg en base seca] de polifenoles totales cuantificados mediante el método del Follin-Cioclatau a 750 nm. La actividad antiinflamatoria del liposoma se evaluó *in vitro* a 450 nm a través del método de reducción de sales de tetrazolio a sales de formazan usando el reactivo WST-1 sobre neutrófilos humanos [10^4 células/ μ L] inflamados con Zymozan A opsonizado, comparando con controles de Dimetilsulfóxido, Tritón X-100 y Aspirina. La eficiencia de encapsulación de los polifenoles en la capa de fosfolípido se determinó mediante espectrofotometría infrarroja y microscopía electrónica de barrido; con un tamaño promedio de partícula de $2,83 \pm 0,942 \mu\text{m}$. La actividad antiinflamatoria de los liposomas fue del 58% a una concentración de 200 ppm, superior a las presentadas por los controles.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, polifenoles, fosfolípido, liposomas, neutrófilos, antiinflamatoria.

ABSTRACT

Anti-inflammatory activity of liposomes obtained was evaluated by spray drying from water-soluble extract of green coconut shell (*C. nucifera*). The extract concentrated mother 2.82% total solids presented 14416 [mg on dry basis] total polyphenol quantified by the method of Follin- Cioclateu 750 nm. The antiinflammatory activity of the liposome was evaluated in vitro at 450 nm by the method of reduction of tetrazolium salts to salts formazan using the reagent WST-1 on human neutrophils [104 cells / μL] swollen with Zymozan opsonized A, compared to controls Dimethylsulfoxide, Triton X-100 and Aspirin. The encapsulation efficiency of polyphenols in the phospholipid layer infrared spectrophotometry was determined by scanning electron microscopy and; with an average particle size of 2.83 ± 0.942 microns. The anti-inflammatory activity of the liposomes was 58% at a concentration of 200 ppm, higher than those presented by the controls.

Keywords: *Cocos nucifera*, polyphenols, phospholipid liposomes, neutrophils, anti-inflammatory.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la industria farmacéutica se ha enfocado en la obtención de partículas cada vez más pequeñas a fin de mejorar su biodisponibilidad en el organismo humano, por tal motivo las investigaciones se han centrado en las aplicaciones de la nanobiotecnología, en donde se engloba el estudio de biotransportadores para la liberación controlada de fármacos o principios activos. Para optimizar la biocompatibilidad de estas partículas al entrar en contacto con el tejido celular, una parte de su composición ha de tener algunos de los componentes celulares, como es el caso de los fosfolípidos que forman parte de los liposomas que han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el cuerpo humano **(Ruano, 2013)**.

Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes, antimicrobianos y antiinflamatorios más abundantes en la naturaleza. Se trata de un amplio grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario de las plantas, en donde desempeñan diversas funciones de protección al ataque de patógenos o herbívoros y son pigmentos que atraen a los polinizadores. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante **(Arranz, 2010)**.

Un estudio de la utilización de modelos animales de inflamación (prueba de la formalina y el modelo de bolsa de aire subcutánea) mostró que el extracto acuoso *de C. nucifera* (50 o 100 mg/kg) inhibió significativamente la inflamación en el tiempo que los animales lamieron sus patas con formalina de colada provocando una disminución de la inflamación llevada a cabo por la inyección de carragenina subcutánea mediante la reducción de la migración celular y extravasación de proteínas. Los ensayos con animales revelaron una actividad significativa que apoya el uso de extractos de fibra de cáscara de coco en la medicina tradicional. **(Lima, et al, 2015)**. Las recientes aplicaciones de métodos *in vitro* para la determinación de viabilidad celular y determinación de citotoxicidad y actividad antiinflamatoria describen el uso del WST-1 (sales de tetrazolio) como un poderoso agente para determinación espectrofotométrica de proliferación celular asociada con el proceso de respiración de la célula **(Tan, Berridge, 2000)**.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

“Evaluación de la Actividad antiinflamatoria de liposomas obtenidos mediante Secado por aspersión a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara del coco verde (*Cocos nucifera*)”

1.2. Justificación

La biotecnología vegetal orientada a la obtención de fármacos está basada en la utilización de tecnologías combinadas con las ciencias de la vida, bajo este contexto está considerada como un área del conocimiento multidisciplinar.

La introducción de nuevos y sofisticados métodos de obtención de metabolitos de origen vegetal suponen un aprovechamiento en la producción de materiales útiles en las diferentes industrias tales como: farmacéuticas, alimentarias, etc.

La biotecnología es una herramienta clave dentro de las aplicaciones de la ingeniería y es utilizada en el desarrollo de nuevo procesos que permitan dar mayor uso a productos vegetales que muchas veces se desechan por desconocimiento de sus beneficios.

Según **Brito y colaboradores (2014)**, son frecuentes las enfermedades que evolucionan con dolor e inflamación como parte de sus síntomas, lo que ha provocado el aumento del consumo de fármacos analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y esteroideos (AIE), con sus consecuentes efectos adversos.

El tratamiento con plantas medicinales, utilizado desde tiempos ancestrales, es una alternativa para el alivio de estos síntomas. No existe suficiente evidencia científica para la validación de estos usos, por lo que es necesario investigar y

desarrollar agentes antiinflamatorios seguros y eficaces a partir de plantas medicinales de uso tradicional.

Uno de los materiales vegetales que se desecha con frecuencia en Ecuador y América Latina es la cáscara del Coco verde (*Cocos nucifera*) la misma que se usaba ancestralmente como remedio para hemorroides en baños de asiento debido a que en su composición existen metabolitos con propiedades antiinflamatorias.

Según **González (2005)**, los liposomas son vesículas, cuya constitución química básica es uno o varios tipos de fosfolípido y colesterol, integrados en una o más bicapas, encerrando un espacio acuoso central y, ocasionalmente, otros espacios interlaminares. Sobre esta estructura básica se pueden insertar otros lípidos, proteínas, anticuerpos, biomoléculas diversas marcadas con isótopos radiactivos, sustancias fluorescentes, etc. Esta versatilidad estructural permite diseñar los liposomas de acuerdo con los objetivos para los que serán utilizados, como por ejemplo, transportar sustancias quimioterapéuticas anticancerígenas hacia órganos específicos, sin que afecten a otros órganos o tejidos corporales, como en la fabricación de ungüentos.

Para **Martínez (2009)** el secado por aspersión tiene gran importancia en la industria farmacéutica, biotecnológica y de alimentos, puesto que puede ser aplicado a materiales termolábiles. Además, permite obtener productos con características específicas de humedad, densidad y tamaño.

De acuerdo a lo argumentado, la formación de liposomas a partir del extracto hidrosoluble del coco verde (*Cocos nucifera*), resulta de la utilización del secado por aspersión; una tecnología sencilla y económica que tiene un amplio espectro de aplicaciones y que en este caso resulta viable en cuanto al aprovechamiento de los metabolitos, dado que al encontrarse recubiertos con una matriz fosfolipídica pueden ser asimiladas de mejor manera por la piel y así brindar los efectos antiinflamatorios esperados en la zona afectada.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Evaluar la actividad antiinflamatoria de liposomas obtenidos mediante secado por aspersión a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara del coco verde (*cocos nucifera*).

1.3.2. Específicos

- ❖ Caracterizar el material vegetal (*Cocos nucifera*) y el extracto hidrosoluble mediante análisis físico químico (pH, porcentaje de cenizas, humedad, textura, color, tamaño de partícula y sólidos totales).
- ❖ Utilizar la técnica de secado por aspersión para la obtención de liposomas a partir del extracto hidrosoluble del coco verde (*Cocos nucifera*).
- ❖ Analizar las características morfológicas de los liposomas a través de métodos cualitativos y cuantitativos.
- ❖ Comparar la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto del coco verde (*Cocos nucifera*) y los liposomas obtenidos por secado por aspersión.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos

En los últimos años ha habido una creciente inclinación hacia el desarrollo de sistemas de liberación controlada (SLC) con polímeros biodegradables. Estos sistemas son preparaciones que modifican la velocidad o sitio de liberación del principio activo o fármaco, lo cual permite que se logre el efecto terapéutico con una sola dosis.

La industria farmacéutica moderna busca constantemente tecnologías para la obtención de transportadores de diferentes fármacos como: antiinflamatorios, péptidos y hormonas; que impliquen una reducción de su toxicidad y una liberación sostenida y/o controlada.

Dentro de los sistemas coloidales utilizados como transportadores de fármacos, se encuentran los liposomas, las microcápsulas y nanocápsulas, los cuales se clasifican como sistemas de tipo reservorio, en donde el fármaco se encuentra encapsulado en las capas o en su interior en el caso de los liposomas, y en el núcleo en el caso de las microcápsulas y nanocápsulas. Existen diferentes métodos de obtención de estos productos, como la extracción de solvente, la doble emulsión y el secado por aspersion (López, Gómez, 2008).


El proceso de secado por aspersion implica principalmente los siguientes pasos: concentración de la materia prima, atomización, secado del material y la evaporación del mismo con temperaturas de entrada y salida de 200 y 100 °C respectivamente. Las ventajas del secado por aspersion pueden ser diseñadas para virtualmente cualquier capacidad requerida. El producto que se obtienen son partículas esféricas menores o iguales a los 100 micrómetros de diámetro (Swati, Wagh, 2014).

Según Allen y Cullis (2012), los primeros sistemas de fosfolípidos bicapa cerrados, llamados liposomas, fueron descritos en 1965 y pronto se propusieron como sistemas de liberación de fármacos. El trabajo pionero de innumerables investigaciones sobre liposomas por más de casi 5 décadas ha llevado al

desarrollo de avances técnicos importantes, tales como la carga de fármaco a distancia, extrusión de tamaño homogéneo, liposomas de larga circulación, liberación controlada de liposomas, liposomas que contienen polímeros de ácido nucleico y liposomas que contienen combinaciones de fármacos dirigidos. Estos avances han dado lugar a numerosos ensayos clínicos en áreas tan diversas como la entrega de los anticancerígenos, fármacos antifúngicos y antibióticos, la entrega de medicamentos de genes, y la entrega de los anestésicos y medicamentos antiinflamatorios. Las nanopartículas lipídicas son el primer sistema de entrega de la nanomedicina para hacer la transición desde el concepto hasta la aplicación clínica, y ahora son una plataforma de tecnología establecida con bastante aceptación clínica.

Dua y colaboradores (2013), señalan que muchos fármacos son análogos sintéticos construidos en los compuestos prototipo aislados de plantas. *Cocos nucifera*, que se conoce comúnmente como coco, es una planta que posee un gran potencial como ingrediente en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos metabólicos y particularmente como un agente antiinflamatorio, antimicrobiano y analgésico.

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Cocos nucifera*

Dominio	Eukaryota	
Reino	Plantae	
Filum	Magnoliophyta	
Clase	Liliopsida	
Orden	Arecales	
Familia	Arecaceae	
Género	<i>Cocos</i>	
Especie	<i>Cocos nucifera</i>	

Nota: El cuadro indica la clasificación taxonómica de *C. nucifera*, y la imagen del fruto.

Fuente: (López, 2013)

En un estudio realizado por **Figueira y colaboradores (2013)**, se encontró que la cáscara de coco tiene una composición química similar a la madera, y es adecuado para la extracción de compuestos fenólicos (taninos, flavonoides y las xantonas), que son responsables de la actividad antimicrobiana, antitumoral y antiinflamatoria.

Dos de los ensayos se orientaron a la investigación de la acción antiinflamatoria del extracto de las cortezas de *C. nucifera*, los cuales se llevaron a cabo utilizando ratones como modelos de prueba. Al final del experimento se obtuvieron resultados consistentes con la acción antiinflamatoria.

Actualmente en Ecuador, no existen trabajos que indiquen antecedentes científicos sobre la utilización de la tecnología de liposomas con la utilización del secado por aspersion, adicionalmente los estudios de antiinflamatorios de origen vegetal están centrados en ciertos grupos de plantas, y el uso de la cáscara del coco verde (*Cocos nucifera*) resulta una alternativa innovadora para el acoplamiento de dicha tecnología.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

Los liposomas obtenidos mediante secado por aspersion a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara del coco verde (*Cocos nucifera*) no presentan actividad antiinflamatoria en los ensayos *In vitro*.

2.2.2. Hipótesis alternativa

Los liposomas obtenidos mediante secado por aspersion a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara del coco verde (*Cocos nucifera*) presentan actividad antiinflamatoria en los ensayos *In vitro*.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1. Variable independiente

- ✓ Extracto hidrosoluble de la cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*)

2.3.2. Variable dependiente

- ✓ Actividad antiinflamatoria de los liposomas obtenidos mediante secado por aspersion.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

- Vasos de Precipitación de 100, 250 y 600 ml (Boro 3.3; Pyrex $\pm 0,05$)
- Probetas graduadas de 1000, 100 y 10 ml (Boro 3.3 $\pm 0,05$)
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml ($\pm 0,01$)
- Balones de aforo de 10, 25, 50 y 100 ml ($\pm 0,01$)
- Balón de 500 ml (Boro, $\pm 0,05$)
- Frascos color ámbar de 1000 ml
- Tubos de ensayo (Boro 3.3; Pyrex)
- Tubos Bacteriológicos (Boro 3.3; Pyrex)
- Tubos de centrífuga (Boro 3.3)
- Tubos eppendorf
- Jeringas de 1, 3, 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Micropocillos recipientes para ensayo Elisa
- Mortero y Pistilo
- Embudo
- Lienzo

Para determinación de Polifenoles:

Ácido Gálico Estándar (Sigma- Aldrich G7384), Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (MP, Biomediate), Na_2CO_3 (Sodium Bicarbonate, Merck, USA).

Para formulación de liposomas:

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (Lactosa monohidratada, Merck KGaA), Fosfatidilcolina (Inti S.A. Lecitina de Soya 1200 mg).

Para ensayo *in- vitro*:

(CH₃)₂SO “DMSO” (Dimetilsulfóxido, Merck, ACS), Tritón X-100 (Sigma- Aldrich, Antigen Vaccine Preparation), Heparina Sódica 5.000 U.I/ ml (Hospira, Madrid), Ficoll paque (Sigma- Aldrich, Cell Biology), Solución diluyente de Turk (Merck, Ácido Acético para el recuento de leucocitos), Solución Modificada de Hanks “SMH”(Sigma- Aldrich, Buffered Salt Solution 9,5 g/L), Aspirina (Bayer, Ácido Acetil Salicílico 500 mg), Reactivo WST-1 (Sigma- Aldrich, Cell Proliferation Reagent WST-1 Sales de Tetrazolio).

Equipos:

- Plancha de Calentamiento con agitación (CORNING, PC-4200)
- Reactor tipo agitador con calentamiento directo (Ensamblado).
- Rotoevaporador (EYELA, OSB- 2100)
- Ph metro (Thermo Orion Star A1116)
- Balanza Analítica (CITIZEN CY 720)
- Balanza de Humedad (CITIZEN MB200)
- Estufa (MEMMERT IP20)
- Desecador (Pyrex, Ø 800 mm)
- Mufla (FURNACE 1400)
- Hemocitómetro (CELEROMICS)
- Microscopio (OLYMPUS CX21)
- Incubadora (MEMMERT, IN55)
- Microcentrífuga (SPECTRAFUGE 24D)
- Centrífuga (DYNAC)
- Mini Spray Dryer (BUCHI B-290)
- Espectrofotómetro UV- VIS (HACH DR5000)
- Espectrofotómetro Infrarrojo (JASCO FT/IR-4100)
- Microscopio Electrónico de Barrido (TESCAN- ALEMANIA)

3.2. Métodos

3.2.1. Recolección y procesamiento de la materia prima

Se recolectó 5 kg de cáscaras de coco verde en bolsas de lona. El producto es originario de la provincia de Esmeraldas, y se expende en la Avenida Bolivariana y Juan de Dios Morales en la ciudad de Ambato (Coordenadas: -1,258725 S; -78,614310 N).

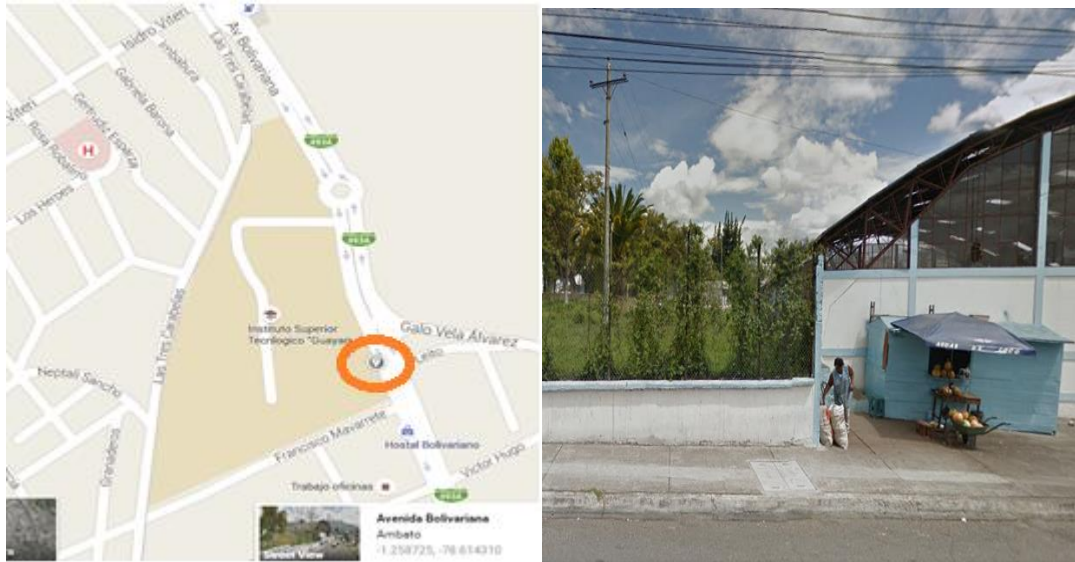


Figura 1. Localización del punto de recolección de la materia prima

Nota: Fotografía y mapa Google Earth.

3.2.2. Procesamiento del material vegetal

Se limpiaron las cáscaras de coco a fin de eliminar impurezas, luego se dejaron al sol en un ambiente protegido durante 4 semanas, posteriormente se trituro el material en pedazos pequeños para luego reducir su tamaño en un molino eléctrico de discos obteniendo un polvo fino de tamaño homogéneo, el mismo que fue almacenado en un frasco de metal para evitar la absorción de humedad.

3.2.3. Análisis macroscópico del material vegetal

La materia prima se caracterizó mediante los siguientes criterios: color, tamaño y textura

3.2.3.1. Color

Para la caracterización del color se tomó en cuenta el material antes y después de ser triturado, mediante el uso de la tabla internacional de colores (**Bruguer, 2015**).



Figura 2. Tabla Internacional de Colores

Nota: Sección de colores indicativos similares al color del material vegetal utilizado

Fuente: Bruguer, 2015.

3.2.3.2. Tamaño

Para la determinación del tamaño de partícula se colocó 25 gramos del material triturado mediante una serie de tamices de diámetro: 2; 1,68; 1,41; 1,2; 1,19 y 1 mm a fin de caracterizar el tamaño de la partícula mediante la siguiente tabla:

Tabla II. Denominaciones y tamaño de aberturas de tamices

Malla	Tamaño de abertura	
ASTM	(in)	(mm)
4	0,187	4,76
5	0,157	4
6	0,132	3,36
7	0,111	2,83
8	0,0937	2,38
10	0,0787	2
12	0,0661	1,68
14	0,0555	1,41
16	0,0469	1,19
18	0,0394	1
20	0,0331	0,84
25	0,028	0,71

Nota: Abertura de tamices para partículas de diferentes diámetros

Fuente: Infoleg, 2003.

3.2.3.3. Textura

La textura del material de partida y material triturado fue catalogada por medio de comparación subjetiva con otros materiales de referencia como la harina y la fibra de árboles.

3.2.4. Porcentaje de Humedad

Para la determinación del porcentaje de humedad se realizaron dos mediciones por muestra midiendo la humedad del material vegetal sin secar y del material vegetal seco de la siguiente forma:

- En la balanza infrarroja de humedad se colocó aproximadamente 3 gramos de muestra vegetal sin secar y se registró el valor (%), el mismo procedimiento se realizó para el material vegetal seco y se efectuaron dos mediciones por cada muestra.

3.2.5. Porcentaje de Cenizas

Para determinar cenizas se llevó a cabo la metodología propuesta por el Instituto Salud Pública de Chile referenciada en el **Oficial Methods of Analysis AOAC, 1990**. Se realizó por duplicado para cada una de las muestras de ensayo de la siguiente manera:

- Se pesó la muestra en crisoles previamente tarados (m_0) hasta peso constante, luego se colocó 2 gramos de muestra deshidratada obtenida de la balanza de humedad (m_1) en cada crisol.
- Posteriormente se colocaron las muestras en la mufla y a 550 °C por 8 horas, hasta cenizas blancas o grisáceas.
- Una vez transcurrido ese tiempo se colocaron los crisoles al desecador hasta que se enfriaron (30 min aproximadamente).
- En una balanza analítica se registró el peso final de los crisoles con muestra (m_2).

Mediante la siguiente ecuación se determinó el porcentaje de cenizas en las muestras vegetales:

$$\% \text{ Cenizas Totales} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} * 100 \quad [\text{EC. 1}]$$

Donde:

m_0 = crisol vacío y tarado (g)

m_1 = crisol + muestra (g)

m_2 = crisol + cenizas (g)

3.2.6. Diseño Experimental

Se procedió a realizar un diseño factorial 3^2 para realizar las extracciones a escala de laboratorio, donde:

Factor 1: Relación Material vegetal: Disolvente (Agua Osmotizada).

Niveles del Factor 1: 1:15; 1:20; 1:25 (p: v).

Factor 2: Tiempo de extracción

Niveles del Factor 2: 30, 60 y 90 minutos.

Respuesta experimental: Polifenoles Totales.

Tabla III. Diseño Experimental Para extracciones preliminares.

3 ²	RELACIÓN	TIEMPO	DETALLE
1	-1	-1	1:15 - 30 min
2	-1	0	1:15 - 60 min
3	-1	1	1:15 - 90 min
4	0	-1	1:20 - 30 min
5	0	0	1:20 - 60 min
6	0	1	1:20 - 90 min
7	1	-1	1:25 - 30 min
8	1	0	1:25 - 60 min
9	1	1	1:25 - 90 min

Nota: Diseño factorial 3², Factor 1 Material Vegetal: Agua Osmotizada; Factor 2 Tiempo de Extracción, a tres niveles por factor experimental; Respuesta: [mg Polifenoles].

3.2.7. Obtención del extracto vegetal.

Para la realización de las extracciones se utilizó el material seco triturado de la cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*), y se siguió el siguiente protocolo de acuerdo al diseño experimental propuesto:

- Se colocó 500 ml de agua osmotizada en un vaso de precipitación Pyrex de 600 ml de capacidad, luego se llevó a una plancha de agitación con calentamiento y se elevó la temperatura hasta que el agua alcanzó su punto de ebullición, en ese instante se añadió la cantidad de cáscara de coco triturada y se agitó a 600 rpm durante el tiempo previsto para cada ensayo, el tiempo de la extracción comenzó en el momento en que el material vegetal se puso en contacto con el disolvente.
- Se realizó este procedimiento según la Tabla III, donde al final de cada extracción se filtró el líquido obtenido mediante el uso de un embudo y lienzo y se midió el volumen final del producto para almacenarlo en botellas PET estériles y etiquetadas, las mismas que se pusieron en refrigeración y protegidas de la luz.

3.2.8. Análisis Físico- Químico del extracto vegetal

Los ensayos obtenidos del extracto hidrosoluble de cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*), se analizaron mediante las siguientes determinaciones:

3.2.8.1. Sólidos Totales

Se llevó a cabo mediante la metodología de Sólidos Totales Secados a 103-105°C propuesta en el **STANDARD METHODS, (2005)**; para cada una de las muestras de ensayo se realizó el proceso por duplicado aplicando el siguiente protocolo:

- Se introdujo las cápsulas a la estufa (103 - 105°C) y se secó durante 30 minutos, posteriormente se pasaron al desecador hasta temperatura ambiente (30 minutos aproximadamente).
- Se pesó las cápsulas vacías en una balanza analítica hasta peso constante: peso "A".
- Se colocó 25 ml de muestra del ensayo correspondiente en la cápsula y se introdujeron a la estufa a 103 - 105°C durante 24 horas. (Se puede colocar entre 25 a 50 mL de muestra)
- Una vez transcurrido ese tiempo se colocaron las cápsulas al desecador hasta temperatura ambiente (30 min aproximadamente).
- Se registró el peso final Cápsula con muestra seca "B".

Mediante la siguiente fórmula se determinó la cantidad de sólidos totales:

$$\frac{mg}{L} = \frac{[(B-A)*10^6]}{Volumen} \quad [\text{EC. 2}]$$

Donde:

A= Peso de la cápsula tarada y vacía en (g)

B= Peso de la cápsula + muestra seca después de 24 horas a 103 - 105°C (g)

Volumen= Muestra líquida (mL)

Para expresar los sólidos totales se llevó a cabo la siguiente conversión:

$$\% \text{ Sólidos Totales} = \frac{mg}{L} * \frac{1L}{1000 ml} * \frac{1g}{1000 mg} * 100 \quad [\text{EC. 3}]$$

Tabla IV. Sólidos Totales presentes en los tratamientos experimentales

Tratamiento	Sólidos Totales [mg/L]	Sólidos Totales (%)	Sólidos Totales [mg/L]	Sólidos Totales (%)
Réplica		R1		R2
1	5124	0,5124	5160	0,5160
2	9732	0,9732	9672	0,9672
3	17832	1,7832	17212	1,7212
4	4408	0,4408	4120	0,4120
5	6912	0,6912	7104	0,7104
6	13151	1,3151	12600	1,2600
7	3476	0,3476	3576	0,3576
8	6764	0,6764	6664	0,6664
9	13336	1,3336	12744	1,2744

Nota: Determinación de sólidos totales en ensayos por medio de la aplicación de la ecuación 3.

3.2.8.2. Polifenoles Totales

Los Polifenoles totales se midieron siguiendo la metodología propuesta por **VASCO & RUALES (2008)**, las determinaciones se realizaron por duplicado. En esta metodología se produce la reducción de un complejo de fosfowolframato - fosfomolibdato para formar productos de color azul debido a los compuestos fenólicos, para esto se realizó una curva estándar de Ácido Gálico en un rango de concentración de 50 a 200 ppm como se muestra en la tabla V.

Tabla V. Preparación de la curva patrón de Ácido Gálico

Ácido Gálico		Solución stock de ácido gálico de 200 mg/L			
Std. Peso (g)	Peso total (g)	mg/L	P. sol. 5 ml (g)	P.teórico (g)	Factor
0,0000					
0,0249	0,0981	50,76	5,1843	5,1690	0,99704878
0,0491	0,0979	100,31	5,2094	5,1693	0,99230238
0,0732	0,0967	151,40	5,1763	5,1645	0,99772038
0,0975	0,0975	200,00	5,2700	5,1644	0,97996205

Nota: La fila de Std. Peso indica el peso en (g) del volumen necesario para realizar las diluciones a las concentraciones de prueba de 50, 100 y 150 ppm; la fila Peso total indica el peso en (g) del complemento con agua destilada para alcanzar 0,1 mL; la fila mg/L es la concentración final estimada mediante los pesos aplicando la ecuación 4; La fila P. sol. 5 mL es el peso experimental determinado con los reactivos de la mezcla 0,1 mL de follin, 0,1 mL de ácido gálico y 2 mL de Carbonato de sodio, complementando con agua destilada a 5 mL, la fila P. teórico indica el peso de las mezclas estimadas con el aforo a 5 mL, el factor de corrección se obtiene dividiendo el peso teórico para el experimental el cual indicará la corrección de las concentraciones de prueba.

Se trabajó mediante el peso de los volúmenes requeridos para la preparación de la curva estándar. Se preparó una solución stock 0,5 mL de ácido gálico 200 mg/L, a partir de ésta solución se prepararon 3 diluciones de 150, 100 y 50 ppm 0,1 mL de cada una por medio de la siguiente ecuación:

$$P_1 \cdot C_1 = P_2 \cdot C_2 \quad [\text{EC. 4}]$$

Donde:

P_1 = Peso del volumen de la solución stock de ácido gálico (g)

C_1 = Concentración de la solución stock de ácido gálico (mg/L)

P_2 = Peso del volumen completado a 0,1 mL de la solución diluida (g)

C_2 = Concentración de la solución diluida de ácido gálico (mg/L)

Dichas concentraciones se llevaron a un aforo de 5mL según la metodología propuesta por **VASCO & RUALES (2008)**, de igual manera se prepararon las soluciones mediante peso de los volúmenes de aforo, donde se determinó teóricamente el peso final del aforo (5mL). Sabiendo que se diluyó un poco más las soluciones de la curva, entonces se determinó el peso final del aforo el cual resultó ser mayor por lo tanto las concentraciones disminuían y para eso se determinó un factor de corrección que se obtuvo dividiendo el valor teórico para el experimental y se multiplicó por los valores de concentración inicial.

Una vez preparada la curva estándar se midió las absorbancias a 750 nm en el espectrofotómetro UV y se obtuvo la ecuación para poder expresar los resultados.

Tabla VI. Valores de Absorbancia a 750 nm de la Curva Patrón

Conc.	Absorbancia
mg/L	750 nm
0,00	0,0000
50,61	0,0955
99,53	0,1865
151,05	0,2630
195,99	0,3565

Nota: Absorbancias obtenidas a 750 nm de la curva de Ácido Gálico

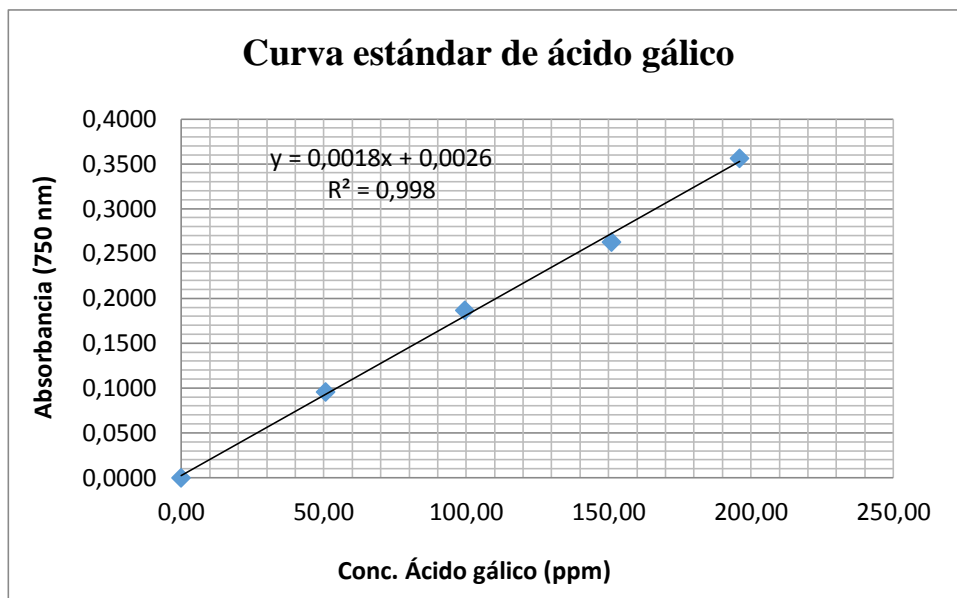


Figura 3. Curva Patrón de Ácido Gálico

Nota: El gráfico indica el comportamiento de la curva patrón desde 50 a 200 ppm y esquematiza la tendencia lineal para la obtención de la ecuación de la recta.

$$[\text{Polifenoles ppm}] = \frac{\text{Abs a } 750 \text{ nm} - 0,0026}{0,0018} \quad [\text{EC. 5}]$$

Para determinar los Polifenoles presentes en los extractos de prueba se procedió a realizar una dilución (1/15) para cada muestra, a estas diluciones se las colocó en tubos eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. Se preparó 50 ml de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) [75 g/L].

Tabla VII. Preparación de muestras para Determinación de Polifenoles

COMPONENTES	BLANCO (ml)	MUESTRA (ml)
EXTRACTO	-	0,1
FOLLIN	0,1	0,1
Na_2CO_3	2,0	2,0
H_2O destilada	0,1	-

Nota: Cantidades necesarias para la preparación de muestras para el ensayo con Follin- Ciocalteu. Una vez colocadas las cantidades en cada recipiente se llevó a un volumen final de 5 mL con agua destilada y se agitó en el bortex durante 3 minutos.

Las absorbancias se leyeron a 750 nm. Para la lectura en el espectrofotómetro se llevó el volumen de las preparaciones detalladas en la Tabla VII a un volumen final de aforo de 5 mL con agua destilada.

El ensayo se realizó por duplicado y a partir de la curva patrón de ácido gálico se obtuvo la concentración de polifenoles en [mg/L], presentes en cada muestra luego de multiplicar por el factor de dilución aplicado.

Tabla VIII. Polifenoles Totales presentes en los tratamientos experimentales

Tratamiento	Abs	Polifenoles Totales [mg/L]* FD	Abs	Polifenoles Totales [mg/L]* FD
Réplica		R1		R2
1	0,1100	895	0,1066	866,6667
2	0,1556	1275	0,1490	1220
3	0,3080	2545	0,3150	2603,3333
4	0,0643	514,1667	0,0583	464,1667
5	0,0753	605,8333	0,0756	608,3333
6	0,0740	595	0,0793	639,1667
7	0,0806	650	0,0810	653,3333
8	0,1936	1591,6667	0,1933	1589,1667
9	0,2506	2066,6667	0,2466	2033,3333

Nota: Absorbancias mediadas por duplicado en muestras experimentales determinación de la concentración de polifenoles en [ppm] a partir de la curva patrón.

Los datos de Sólidos Totales y Polifenoles Totales se expresaron uno en función del otro para obtener la concentración en [mg de Polifenoles]. Mediante el software estadístico Statgraphics Centurion, se analizó el diseño factorial 3^2 y se obtuvo el mejor tratamiento.

3.2.8.3. Determinación del pH

Se determinó el pH por medio del uso del Ph metro colocando el bulbo del equipo previamente calibrado en cada uno de los extractos obtenidos.

3.2.9. Obtención y análisis del extracto vegetal a escala de banco

Se utilizó un reactor tipo agitador con calentamiento directo de 15 L de capacidad. Se pesó la cantidad proporcional a la relación (material vegetal: agua osmotizada) en un volumen de 9 L de disolvente. Se colocó 9 L de agua osmotizada en el reactor regulando la temperatura a 90 °C, para luego colocar el material vegetal con regulación de las revoluciones del agitador a 1500 rpm durante el tiempo establecido por el mejor tratamiento, transcurrido ese período se filtró el producto de la extracción mediante embudo y lienzo, se desechó la torta y se midió el volumen final obtenido el cual fue almacenado en refrigeración y protegido de la luz, posteriormente se midió el pH del mismo.

3.2.10. Concentración del extracto madre al 5% de sólidos totales

Para concentrar el extracto madre al 5 % de sólidos totales se procedió a determinar la cantidad de los mismos en el extracto según el procedimiento descrito en el paso

(3.2.8.1), adicionalmente se aplicó la siguiente ecuación con la cual se determinó el volumen final del extracto madre concentrado.

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \quad [\text{EC. 6}]$$

Donde:

V_1 = Volumen inicial del extracto (mL)

C_1 = Concentración final de sólidos totales en el extracto (%)

C_2 = Concentración al 5% de sólidos totales en el extracto (%)

V_2 = Volumen final del extracto (mL)

$$V_2 = \frac{6000 \text{ mL} \cdot 0,6410 \%}{5\%}$$

$$V_2 = 769,2 \text{ ml}$$

Para llegar al volumen final del 5% de sólidos totales se utilizó el Rotoevaporador a 319 hPa de presión, 100 rpm y 90°C de temperatura.

3.2.11. Determinación de Polifenoles del extracto madre antes y después de concentrar al 5% de sólidos totales

Se determinó los Polifenoles totales del extracto madre antes y después de concentrarlo al 5% de sólidos totales en el Rotoevaporador utilizando el método propuesto en el paso (3.2.8.2) con un factor de dilución (1/50).

3.2.12. Secado por aspersion del extracto Hidrosoluble de la Cáscara de Coco Verde (*Cocos nucifera*)

Se utilizó 380 ml de extracto y se precalentó en baño María, luego se colocó la manguera de absorción del Spray Dryer y se programó a una temperatura de entrada de 120°C con una temperatura de salida de 80°C. Una vez que el equipo comenzó a absorber el líquido el material particulado fue recolectado y pesado para la determinación del rendimiento de secado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento secado} = \frac{\text{Peso obtenido (g)}}{\text{Peso teórico (g)}} * 100 \quad [\text{EC. 7}]$$

3.2.13. Formulación para la formación de liposomas mediante secado por aspersion

La formulación de liposomas se llevó a cabo según el método propuesto por (**López, Gómez, 2008**), utilizando fosfatidilcolina 5 gramos por cada 10 gramos de extracto y lactosa monohidratada en proporción 1:1 a la cantidad de extracto usado, se precalentó el extracto concentrado hasta 70°C en baño María y se mezcló con fosfatidilcolina y lactosa, a esta formulación se la llevó al Spray Dryer y se determinó su rendimiento de manera similar al procedimiento propuesto en el paso (3.2.12).

3.2.14. Determinación de Polifenoles Totales del extracto en polvo y Liposomas

Los Polifenoles totales presentes en el polvo y liposomas obtenidos del secado por aspersion se determinaron realizando una resuspension de las muestras en agua osmotizada y se realizó el procedimiento descrito en el paso (3.2.8.2) con un factor de dilucion de (1/50).

3.2.15. Análisis de liposomas por espectrofotometría infrarroja para la determinación de compuestos y eficacia del encapsulamiento

Se llevó a cabo la comprobación del encapsulamiento del principio activo con la capa fosfolipídica mediante el uso del espectrofotómetro IR.

Se realizó mediciones para: el extracto en polvo sin encapsular (muestra 1), la mezcla de fosfatidilcolina y lactosa (muestra 2) y para el liposoma (muestra 3). Se realizó la corrida con el software del IR y se obtuvieron los picos de absorción a diferentes longitudes de onda, el mismo procedimiento se realizó para la muestra 2 y 3 respectivamente. Con las longitudes de onda y transmitancias obtenidas se comparó bibliográficamente para determinar los compuestos presentes en las muestras.

Tabla IX. Grupos Funcionales presentes a distinta longitud de onda

Familia	Grupo Funcional	Banda (cm⁻¹)	Asignación
Alcoholes y fenoles	OH libre	3580- 3670 (aguda)	
	OH asociación intermolecular	3400- 3600 (aguda)	
	OH asociación intermolecular (dímero)	3400- 3500 (aguda)	O-H
	OH asociación intermolecular (polímero)	3200- 3400 (ancha)	
	ROH primarios	1050	
	ROH secundarios	1100	C-O
	ROH terciarios	1150	
	Fenoles	1180	
	ROH y Fenoles	1200- 1400	O-H

Nota: La tabla muestra los rangos de longitud de onda a los cuales aparecen los grupos funcionales de los alcoholes y fenoles.

Fuente: Rojo, UNAM-2012.

Tabla X. Frecuencias ejemplo de grupos de compuestos hetero- oxigenados sencillos

Frecuencia (cm⁻¹)	Grupo Funcional
	Compuestos Oxi- Nitrogenados
1560-1540/ 1380- 1350	Compuestos nitro alifáticos
1555-1485/ 1355- 1320	Compuestos nitro Aromáticos
1640- 1620/ 1285- 1270	Nitratos Orgánicos
	Compuestos Oxi- Fosforados
1350-1250	Fosfatos orgánicos (P=O)
1050-990	Fosfatos alifáticos (P-O-C)
1240-1190/995-850	Fosfatos Aromáticos (P-O-C)
	Compuestos Oxi- Sulfurados
1335-1300/ 1170-1135	Dialquil/Aril sulfonas
1420-1370/1200-1180	Sulfatos Orgánicos
1365-1340/ 1200- 1100	Sulfonatos
	Compuestos Oxigenados de silicio
1095-1075/1055-1020	Siloxano Orgánico o silicona (Si-O-Si)
1110-1080	Siloxano Orgánico o silicona (Si-O-C)

Nota: Compuestos hetero- oxigenados, enlaces con Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Silicio.

Fuente: Coates, 2000. Interpretation of Infrared Spectra.

3.2.16. Análisis del Tamaño de partícula mediante Microscopía Electrónica de Barrido

El tamaño, forma y superficie de los liposomas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido, donde en base a la distribución de partículas se estableció un tamaño promedio, el análisis se efectuó, en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas, Escuela Superior Politécnica del Ejército en la ciudad de Quito, la preparación de la muestra consistió en la fijación de una cantidad pequeña sobre una placa porta muestras metálica (diámetro 1cm), una vez preparada la placa se fijó la muestra a un metalizador al vacío (Q150R), donde se la recubrió con oro a 20 nm de espesor; finalmente se colocó en el microscopio electrónico de barrido para su evaluación durante una hora.

3.2.17. Análisis y evaluación *In vitro* de los compuestos contenidos en el extracto

La actividad antiinflamatoria se evaluó según la metodología propuesta por **Janeta (2015)** la cual se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio altamente soluble en agua WST-1 en presencia de neutrófilos activados.

La técnica de actividad antiinflamatoria mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Esta técnica es sensible, rápida y sencilla cuando la comparamos con otras técnicas de medida de la proliferación celular (**INNOPROT, 2008**).

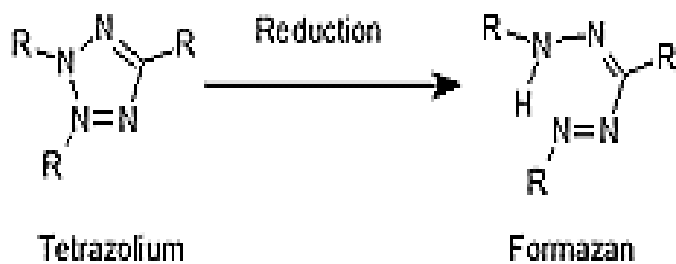


Figura 4. Reducción de Tetrazolio a Formazan

Nota: Los "Rs" sustituido de diversos grupos orgánicos que definen las diversas sales de tetrazolio y proporcionan a sus características químicas únicas.

Fuente: (INNOPROT, 2008).

3.2.17.1. Aislamiento y conteo de neutrófilos

Se preparó solución modificada de Hanks 9,5 g/l. Se extrajo 10 ml de sangre venosa con una jeringa estéril y se trasvasó a cuatro tubos de centrífuga, posteriormente se adicionó 0,25 ml de heparina sódica a cada tubo, a ésta mezcla se añadió la solución modificada de Hanks en proporción 1:1 con la cantidad de sangre presente en cada tubo. Posterior a esto los neutrófilos fueron estabilizados y se añadió el Ficoll paque en relación 4:3 con la sangre. Una vez listos los tubos se llevaron a la centrífuga a 15000 rpm durante 30 minutos para separar el plasma, los neutrófilos el Ficoll y los glóbulos rojos.



Figura 5. Separación de los componentes sanguíneos

Nota: Primera fase Plasma; Segunda fase Neutrófilos; Tercera fase Ficoll paque; Cuarta fase Glóbulos Rojos y Plaquetas.

Se separó la primera capa de plasma y se trasvasó a un tubo de ensayo el cual se almacenó en la incubadora a 37°C posteriormente a este proceso se recolectó la siguiente capa de neutrófilos y se trasvasó a un tubo de centrifuga estéril.

Al volumen de neutrófilos obtenidos se agregó una cantidad de Solución modificada de Hanks en proporción 1:3 y se centrifugó la mezcla a 15000 rpm durante 10 minutos a fin de purificar los neutrófilos; se desechó el sobrenadante y se conservó el precipitado con los neutrófilos puros. El volumen de neutrófilos obtenido se resuspendió a 6 ml con la solución modificada de Hanks y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

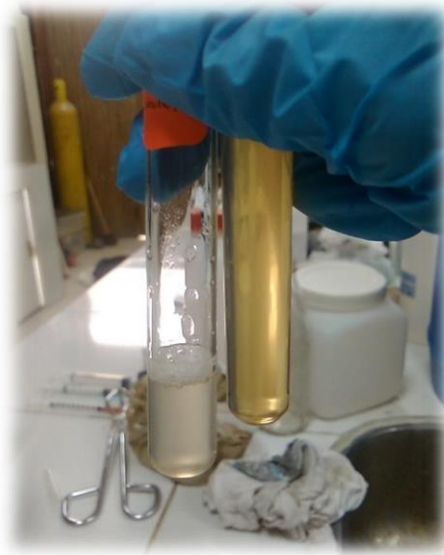


Figura 6. Recolección de Neutrófilos y Plasma

Nota: Tubo izquierdo: Neutrófilos purificados; Tubo derecho Plasma Sanguíneo

Una vez estabilizados los neutrófilos se colocó una gota sobre la cámara de Neubauer (Hemocitómetro) adicionalmente se le agregó una gota de la solución de Turk para visibilizar los neutrófilos, y se observó con el lente de 100 X los neutrófilos presentes como se muestra en la siguiente figura:

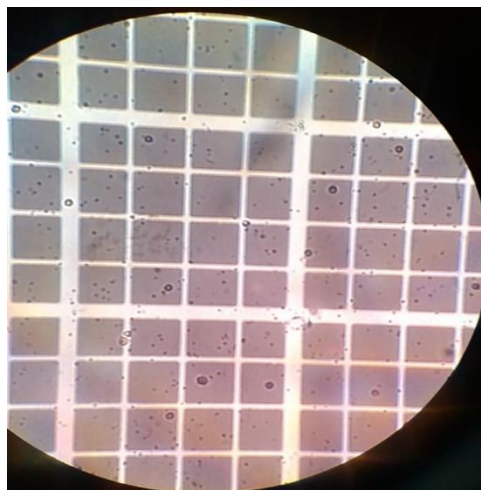


Figura 7. Enfoque de Neutrófilos en Placa Neubauer

Nota: Enfoque 100 X, los puntos pequeños representan a los neutrófilos el conteo se lo realizo en la cuadrícula intermedia.

Se procedió al conteo según la metodología propuesta por **Janeta (2015)**, tomando en cuenta las subdivisiones de la cámara. Se obtuvo un promedio de 89,5 neutrófilos es decir se llegó a una concentración aproximada de 10^4 neutrófilos/ μ l, el tubo se almacenó en la incubadora a 37°C durante 1 hora.

Tabla XI. Obtención de Neutrófilos de la Sangre

Componentes	Cantidad
Volumen de células sin purificar	6ml
Volumen de células purificadas	4 ml
Volumen de Plasma	8 ml

Nota: Volúmenes reales de plasma y neutrófilos en ml.

3.2.17.2. Protocolo para la Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria

Una vez aislados los neutrófilos de la sangre se procedió a preparar las soluciones de control y prueba.

Solución diluyente

- Dimetilsulfóxido al 5%: Se preparó 5 ml de solución diluyente mediante la mezcla de 0,23 ml de Dimetilsulfóxido y se completó el volumen con 4,77 ml de solución modificada de Hanks.

Soluciones Control.

- Control positivo: Se preparó 1 ml de Dimetilsulfóxido al 5% midiendo 0,05 ml de DMSO y añadiendo 0,95 ml de solución modificada de Hanks.
- Control negativo: Se preparó 10 ml de Tritón X-100 al 0,1 % midiendo 0,025 ml del reactivo y llevándolo al volumen final con 9,975 ml de solución modificada de Hanks.
- Control Comparativo: Se preparó 25 ml de solución de Aspirina a una concentración de 200 ppm con solución modificada de Hanks.

Soluciones Madre:

Tanto para la solución del extracto en polvo y el liposoma se prepararon 25 ml de cada uno a una concentración de 200 ppm y se codificó como (C1), con solución modificada de Hanks.

Protocolo para la preparación de los compuestos de prueba a tres concentraciones distintas:

Los compuestos de prueba se realizaron a las concentraciones de 100 ppm (C2), 50 ppm (C3) y 25 ppm (C4), tanto para el extracto en polvo como para el liposoma y se partió de las soluciones madre respectivas.

De la solución madre (C1) se recogieron 600 µl y se mezclaron con 600 µl de solución diluyente, esta dilución se codificó como (C2); 500 µl de (C2) se mezclaron con 500 µl de solución diluyente, esta dilución se codificó como (C3), 400 µl de C3 se mezclaron con 400 µl de solución diluyente, esta dilución se codificó como (C4).

Para evaluar la actividad antiinflamatoria se realizaron las siguientes mezclas en micropocillos para ensayo Elisa.

Tabla XII. Preparación de compuestos para evaluar la Actividad Antiinflamatoria

Tratamientos	Compuestos de prueba y controles	Neutrófilos	WST-1
	μl	μl	μl
DMSO 5% (+)	100	140	10
Tritón X-100 0,1% (-)	100	140	10
Control Aspirina [200 ppm]	100	140	10
C1 [200 ppm]	100	140	10
C2 [100 ppm]	100	140	10
C3 [50 ppm]	100	140	10
C4 [25 ppm]	100	140	10

Nota: Cantidades de soluciones de control, prueba, neutrófilos y WST-1 (Sales de Tetrazolio) para cada pocillo en μl

Para iniciar la reacción se preparó previamente el compuesto inflamatorio. A 8 ml de plasma se agregó Zymozan A en proporción (3,8 mg por cada 1,5 ml de suero) y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado a 2 ml con solución modificada de Hanks.

A las preparaciones propuestas en la Tabla XII se les añadió 50 μl de Zymozan A opsonizado en cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Una vez transcurrido ese tiempo se sacaron los micropocillos de la incubadora y se leyó las absorbancias de cada uno a 450 nm en un fotómetro UV- VIS.

Tabla XIII. Absorbancias de los compuestos de prueba en ensayo Antiinflamatorio

Extracto en Polvo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs Promedio	Desvesta
DMSO 5% (+)	0,299	0,314	0,330	0,312	0,330	0,317	0,013
Tritón X-100 0,1 % (-)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Control Aspirina [200 ppm]	0,190	0,187	0,192	0,188	0,188	0,189	0,002
C1 [200 ppm]	0,181	0,181	0,187	0,185	0,191	0,185	0,004
C2 [100 ppm]	0,239	0,229	0,235	0,237	0,240	0,236	0,004
C3 [50 ppm]	0,249	0,255	0,247	0,248	0,256	0,251	0,004
C4 [25 ppm]	0,266	0,301	0,292	0,254	0,227	0,268	0,030
Liposoma	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs Promedio	Desvesta
DMSO 5% (+)	0,244	0,249	0,250	0,254	0,253	0,250	0,004
Tritón X-100 0,1 % (-)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Control Aspirina [200 ppm]	0,115	0,111	0,119	0,117	0,113	0,115	0,003
C1 [200 ppm]	0,101	0,110	0,104	0,107	0,103	0,105	0,004
C2 [100 ppm]	0,166	0,167	0,169	0,165	0,173	0,168	0,003
C3 [50 ppm]	0,187	0,189	0,189	0,182	0,198	0,189	0,006
C4 [25 ppm]	0,199	0,201	0,201	0,197	0,177	0,195	0,010

Nota: Se midió las absorbancias de cada compuesto a 450 nm por quintuplicado y se registró el promedio y la desviación estándar de cada una

La actividad antiinflamatoria se determinó por método colorimétrico la cual indicaba que a mayor intensidad de color mayor inhibición de inflamación y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad Antiinflamatoria} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Absorbancia de los compuestos de Prueba}}{\text{Absorbancia del Control Positivo}} \right) * 100 \right]$$

Fuente: (Muhammad, et al, 2005)

[EC. 8]

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y Discusión de los resultados

4.1.1. Caracterización físico - química del material vegetal (*Cocos nucifera*)

Las cáscaras de coco verde son un material vegetal muy susceptible a la absorción de la humedad ambiental, después de haber sometido dichas cáscaras al proceso de secado se evidenció que cambiaron su color y también consistencia lo cual facilitó la reducción del tamaño de partícula. Al cabo de 30 días de haber expuesto el material vegetal a la luz solar éstas fueron variando su coloración debido a la pérdida de sales minerales y clorofila. Como se muestra en el siguiente cuadro:

Tabla XIV. Caracterización física del material según la coloración antes y después del tratamiento

Cáscara de Coco Verde			
	Antes del secado	Después del secado	Pulverizado
Color	Verde Selva	Caqui	Café chocolate

Nota: El material vegetal se secó durante 1 mes al sol protegido de la humedad, y se pulverizó en un molino eléctrico ensamblado.

Se redujo el material seco a un tamaño de partícula gruesa por medio de un molino eléctrico de discos. El coco por naturaleza presenta grandes cantidades de fibra en su recubrimiento externo, esto hace difícil que se pueda llegar a un tamaño homogéneo sin tener pérdidas considerables; para **Vargas y colaboradores (2008)** el mesocarpio del coco es un tejido fibroso que brinda un porcentaje del 50% de polvo fino. Según dicho estudio al usar un molino eléctrico de cuchillas obtuvieron menor cantidad de fibra y mayor cantidad de polvo en el análisis granulométrico se usaron series de

tamices de Taylor del rango de 4 mm a 0,1 mm de diámetro, obteniendo partículas menores (<) a 0,1 mm de diámetro por lo que se consideró partícula fina, mientras que en el presente estudio se utilizó una serie de tamices de Taylor del rango de 2 mm a 1 mm de abertura donde la mayor cantidad de partícula en polvo paso por el tamiz de abertura de 1 mm de diámetro por lo que se consideró como partícula gruesa debido a que existe mayor eficacia al usar un molino eléctrico de cuchillas que uno de disco.

Tabla XV. Tamaño de partícula luego de la molienda

ABERTURA (mm)	MESH TYLER (in)	Residuo en cada tamiz (g)
2	9	0,077
1,68	10	0,1051
1,41	12	0,3102
1,2	13	1,0671
1,19	14	1,5444
1	16	21,7702

Nota: El material vegetal se pulverizó en un molino eléctrico de discos y se tamizó según el mesh de Taylor.

El tamaño de partícula fue de aproximadamente 1 mm de diámetro al ser de tamaño reducido aumentó la disponibilidad de extraer de mejor manera los Polifenoles presentes en la corteza del coco dado que a mayor superficie de contacto dado que difunden más fácilmente los metabolitos (**Pérez, et al, 2011**).

La textura de la cáscara de coco verde es fibrosa y suave en el interior, pero externamente es dura debido a la gran cantidad de tejidos que la compactan, al haber sometido al material vegetal a un proceso de secado, la humedad disminuyó volviendo a la cáscara fragmentable para la posterior reducción del material a polvo grueso. El polvo presentó una textura esponjosa debido a la cantidad de fibras presentes en la estructura.

El análisis de humedad y cenizas se realizó por duplicado, los valores promedios obtenidos indicaron una alta afinidad del material a la absorción de la humedad ambiental, sin embargo, los valores de cenizas al momento de eliminar la materia

orgánica indicaron porcentajes menores al 10% de materia inorgánica, según **Hernández, et al., (2009)**, la composición química de las cenizas de la cáscara de coco verde contiene un 20,46 % de sales de aluminio, hierro, y carbonatos.

Para **Vargas, et al. (2008)**, el contenido de humedad del coco verde varía entre el 60 al 70 %. Una vez que se somete el material vegetal a un proceso de secado este elimina la mayor cantidad de agua mediante la evaporización reduciendo su humedad hasta el 10 – 20%, sin embargo, nunca se alcanzan valores superiores al 90 % de eliminación del contenido interno de agua.

Tabla XVI. Contenido de Humedad y Cenizas de la Cáscara de Coco Verde

Material Vegetal	Humedad (%)	Muestra	Cenizas (%)
Sin exponer al sol	65,296	Después de secar en balanza	6,769
Expuesto al sol	11,770	infrarroja	5,003



Figura 8. Cenizas del material vegetal antes y después del proceso de secado

Nota: La cápsula de la parte superior indica las cenizas del material vegetal que no fue sometido al proceso de secado, la cápsula inferior indica las cenizas del material vegetal que se sometió al proceso de secado al sol por 30 días.

Los datos obtenidos experimentalmente guardan semejanza con los reportados en la bibliografía, el porcentaje de humedad obtenido después del proceso de secado demostró la efectividad del mismo al reducir la cantidad de agua en el material vegetal en un 53,52%, por otra parte la cantidad de materia inorgánica determinada mediante cenizas se redujo en 1,7%, dicha variación resultó debido a las condiciones

experimentales por lo tanto dicho valor no se consideró una variación significativa en el porcentaje de cenizas ya que con el proceso de secado se elimina agua más no sales minerales.

4.1.2. Determinación del mejor tratamiento para la extracción a escala de banco

Los ensayos a escala de laboratorio se realizaron mediante el diseño factorial 3^2 , el análisis estadístico para dichos tratamientos propuestos se basó en la respuesta experimental de Sólidos totales y Polifenoles totales presentes en los extractos hidrosolubles.

Las absorbancias obtenidas a 750 nm de los extractos hidrosolubles se encuentran detalladas en la Tabla VIII donde se pudo constatar la presencia de compuestos fenólicos mediante el método del Follin Ciocalteu. Debido a esto los resultados obtenidos determinaron la existencia de una baja cantidad de sólidos totales en los extractos sin embargo la cantidad de Polifenoles totales se mantuvieron en cantidades considerables.

El análisis estadístico se llevó a cabo una vez que se expresó el contenido de sólidos en función de los Polifenoles para obtener la respuesta experimental [mg de Polifenoles] en base seca.

Tabla XVII. Respuesta Experimental en mg de Polifenoles en base seca

Tratamiento	[mg Polifenoles/g de Sólidos]	[mg Polifenoles] base seca	[mg Polifenoles/g de Sólidos]	[mg Polifenoles] base seca
Réplica	R1		R2	
1	174,6682	326,6750	167,9586563	316,3333
2	131,0111	286,8750	126,1373036	274,5000
3	142,7210	279,9500	151,2510651	286,3667
4	116,6440	192,8125	112,6618123	174,0625
5	87,6495	150,8525	85,63250751	151,4750
6	45,2265	68,4250	50,72751323	73,5042
7	186,9965	253,5000	182,699478	254,8000
8	235,3144	397,9167	238,4703882	397,2917
9	154,9690	279,0000	159,5522076	274,5000

Nota: Las absorbancias a 750 nm se corrigieron con el factor de dilución y se expresaron en función de los sólidos totales para obtener los mg en base seca de polifenoles totales.



Figura 9. Sólidos Totales y muestras para determinación de Polifenoles Totales en ensayos experimentales

Nota: La imagen de la izquierda muestra las cápsulas con los sólidos totales presentes en los ensayos experimentales; la imagen de la derecha ilustra el cambio de coloración para la determinación de polifenoles totales a 750 nm.

El análisis del diseño experimental llevado a cabo en Statgraphics Centurión evaluó los datos experimentales a través del análisis de varianza y la optimización del

experimento con lo cual se logró determinar el mejor tratamiento. La tabla ANOVA indicó la significancia estadística entre los efectos de los tratamientos de la siguiente manera:

Tabla XVIII. Análisis de Varianza para Polifenoles expresados en base seca

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Material Vegetal: Disolvente	620,762	1	620,762	0,24	0,6348
B: Tiempo	5480,01	1	5480,01	2,09	0,1721
AA	111717,	1	111717,	42,57	0,0000
Bloques	61,1371	1	61,1371	0,02	0,8810
Error total	34117,4	13	2624,41		
Total (corr.)	151996,	17			

Nota: La Tabla ANOVA muestra la significancia al 95% de confianza de los tratamientos realizados en el experimento, donde únicamente en la interacción de relación material vegetal: disolvente presenta relevancia.

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016.

La Tabla XVIII mostró entonces la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. El análisis llevado a cabo indicó que los efectos (interacciones) tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%. Esto se evidencia en el diagrama de Pareto donde únicamente el factor AA tiene mayor incidencia experimental siendo relevante únicamente la proporción material vegetal: disolvente.

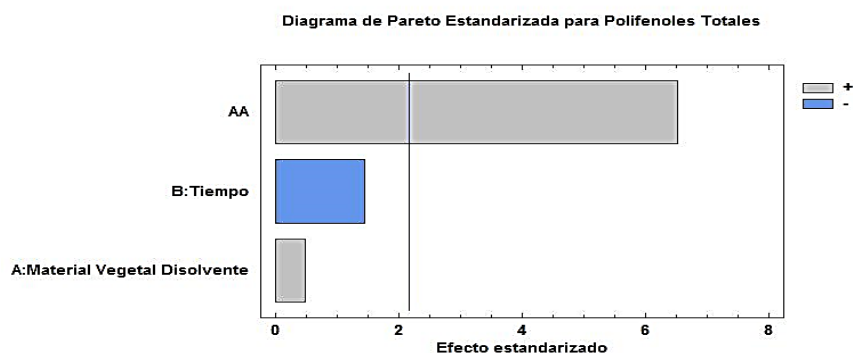


Figura 10. Diagrama de Pareto de Efectos Incidentes en el experimento

Nota: El diagrama de Pareto muestra que el 80% del factor material vegetal: Disolvente tiene un efecto cuadrático siendo el más significativo entre ambos factores.

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016.

Por otra parte, mediante el análisis de Optimización de respuesta se logró obtener el mejor tratamiento teniendo en cuenta lo reportado en el Análisis de Varianza del diseño experimental, el valor óptimo expresado en [mg Polifenoles] base seca fue de 330,871 siendo el tratamiento 7 el que cumplía con las características para la extracción madre.

Tabla XIX. Optimización de la Respuesta Experimental

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Material Vegetal: Disolvente	15,0	25,0	25,0
Tiempo	30,0	90,0	30,0

Nota: Se indican los límites superiores e inferiores entre los 9 ensayos experimentales y se determina la optimización en la extracción.

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016

Para la extracción madre el mejor tratamiento que conserva de mejor manera los Polifenoles y aprovecha la cantidad de sólidos totales presentes en el extracto fue el tratamiento 7 que describe la relación material vegetal: agua osmotizada (1:25) con un tiempo de extracción de 30 minutos a temperatura de ebullición constante 90°C y agitación constante de 1500 rpm.

El mejor tratamiento se ilustra en el gráfico de efectos de los factores donde se aprecia la optimización de la respuesta experimental, de igual manera la superficie de respuesta brindó una visión amplia de las interacciones en cada ensayo ratificando al ensayo 7 como el mejor tratamiento dado que la superficie tiende a crecer al momento de encontrarse en las relaciones de factores antes mencionadas.

Gráfica de Efectos Principales para Polifenoles Totales

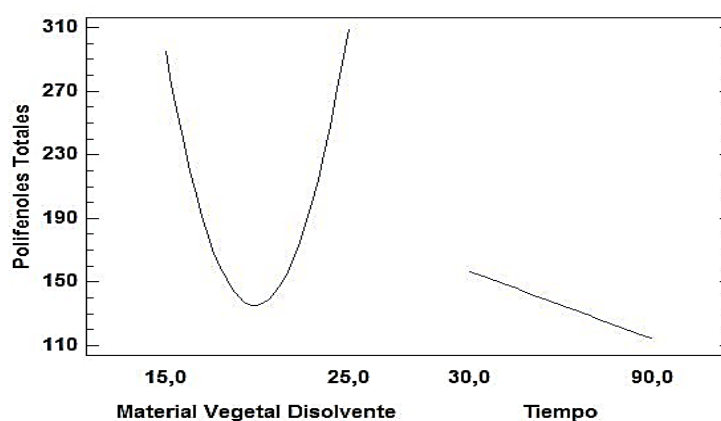


Figura 11. Efectos de los Factores de Prueba

Nota: El gráfico muestra los principales efectos para la optimización de polifenoles en base seca, indicando un máximo a 25 (relación) y otro a 30 min (tiempo).

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016.

Como se puede observar en el gráfico de efectos a una relación 1:25 entre material vegetal y agua osmotizada el tiempo promedio donde se alcanzó un máximo fue a 30 minutos.

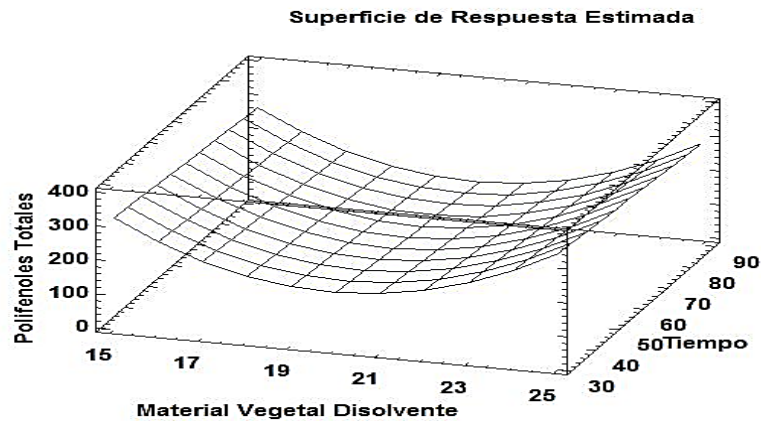


Figura 11. Superficie de respuesta de los tratamientos experimentales

Nota: La superficie de respuesta muestra la tendencia de los experimentos a alcanzar puntos máximos donde el área es más amplia por lo tanto optimiza el rendimiento de la respuesta experimental

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016

La superficie de respuesta de los tratamientos llevados a cabo indicó una mayor expansión e inclinación en los valores cercanos a 25 y en el período de tiempo de 30 minutos, este comportamiento gráfico permitió respaldar al análisis de optimización para el mejor tratamiento.

Por su composición los compuestos fenólicos presentes en los extractos tienden a presentar pH ácido. En la investigación llevada a cabo por **Vargas y colaboradores (2008)**, el polvo de coco solubilizado presentó valores de pH entre 5,2 a 6,3. Para esta investigación el rango de pH fue de 5,2 a 6,6 esto se debe al contenido de microelementos presentes en los materiales vegetales leñosos.

Tabla XXX. Rangos de pH presentes en los tratamientos y extracto madre

Muestra	pH
MADRE	5,285
1	5,229
2	5,331
3	5,6895
4	5,27
5	5,5225
6	5,6835
7	5,471
8	6,1865
9	6,6835

Nota: Los valores de pH reportados son un promedio obtenido de la realización de dos mediciones para cada ensayo, nótese los valores ácidos en el rango de 5,2- 6,6 de pH.

Como se puede apreciar en la Tabla XX el pH para la extracción madre fue más ácido (5,85) que la del tratamiento del ensayo 7 (5,471), esto se debió al hecho del tamaño de la partícula dado que para los ensayos de laboratorio la partícula era más gruesa que el polvo grueso utilizado en el reactor de agitación. La superficie de contacto por ende era mayor y los fenoles pudieron difundirse de mejor manera.

4.1.3. Determinación de Sólidos Totales, Polifenoles en el Extracto Madre y el Concentrado al 5%

Los parámetros para poder llevar a cabo la obtención del extracto seco se basaron en la relación entre la cantidad de sólidos totales presentes en el extracto y los Polifenoles totales, según **Ochoa et, al, (2013)** la cantidad de sólidos totales presentes en un extracto líquido es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos propios del material vegetal, sin embargo en el presente estudio se determinó que la cáscara de coco verde contiene gran cantidad de polifenoles que no justifican la cantidad obtenida de sólidos totales, esto se debe a que la consistencia del material vegetal permite que se difunda de manera más fácil los metabolitos secundarios independientemente del contenido final de sólidos totales.

Tabla XXI. Sólidos Totales y Polifenoles Totales

Extracto Madre	Sólidos Totales (%)	Polifenoles Totales [ppm]	Polifenoles Totales [mg] base seca
Sin tratamiento	0,641	2413,888	14483,333
Concentrado	2,8245	12427,777	14416,222

Nota: Sólidos Totales y Polifenoles totales antes y después de concentrar al 5% mediante el Rotoevaporador.

La concentración final de sólidos totales teóricos fue del 5%, pero debido a la baja cantidad de sólidos presentes en el extracto hidrosoluble se llegó a una concentración del 2,82%, ya que si se evaporaba más disolvente en el rotoevaporador la cantidad de muestra hubiese sido mínima para ser secada en el Spray Dryer, la cantidad expresada en base seca de [mg de polifenoles] varió considerablemente al ser concentrada.



Figura 12. Sólidos Totales y Polifenoles Totales Antes y Después de Concentrar

Nota: La imagen superior izquierda muestra los sólidos totales antes de concentrar, la imagen inferior izquierda muestra los sólidos totales después de concentrar, la imagen derecha indica los tubos de izquierda a derecha los polifenoles antes y después de concentrar.

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016

A una concentración del 2,8% de sólidos se llegó a obtener 14416,222 [mg de Polifenoles en el extracto madre en un volumen final de 1,16 litros la cantidad disminuyó del extracto sin concentrar debido a las pérdidas en cuanto al uso del Rotoevaporador a las condiciones de 319 hPa y 90 °C de temperatura.

4.1.4. Análisis del proceso de Secado por Aspersión del Extracto Madre de cáscara de Coco Verde (*Cocos nucifera*) para la obtención de extracto seco y liposomas

La obtención del extracto seco y de los liposomas se realizó a partir del extracto concentrado al 2,8 % de sólidos totales, por medio de la utilización del Spray Dryer. De un volumen de 380 mL de extracto hidrosoluble concentrado se obtuvo 8,288 g de extracto en polvo, dicho extracto presentó coloración beige claro y su consistencia era similar al de una harina.

De un volumen de 777 mL de extracto concentrado preformulado con fosfatidilcolina y lactosa monohidratada para la formación de la membrana o cubierta fosfolipídica se obtuvieron 38,41 g de liposomas en polvo. Luego de haber sometido dicha mezcla al Spray Dryer; el peso teórico debía ser de 54,86 g, la variación se debió a las pérdidas por secado dentro de la máquina, pero se logró llegar a rendimientos mayores al 50% en el uso del equipo para la obtención del principio activo. Según **López, et al. (2008)** el uso del Spray Dryer para el secado de extractos acuosos permite obtener rendimientos elevados desde 50% en adelante, adicionalmente el uso de esta tecnología asegura la calidad del principio activo al eliminar todas las impurezas y microorganismos presentes en las muestras.

Tabla XXII. Rendimiento de obtención de Principios Activos mediante el uso del Spray Dryer

Muestra	Cantidad Total (g)	Rendimiento (%)
Extracto en polvo	8,288	77,21906998
Liposomas	38,4171	70,01997825

Nota: El rendimiento del secado por aspersión se determinó a partir de los valores teóricos de masa a obtener y los valores reales de masa obtenida después del proceso.

Se determinó la eficiencia de secado por medio de la cuantificación de polifenoles totales tanto en el extracto en polvo como en los liposomas.

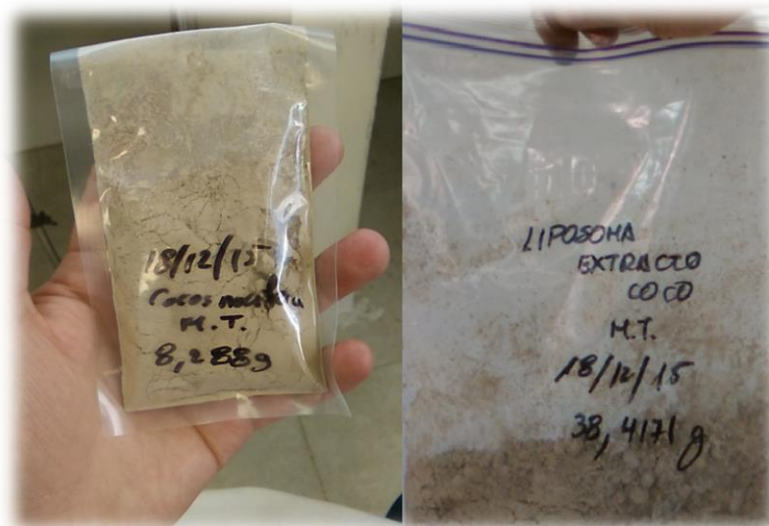


Figura 13. Extracto en Polvo y Liposomas Obtenidos mediante Secado por Aspersión

Nota: La imagen de la izquierda muestra el extracto seco de *C. nucifera*, la imagen de la izquierda muestra los liposomas obtenidos de la formulación de fosfatidilcolina con lactosa y extracto hidrosoluble de *C. nucifera*.

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016

Tabla XXIII. Contenido de Humedad del Extracto seco y Liposomas

Muestra	Humedad (%)
Extracto seco	9,437
Liposomas	6,082

Nota: Los porcentajes de humedad que se indican fueron obtenidos después de usar el Spray Dryer, para muestras secas el contenido de humedad debe ser inferior al 12%.

El contenido de humedad para las muestras de extracto seco de cáscara de coco y liposomas fueron menor al 10%. Según **García (2013)**, el contenido de humedad debe ser menor al 12% para principios activos sólidos secos, esto asegura que la proliferación de microorganismos sea mínima y el producto se pueda conservar de mejor manera a través del tiempo.

Tabla XXIV. Polifenoles Totales Obtenidos en el Extracto seco y Liposomas

Muestra	[ppm] promedio* FD (50)	[mg/g sol]	mg base seca
Polvo	13525	478,84	15689
Liposomas	8441,67	298,87	9792,33

Nota: Los polifenoles en los liposomas son menores debido a que se encuentran encapsulados en la capa fosfolipídica por eso no se detectan en su totalidad en el espectrofotómetro UV



Figura 14. Polifenoles presentes en el Extrato y Liposomas

Nota: La imagen de la izquierda muestra los polifenoles en el extracto seco de *C. nucifera*, la imagen de la izquierda muestra los polifenoles en los liposomas obtenidos de la formulación de fosfatidilcolina con lactosa y extracto hidrosoluble de *C. nucifera*.

Fuente: Statgraphics Centurion, 2016

En comparación al dato de polifenoles totales del extracto concentrado acuoso se obtuvo un valor de 14416,2 [mg] en base seca, y después de haber utilizado el Spray Dryer se obtuvieron datos significativamente variables al ya mencionado, esto se debió a las pérdidas en el secado ya que al evaporar el disolvente de la muestra los compuestos tienden a aglomerarse en las partículas sólidas.

Los liposomas presentan menor cantidad de polifenoles en comparación al extracto hidrosoluble al 2,8%, esto se debe a que al encontrarse los compuestos polifenólicos inmersos en una capa fosfolipídica es difícil identificar su presencia en el principio activo, y esto también significa que los polifenoles tienen una protección y mayor biodisponibilidad para ejercer su actividad antiinflamatoria ya que al entrar en

contacto con el tejido epitelial en una conglomeración de tejido adiposo los liposomas pueden ingresar fácilmente y adicionalmente pueden penetrar en la bicapalídica de células para poder actuar sin pérdidas de polifenoles.

4.1.5. Identificación de compuestos por Espectroscopia IR

El análisis de eficiencia en la formación de liposomas y el atrapamiento de los compuestos polifenólicos se evidenciaron mediante el análisis por espectroscopia IR, también se pudieron analizar los grupos funcionales presentes en el extracto vegetal, en la mezcla de fosfolípidos y los liposomas. Mediante dichos resultados se pudo inferir los posibles compuestos presentes en cada uno.

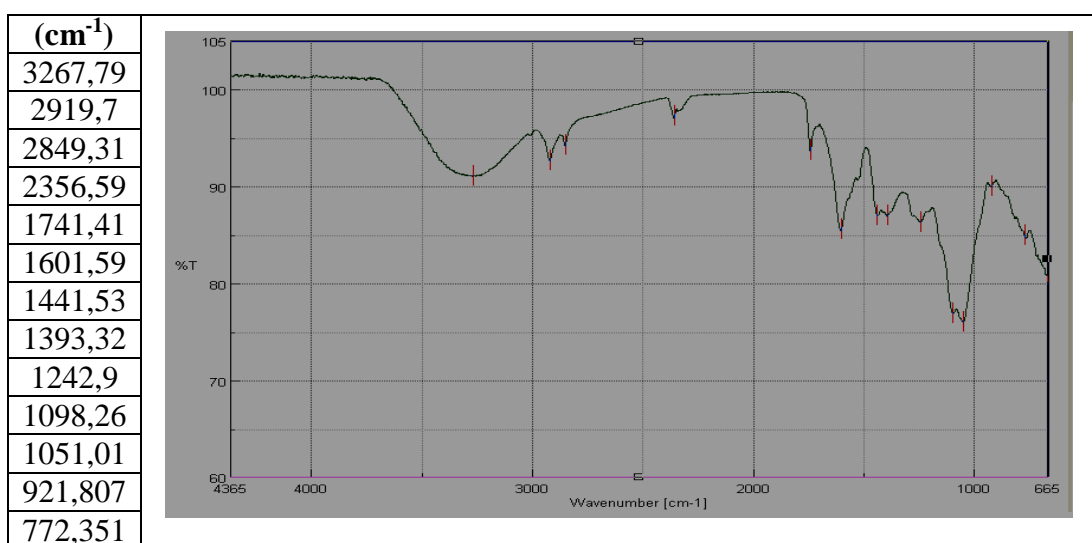


Figura 15. Espectros IR de los compuestos presentes en la muestra del Extracto en Polvo

Nota: Los espectros del extracto en polvo muestran picos referenciales a grupos funcionales perteneciente a alcoholes y fenoles.

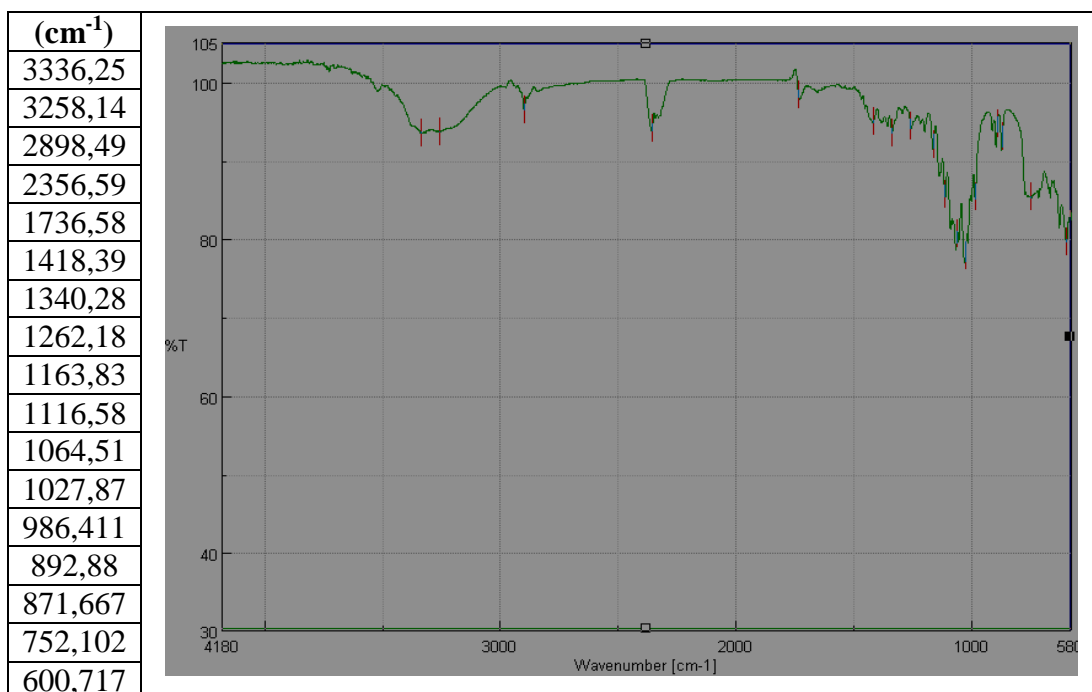


Figura 16. Espectros IR de los compuestos presentes en la muestra de Encapsulante

Nota: Los espectros del Encapsulante muestran picos referenciales a grupos fosfatos.

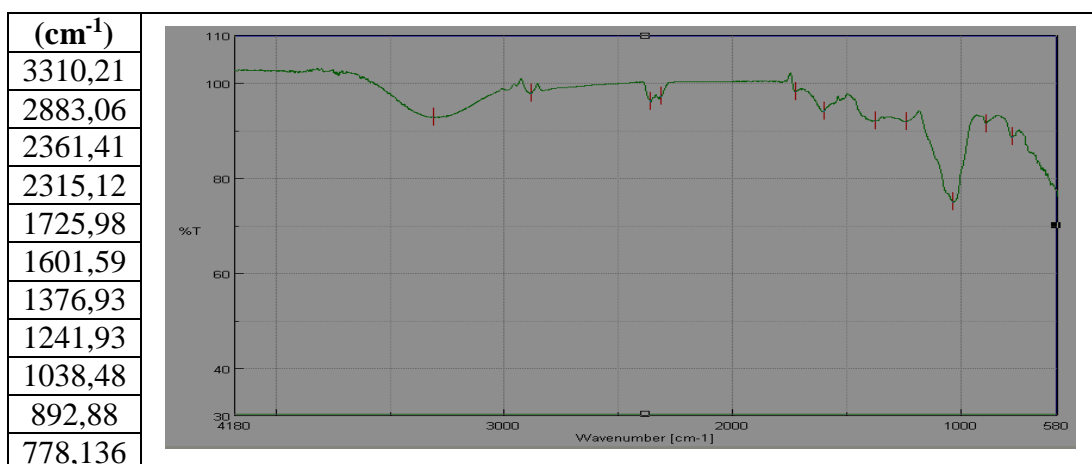


Figura 17. Espectros IR de los compuestos presentes en la muestra de Liposomas

Nota: Los espectros de los liposomas muestran picos referenciales a grupos de alcoholes, fenoles y grupos fosfatos.

Los diferentes espectros IR obtenidos muestran distintos picos a diferentes longitudes de onda, los posibles compuestos polifenólicos presentes en el extracto y liposomas se determinaron comparando las longitudes de onda obtenidas con las de bibliografía y se comprobó la presencia de grupos fenólicos y alcohólicos.

Tabla XXV. Longitudes de Onda y grupos Funcionales obtenidos en los Espectros del Infrarrojo

Espectro	Longitud de onda (cm-1)	Longitud de onda (cm-1) Bibliográfico	Grupo Funcional
EN POLVO EXTRACTO	3267,79	3400-3200	OH
	1601,59	1615-1580	Anillo Aromático
	1242,9	1400-1200	ROH y Fenoles
	1051,01	1050	ROH terciarios
ENCAPSULANTE	3336,25	3400-3200	OH
	3258,14	3400-3200	OH
	1340,28	1400-1200	ROH y Fenoles
	1262,18	1400-1200	ROH y Fenoles
	986,411	995-850	Fosfato aromático
	892,88	995-850	Fosfato aromático
LIPOSOMA	871,667	995-850	Fosfato aromático
	3310,21	3400-3200	OH
	1376,93	1400-1200	ROH y Fenoles
	1241,93	1400-1200	ROH y Fenoles
	892,88	995-850	Fosfato aromático

Nota: Comparación de Longitudes de onda obtenidas en los espectros de prueba con los reportados en la bibliografía para determinar la existencia de polifenoles.

Los espectros IR indicaron claramente la presencia de fenoles tanto en el extracto como en los liposomas además de grupos fosfato los mismos que pertenecen a la formación de la capa fosfolipídica de los liposomas. Según **Quiñones, et al, (2012)**, los compuestos polifenólicos que se encuentran en mayor cantidad en extractos vegetales son: Derivados del ácido Hidroxilbenzoico, Estilbenos, Alcoholes Fenólicos, Derivados del ácido hidroxinámico, Lignanos y Flavonoides.

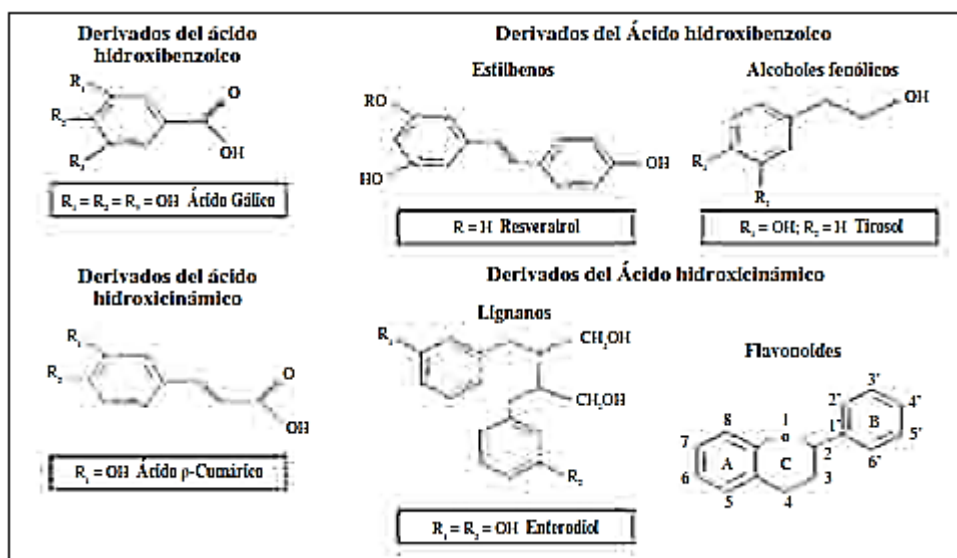


Figura 18. Compuestos Polifenólicos presentes en extractos vegetales

Nota: Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles. Se señalan los sustituyentes que corresponden a la estructura concreta de algunos compuestos. Se numeran los átomos de carbono del núcleo estructural de los flavonoides.

Fuente: Quiñones, et al, (2012)

Mediante la identificación por el número de onda se obtuvieron los datos necesarios para la determinación de la eficiencia de encapsulación del extracto en la capa fosfolipídica en efecto los picos de 3200 cm^{-1} a 3400 cm^{-1} se hicieron más pequeños, de igual manera los picos que se encontraban en la longitud de onda de 1200 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} , lo que demostró que los polifenoles habían sido capturados por la matriz del Encapsulante fosfolipídico.

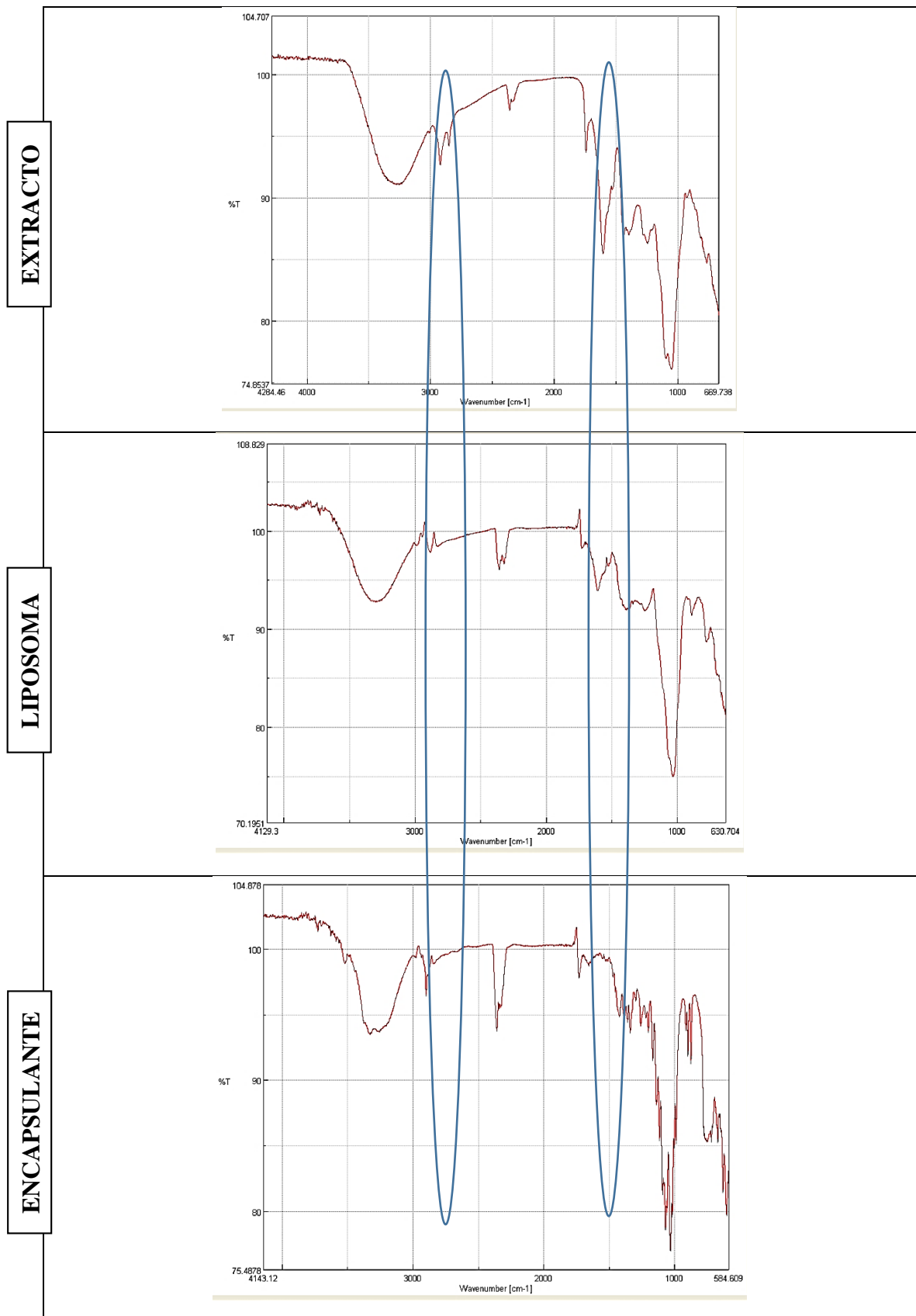


Figura 19. Comparación de Espectros IR para determinar Encapsulación de Polifenoles en Liposomas

Nota: Se señalan los picos con azul donde su intensidad ha disminuido debido al encapsulamiento de los grupos fenólicos por parte de los fosfolípidos.

4.1.6. Análisis del Tamaño de partícula de liposomas mediante Microscopía Electrónica de Barrido

La aplicación del análisis de tamaño de partícula por medio del uso de la Microscopía Electrónica de Barrido, permitió caracterizar la forma y superficie de los liposomas del extracto hidrosoluble de cáscaras de *C. nucifera*. La figura 23 muestra que las partículas se presentan en forma de agregados, esféricas, con una superficie lisa y libre de porosidades, sin embargo, se encuentran inmersas en mezcla de Encapsulante y extracto de *C. nucifera*.

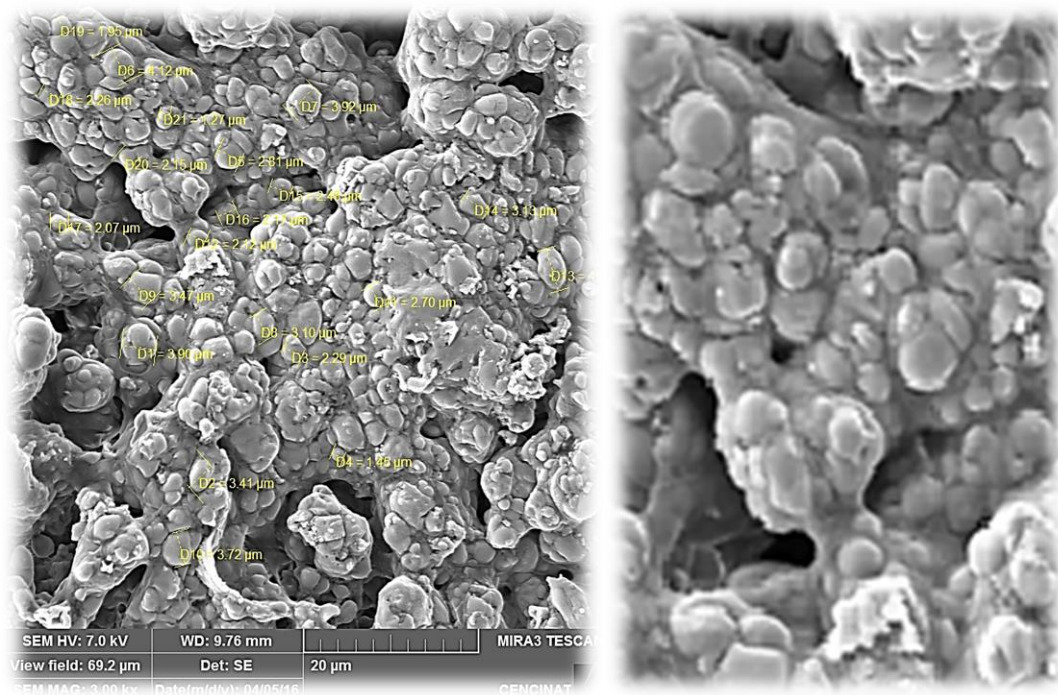


Figura 20. Morfología y tamaño promedio de las Partículas de Liposomas

Nota: La imagen indica la distribución de las partículas de liposomas definiendo su morfología y rango de tamaños en μm .

Los liposomas presentaron un tamaño promedio de $2,83 \pm 0,942 \mu\text{m}$, considerándose una micropartícula. Según el estudio realizado por **Ruano, (2013)**, donde se realizaron liposomas en un tamaño promedio de $1 \mu\text{m}$, estos tendían a formar agregados con los liposomas de menor tamaño, este comportamiento no tuvo ninguna significancia dado que al momento del uso de los liposomas aquellos agregados menores al tamaño de poro de las células son los que ejecutarán su acción de liberación del principio activo que contienen internamente.

4.1.7. Resultados de la evaluación in vitro de la Actividad Antiinflamatoria del extracto hidrosoluble seco y liposomas de la cáscara de coco verde (Cocos nucifera)

La utilización del reactivo WST-1 como indicador de viabilidad celular permitió dar una idea a nivel bioquímico de la eficiencia en la utilización del extracto de coco en polvo y en liposomas. Mediante la metodología propuesta en (3.2.11.2) la respuesta celular se mide a partir de la respuesta del complejo mitocondrial- succinato-tetrazolio- reductasa (Tan & Berridge, 2000). Al momento en que se añadió el reactivo WST-1 a las mezclas control y soluciones de prueba se indujo a que los neutrófilos generaran la reducción de las sales de tetrazolio a formazán, dicho procedimiento permitió identificar que las células se encontraban vivas mediante el cambio en la coloración del medio que fue de incoloro a un violeta suave, como se muestra en la figura:

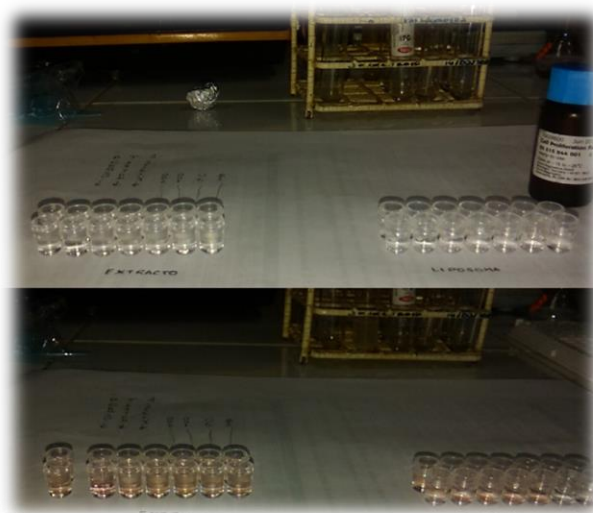


Figura 21. Preparación de las muestras para ensayo Antiinflamatorio

Nota: La imagen superior indica las muestras preparadas antes de añadir el reactivo WST-1, la imagen inferior indica las muestras con WST-1.

La previa opsonización del Zymozan A fue necesaria para activar a dicho compuesto para que ataque directamente a las células de los neutrófilos viables en las soluciones de control y de prueba; el plasma sanguíneo permitió que el Zymozan A fuese opsonizado dado que tiene el efecto de reconocer los componentes similares a los cuales estaba atacando, y una vez que se añadió a las mezclas en los micropocillos se produjo la actividad inflamatoria exceptuando el caso del control negativo puesto que al ser el Tritón X-100 un compuesto tóxico formado por la mezcla de varias

citotoxinas no generó respuesta alguna con el WST-1 ni tampoco con el Zymozan A opsonizado. A nivel celular el efecto del Zymozan en los neutrófilos se debe a que este compuesto es un derivado de la membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae* y por ende es un poderoso estimulante biológico en la producción de radicales libres por parte de los neutrófilos (Dávalos, et al, 2000). Entonces la generación de la inflamación se debió al incremento de la producción de O₂ (iones superóxido y peróxido de hidrógeno).

En los ensayos realizados se midió las absorbancias y se encontró que la inhibición de los compuestos de prueba frente a la producción de superóxido presentaba valores altos debido a la concentración de polifenoles presentes en la composición.



Figura 22. Ensayo Antiinflamatorio

Nota: La imagen muestra el cambio de coloración de las muestras de prueba después de una hora de haber añadido el Zymozan A opsonizado a 37°C, el pocillo sin coloración es el control negativo de Tritón X-100.

Los resultados obtenidos se compararon frente al control positivo de la solución de Dimetilsulfóxido, al ser este un compuesto altamente antiinflamatorio se consideró como blanco y se expresó en función del mismo la actividad antiinflamatoria de los compuestos de prueba. La aspirina fue considerada como control comparativo; los valores en (%) de actividad antiinflamatoria del extracto en polvo y liposomas resultaron ser mayores que los de la aspirina esto se debió a que al alto contenido de polifenoles presentes en los principios activos siendo así las mejores concentraciones a 200 ppm tanto del extracto en polvo como de los liposomas; 41,64% y 58% respectivamente.

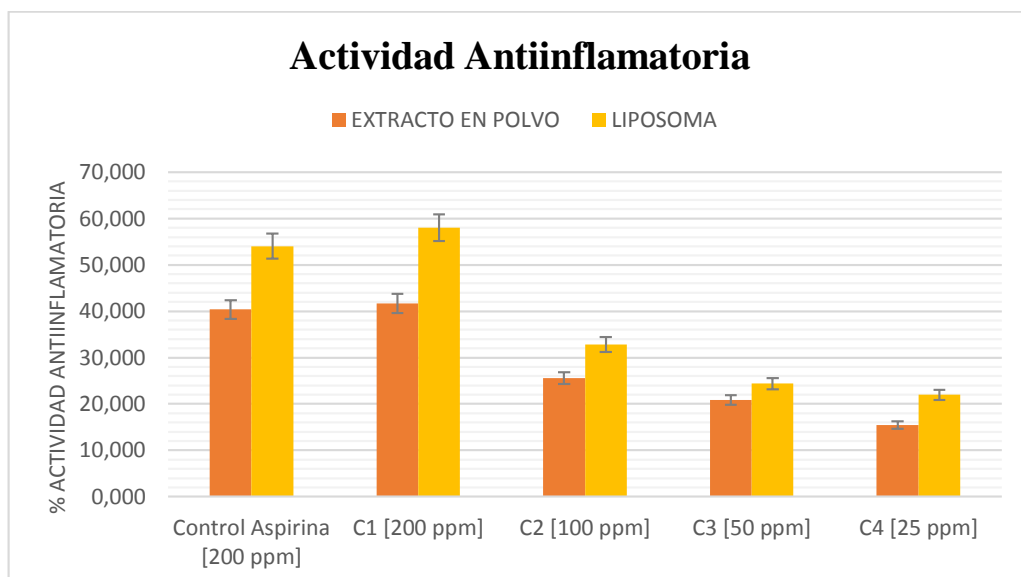


Figura 23. Comparación de la Actividad Antiinflamatoria entre el Control de Aspirina, Extracto en polvo y Liposomas

Nota: El extracto de coco presenta mayor actividad antiinflamatoria que el control comparativo de aspirina, los liposomas tienen mayor actividad en la inhibición de la inflamación por su biodisponibilidad al momento de ingresar a la matriz celular.

Elaborado por: Tirado Marcelo, 2016.

La mayor actividad antiinflamatoria se presentó a 200 ppm para el liposoma en comparación al extracto y el control de aspirina en la misma concentración, y en general para las demás concentraciones de 100, 50 y 25 ppm los liposomas presentaron mayor actividad antiinflamatoria con respecto al extracto en polvo, esto se atribuye a que los liposomas al ser compuestos de tamaño $2,83 \pm 0,942 \mu\text{m}$ pueden ingresar fácilmente a la célula a través de los poros de la membrana, otro factor importante es el hecho de que al ser el liposoma un compuesto fosfolipídico que recubre al extracto hidrosoluble de la cáscara del coco no permite que éste se degrade antes de llegar a la zona donde es fácilmente asimilable, la membrana celular es una bicapa lipídica por lo tanto el liposoma atravesó sin ningún problema a la matriz celular, en consecuencia el extracto polifenólico llegó sin pérdidas al sitio donde estaba ocurriendo la inflamación e inhibió la producción de superóxido por parte de los neutrófilos en contraste con el extracto puro sin recubrimiento el cual tuvo un 16,3% de diferencia en su actividad antiinflamatoria. La eficiencia de inhibición de la inflamación resultó ser mejor para los liposomas ya que poseen mayor biodisponibilidad y pueden ser suministrados vía parenteral o tópica en formulaciones con excipientes.

4.2. Verificación de las Hipótesis

Los liposomas obtenidos mediante secado por aspersión a partir del extracto hidrosoluble de la cáscara del coco verde (*Cocos nucifera*) presentan actividad antiinflamatoria en los ensayos *In vitro*.

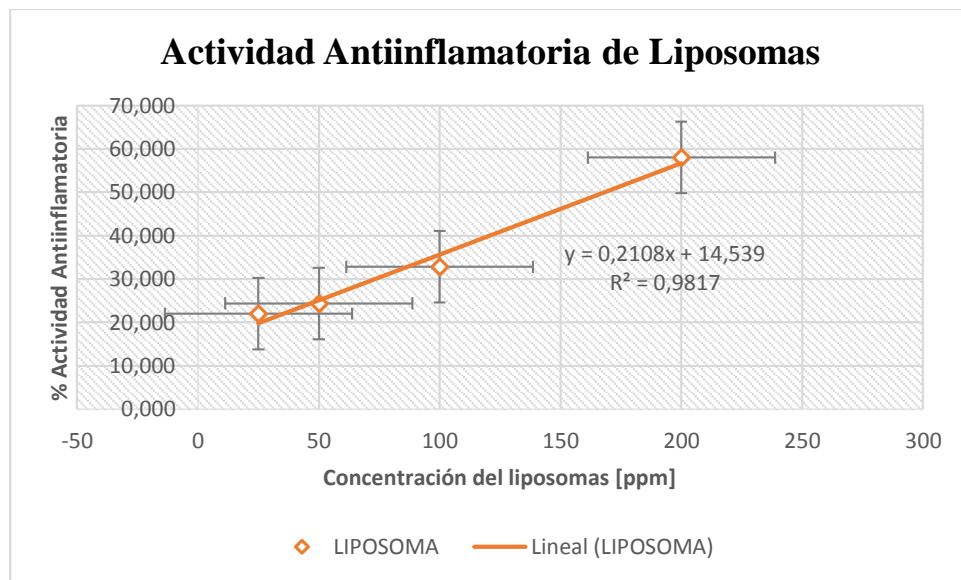


Figura 24. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de liposomas de extracto hidrosoluble de cáscara de Coco Verde (*Cocos nucifera*)

Nota: La actividad inhibitoria de los liposomas es mayor a una concentración de [200ppm] dado que es la dosis necesaria para efectuar una reducción de la inflamación producida por el Zymozan A opsonizado.

Como se puede apreciar en el gráfico los liposomas obtenidos mediante secado por aspersión del extracto hidrosoluble de la cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*) presentan actividad antiinflamatoria en un rango del 22 al 58 % desde concentraciones de 25 a 200 ppm, con un factor de correlación experimental de 0,990; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- ❖ La cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*) resultó ser un material muy absorbente debido al elevado porcentaje de humedad que posee a pesar de haber sido sometida al proceso de secado ésta continuó manteniendo un cierto contenido de agua (11,77%), adicionalmente el porcentaje de cenizas en promedio fue de 5,886%.
- ❖ La cantidad de sólidos totales del extracto de coco verde fue baja debido a la naturaleza fibrosa del material, sin embargo, la presencia de polifenoles en los extractos fue alta lo cual resultó ser favorable para su uso como agente antiinflamatorio.
- ❖ La concentración del extracto hidrosoluble de la cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*) al 2,8 % presentó rendimientos altos en el secado por aspersion mayores al 70%, con la formación de liposomas se aseguró el encapsulamiento de los polifenoles para su uso como principio activo antiinflamatorio.
- ❖ El análisis por espectroscopia IR indicó la encapsulación de los polifenoles, dado que al comparar el contenido de polifenoles totales, los liposomas presentaron menor absorbancia a 750 nm que el extracto seco lo cual significa que el 62,41% de la cantidad de polifenoles fueron encapsulados por la matriz fosfolipídica.
- ❖ El análisis por microscopía diferencial de barrido determinó en base a la distribución de partículas un tamaño promedio de $2,83 \pm 0,942 \mu\text{m}$, considerándose a los liposomas del extracto hidrosoluble de *C.nucifera* como micropartículas de forma esférica y superficie irregular, capaces de formar agregados con liposomas de menor tamaño.
- ❖ Los liposomas obtenidos del extracto hidrosoluble de la cáscara de coco verde presentaron 58% de actividad antiinflamatoria a 200 ppm en comparación con el extracto sin encapsular que fue de 41,64% lo que indica una mayor eficacia en comparación al control de aspirina a la misma concentración que fue del

54%, según el ensayo *in vitro*; al utilizar neutrófilos la acción de los polifenoles contenidos en la capa fosfolipídica penetraron fácilmente en la bicapa lipídica de la célula inhibiendo así la inflamación inducida por el Zymozan A opsonizado.

5.2. Recomendaciones

- ❖ Profundizar la investigación científica en el aprovechamiento de materiales vegetales que se desechan como un medio para la obtención de metabolitos de interés como polifenoles, glucósidos, enzimas u otras sustancias para su uso en la industria química, bioquímica y farmacéutica.
- ❖ Aplicar tecnologías como el Secado por Aspersión para mejorar la biodisponibilidad de metabolitos obtenidos como principios activos.
- ❖ Emplear más metodologías que se basen en ensayos *in vitro* como un medio para determinar la eficiencia a nivel celular de compuestos extraídos a partir de materia orgánica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFÍA:

1. Allen, Cullis. (2012). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036225>.
2. AOAC; Instituto de Salud Pública de Chile (1990), "Oficial Methods of Analisis". Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/CenizasTotales.pdf
3. Arranz Sara, (2010). "Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación". Recuperado el 04 de marzo de 2016. Disponible en: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiaj8OvtafLAhXD_R4KHdXxB7QQFgglMAI&url=http%3A%2F%2Fprints.ucm.es%2F11255%2F1%2FT32158.pdf&usg=AFQjCNGvPA3k7ucTECVd1r0-xmg23ewTJw
4. Brito, Frías, Morón, García, Cabrera, Morejón, Martínez, Amador. (2014). Validación preclínica del efecto antiinflamatorio tópico de cinco plantas medicinales. Laboratorio Central de Farmacología. La Habana, Cuba. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S10284796201400010006.
5. Bruguer, (2015). "Paleta Internacional de Colores". Recuperado el 09 de enero de 2016. Disponible en: <https://www.bruguer.es/es/paletas-de-colores>.
6. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos de la Habana, Cuba. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475151996000200007&script=sci_arttext.

7. Coates John, (2000). "Interpretation of Infrared Spectre, A Practical Approach". 1^{ra} Edición, Editorial R.A. Meyers. Chichester, Página 10815-10837.
8. Dávalos Milagros, Mary Clapperton, John O'Grady y Nancy Rolando. (2000). "Exagerada producción de superóxido por los neutrófilos de pacientes con hepatitis alcohólica aguda: implicancia terapéutica". Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol_20n2/exagerada.htm
9. Dua K., Sheshala R, Ling TY, Hui Ling S, Gorajana A. (2013). Antiinflammatory, antibacterial and analgesic potential of *cocos nucifera* linn.: a review. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23286236>.
10. Fernández A. Arroyo J. Bonilla P. Tomás G. Medina F. Chenguayén J. Marín M. Béjar E. Huamán O. (2007). Efecto antiinflamatorio *in vitro* y seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (Ratania). Recuperado el 10 de noviembre de 2015 de: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:poVZoRW9zi8J:revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/4964/4115+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec>
11. Figueira, Regina M. dos Santos, Eliane A. Campesatto, Ingrid Martins L. Lúcio, Ednaldo C. de Araújo and Maria Lysete de A. Bastos. (2013). Biological activity of the *Cocos nucifera* and its profile in the treatment of diseases: A review. School of Nursing, ESENFAR/UFAL, Maceió/AL, Brazil. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: <http://jocpr.com/vol5-iss52013/JCPR-2013-5-5-297-302.pdf>.
12. García Ilse, (2013). Elaboración de un suplemento dietético a base de extracto de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) mediante secado por aspersion Recuperado el 06 de marzo de 2016 de: <http://ri.uaemex.mx/handle/123456789/14118>
13. González Manuel. (2005). Los Liposomas Usos y Perspectivas. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente. Recuperado el 05 de octubre de 2015 de: <http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq/article/viewFile/2005/1557>.

14. Hernández Iván, Rafael Alavez Ramírez, Pedro Montes García. (2009). “Cenizas de coco y hoja de pino para su uso como puzolana”. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en: www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n64ne/carbon_v2.pdf
15. Infoleg, (2003). “Distribución del Tamaño de Partícula en Polvos”. Recuperado el 09 de enero de 2016. Disponible en: <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/85000-89999/86181/dto202-2003-36.htm>
16. INNOPROT, (2008). “Kit de Proliferación Celular WST-1”. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en: http://innoprot.com/es_productos.asp?idsf=28&id=13&idp=103
17. Janeta Marco, (2015). “Actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de las fracciones aisladas por cromatografía preparativa en capa fina de (*parmelina tiliacea*)”. Recuperado el 01 de enero del 2016. Disponible en: <http://bibliotecas.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=49718>
18. Lima E.B.C. C.N.S. Sousa , L.N. Meneses , N.C. Ximenes , M.A. Santos Júnior , G.S. Vasconcelos , N.B.C. Lima , M.C.A. Patrocínio , D. Macedo , S.M.M. Vasconcelos. (2015). “*Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review”. Recuperado el 04 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015001100953
19. López, (2013). “Origen y Taxonomía del Coco”. Recuperado el 23 de octubre de 2015 de: <http://lacasitadelcoco.blogspot.com/2013/11/origen-y-taxonomia-del-coco.html>
20. López Darío; Leonid Torres; Salomón Izquierdo; María Lidia González; Diosothys Chávez Figueredo. (2008). “Secado por aspersión de extracto acuoso de *Bidens alba* L. a escalas de laboratorio y banco”. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400010

21. López Orestes, Gómez Martha. (2008). Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475152008000300010.
22. Martínez Liliana. (2009). Dimensionamiento y simulación de un secador por aspersión de nivel piloto. Instituto Politécnico Nacional, México D.F. Recuperado el 05 de octubre de 2015 de: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/5722/DIMENSIONAMIENTO.pdf?sequence=1>.
23. Muhammad I. Choudhary , Azizuddin, Saima Jalil, Atta-ur-Rahman, (2005). “Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*”. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102789>
24. Ochoa Ania, Jorge Marin Moran,1 Damari Rivero Breff, Eva María Aguilera Saborít. (2013). “Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana”. Recuperado el 02/03/2016. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1870-01952013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
25. Pérez Tania, Yanet Rodríguez Perdomo, Elaine Díaz Casañas, Antonio Domínguez Parra, Yamilka Riverón, Amalia Núñez. (2011). “Influencia de la preparación de la corteza de *Rhizophora mangle* L. en el proceso de extracción sólido-líquido”. Recuperado el 01 de marzo del 2016. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962011000100010&script=sci_arttext
26. Quiñones M. M. Miguel y A. Aleixandre. (2012). “Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular”. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009

27. Rojo Francisco, (2012). “Tablas de Espectroscopia Infrarroja”. Recuperado el 02 de marzo de 2016. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/docs.php?curso=206>
28. Ruano Marta, (2013). “Fabricación de liposomas y cápsulas poliméricas”. Recuperado el 04 de marzo de 2016. Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjPp5W4q6fLAhUF7yYKHdjC68QFgghMAE&url=http%3A%2F%2Fprints.ucm.es%2F18042%2F1%2FT34218.pdf&usg=AFQjCNGUhS0-Y4TzVBHGufQDJHd5QF7pZg>
29. Swati, Wagh. (2014). Review on Spray Drying Technology. Recuperado el 07 de octubre de 2015 de: <http://www.ijpcbs.com/files/02-468.pdf>.
30. Tan & Berridge, (2000). “Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: A simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents”. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.ov/pubmed/10758236>
31. Vargas Patricia, Javier Z. Castellanos Ramos, Prometeo Sánchez García, Leonardo Tijerina Chávez, Rosa Ma. López Romero y José L. Ojodeagua Arredondo. (2008). “Caracterización física, química y biológica de sustratos de polvo de coco”. Recuperado el 01 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61031410>
32. Vasco Catalina, Ruales Jenny, (2008). “Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador”. Recuperado el 23 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608005062>

ANEXOS



Anexo 1. Reactor Tipo Agitador con Calentamiento directo

Nota: Ensamblado bajo medidas reales, 1500 rpm, Niquelina de 200°C de capacidad, Volumen de almacenamiento 15 litros, acero inoxidable.



Anexo 2. Molienda

Nota: Molino de discos eléctrico.



Anexo 3. Material Vegetal Recolectado

Nota: Cáscaras de *C. nucifera* recolectadas y procesadas.



Anexo 4. Extracciones a Escala de Laboratorio

Nota: Extracciones acuosas de *C. nucifera* .



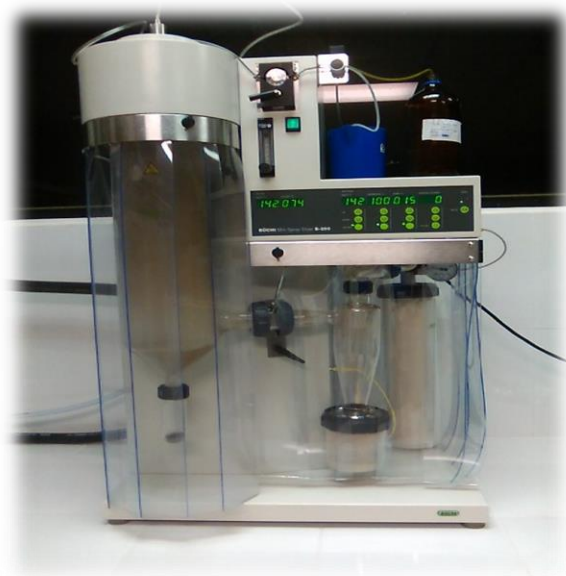
Anexo 5. Medición del pH

Nota: Determinación del pH de las extracciones acuosas de *C. nucifera* .



Anexo 6. Concentración del extracto madre

Nota: Concentración al 5% de sólidos totales del extracto madre.



Anexo 7. Secado por Aspersión

Nota: Obtención del extracto en polvo y liposomas.



Anexo 8. Espectroscopia Infrarroja

Nota: Utilización del espectrofotómetro IR para determinación de compuestos en el extracto seco, liposomas y Encapsulante.



Anexo 9. Ensayo *in vitro*

Nota: Determinación de la actividad antiinflamatoria de los liposomas del extracto hidrosoluble de las cáscaras de *C. nucifera*.



Anexo 10. Producto Obtenido y Envasado

Nota: Extracto en polvo y Liposomas en envasados.