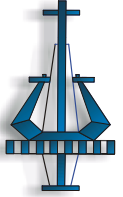




UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
"La Universidad Católica de Loja"



ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

MODALIDAD PRESENCIAL

**"ELABORACIÓN DE UN FITOPREPARADO ANTIFÚNGICO
SEMISÓLIDO A PARTIR DEL EXTRACTO FLUIDO DE LA
ESPECIE *PIPER ECUADORENSE* (MATICO), LOJA - ECUADOR"**

*Tesis de grado previa la
Obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico*

AUTORA

Guisella del Rocío Rivera Rogel

DIRECTOR

Bioq. Edgar Santiago Ojeda Riascos

CENTRO UNIVERSITARIO LOJA

2010

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Bioq.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UTPL

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO:

Que el trabajo de Investigación titulado “**Elaboración de un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie *Piper ecuadorensis* (Matico), Loja - Ecuador**”, elaborado por la egresada Guisella del Rocío Rivera Rogel ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por lo tanto autorizo su presentación.

Bioq. Edgar Santiago Ojeda Riascos
DIRECTOR DE TESIS

Loja, 26 de Enero de 2010

AUTORIA

Los ideas, conceptos, metodologías, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autora.

Guisella del Rocío Rivera Rogel

DEDICATORIA

Con gran amor y cariño le dedico:

A DIOS, por guiarme durante este camino de enriquecimiento de conocimientos.

A MIS PADRES Enrique y Marieta, por su apoyo, esfuerzo y confianza ante la vida.

A MI ADORADO HIJITO Daniel Andrés, por ser la fuente de mi inspiración y mi vida entera.

A MIS HERMANAS Sandra, Diana y Carmen por los momentos vividos y apoyo incondicional.

A Edgar por su cariño, apoyo, confianza y respaldo, ahora más que nunca.

Y A TODAS aquellas personas que de una u otra forma estuvieron envolviéndome, tanto en el ámbito profesional como en el personal, y también con aquellas que he compartido el día a día tan de cerca con años cargados de esfuerzo y vivencias.

A todas ellos Gracias sin un final.

Guisella Del Rocío Rivera Rogel.....

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrir sus puertas y permitirme vivir una gran experiencia profesional, brindándome sus enseñanzas con el fin de cumplir con mis objetivos tanto personales como académicos.

Al Bioq. Santiago Ojeda, por impartir con generosidad sus sabios conocimientos y motivación para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Geovany López por su conocimiento brindado durante el desarrollo de esta investigación.

A quienes forman parte del Instituto de Química Aplicada por la colaboración desinteresada durante el desarrollo de la presente investigación, de manera especial al Bioq. Luis Cartuche, Ing. Vladimir Morocho, a mis compañeras Ximena abad y Mónica Alejandro por su apoyo incondicional.

Finalmente agradezco a todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de la presente investigación y la culminación de mi carrera profesional.

Guisella Del Rocío Rivera Rogel.....

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Guisella del Rocío Rivera Rogel declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

.....
Guisella Rivera R.

TESISTA

.....
Biq. Santiago Ojeda R.

DIRECTOR DE TESIS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	II
AUTORÍA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Justificación e importancia	2
1.2 Exposición de objetivos	5
1.1.1 General	5
1.1.2 Específicos	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Aspectos conceptuales de la medicina natural y tradicional	7
2.2 Información del material vegetal	7
2.2.1 Características botánicas de la familia Piperaceae	7
2.2.2 Características botánicas del género <i>Piper</i>	8
2.2.3 Características botánicas de la especie <i>Piper ecuadorensis</i> Sodiro (Matico)	9
2.2.3.1 Composición química del género	9
2.2.3.2 Usos de la especie <i>Piper</i>	10
2.2.3.3 Modo de uso de la especie <i>Piper</i> .	10
2.3 Especies medicinales empleadas para tratar afecciones tópicas	10
2.4 Fitofármacos	11
2.4.1 Usos de los fitofármacos	11
2.5 Formas farmacéuticas semisólidas	12
2.5.1 Cremas	12
2.5.2 Diferencia entre crema y pomada	12
2.5.3 Clasificación	12
2.5.3.1 Emulsión aceite en agua (O/W)	13
2.5.3.2 Emulsión aceite en aceite (W/O)	13

2.5.4	Excipientes	13
2.5.4.1	Excipientes grasos y productos lipoideos	14
2.5.5	Método de manufactura de la crema	14
2.5.6	Envases	15
2.5.7	Especificaciones para cremas	15
2.5.7.1	Características organolépticas	16
2.5.7.2	Estabilidad térmica	16
2.5.7.3	Control microbiológico	17
2.6	Microorganismos de ensayo	17
2.6.1	Hongos	17
2.6.2	Dermatofitos	18
2.6.2.1	<i>Trichophyton rubrum</i>	20
2.6.2.2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20
2.7	Evaluación antifúngica del extracto y del fitofármaco	20
2.7.1	Microdilución en caldo	21
2.7.2	Microdilución en agar	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1	Área de recolección	23
3.2	Control de calidad físico-químico de materia vegetal	23
3.3	Observación macroscópica	24
3.4	Métodos físico-químicos aplicados al análisis de drogas cruda	24
3.4.1	Determinación de contenido de humedad	24
3.4.2	Determinación de cenizas totales	24
3.4.3	Determinación de cenizas solubles en agua	24
3.4.4	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	25
3.5	Identificación cualitativa de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico	25
3.6	Obtención del extracto fluído	25
3.6.1	Cromatografía de capa fina (TLC) del extracto	26
3.7	Microorganismos de Prueba	27
3.8	Prueba antifúngica del extracto	27

3.8.1	Microdilución en caldo	27
3.8.1.1	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	27
3.9	Elaboración del fitopreparado semisólido	28
3.9.1	Formulación	28
3.9.2	Procesos de fabricación	29
3.9.2.1	Dilución de las fases	30
3.9.2.2	Emulsificación	31
3.9.2.3	Envasado	31
3.10	Ensayos de estabilidad del fitopreparado	31
3.11	Actividad biológica del fitopreparado	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1	Análisis de evaluación preliminar de material vegetal	34
4.1.1	Observación macroscópica de la especie en estudio	34
4.2	Análisis físico-químico de material vegetal	34
4.3	Análisis de estudio químico del extracto	35
4.3.1	Identificación de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico	35
4.4	Obtención del extracto fluido de la especie	37
4.4.1	Análisis de cromatografía de capa fina (TLC) del extracto	37
4.5	Método de Microdilución en caldo para el extracto	39
4.6	Elaboración del fitopreparado semisólido	39
4.6.1	Fórmula de composición	40
4.6.2	Pruebas de estabilidad del fitopreparado semisólido	40
4.6.2.1	Análisis organolépticos del fitopreparado	40
4.6.2.2	Análisis físicos-químicos del fitopreparados	42
4.6.2.3	Análisis microbiológico del producto	43
4.7	Ensayos de actividad biológica del producto	45
4.8	Presentación del producto terminado	47
4.8.1	Etiqueta interna	47

4.8.2 Etiqueta externa	48
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
5.1 Conclusiones	50
5.2 Recomendaciones	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. <i>Piper</i> sp	8
Figura N° 2. <i>Piper ecuadorensis</i>	9
Figura N° 3. Diferencias estructurales entre crema y pomada	12
Figura N° 4. Estructura morfológica de los diferentes tipos de géneros dermatofitos	19
Figura N° 5. Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal de la Provincia de Zamora Chinchipe	23
Figura N° 6. Medida de los Rf en la placa de sílica gel	27
Figura N° 7. Esquema del proceso para la obtención de la crema	30
Figura N° 8. Fotografía de la hoja de piper ecuadorensis	34
Figura N° 9. TLC comparativo entre el extracto metanólico y etanólico de <i>piper ecuadorensis</i>	37
Figura N° 10. Bioautogramas del extracto metanólico de <i>Piper ecuadorensis</i> (Matico) frente a: d) <i>T. mentagrophytes</i> y e) <i>T. rubrum</i>	38
Figura N° 11. Producto terminado	39
Figura N° 12. Etiqueta interna de la crema prototipo 0.06 %	47
Figura N° 13. Etiqueta interna de la crema prototipo 0.06 %	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Lugar de recolección de la especie vegetal	23
Tabla N° 2. Formulación del producto elaborado	29
Tabla N° 3. Técnicas aplicadas al fitopreparado	32
Tabla N° 4. Análisis físico-químico del material vegetal seco	35
Tabla N° 5. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de la especie utilizada	36
Tabla N° 6 Concentración Mínima inhibitoria (CMI) del extracto ensayado frente a los microorganismos de prueba	39
Tabla N° 7. Resultado de las pruebas organolépticas de la crema	41
Tabla N° 8. Resultado del análisis físico-químico de la crema	42
Tabla N° 9. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre Densidad vs. Tiempo	42
Tabla N° 10. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre pH vs. Tiempo	44
Tabla N° 11. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre Extensibilidad vs. Tiempo	44
Tabla N° 12. Resultado de análisis microbilógico de la crema	45
Tabla N° 13. Porcentaje del extracto en las nuevas formulaciones	46
Tabla N° 14. Dosis del extracto (en la crema) para la inhibición del crecimiento fúngico	47

RESUMEN

En el presente trabajo, se elaboró una crema (fitopreparado semisólido), con actividad antifúngica a partir de un extracto etanólico de la especie vegetal *Piper ecuadorensis* (Matico), recolectada en la Provincia de Zamora Chinchipe, utilizada tradicionalmente como cicatrizante y antiséptico de heridas.

Este fitopreparado fue estudiado en tres condiciones de almacenamiento: ambiente, 30°C y 45°C, durante 3 meses en base a los requerimientos del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”. Se evaluaron las características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas y además de determinó la actividad de la crema mediante técnicas de macrodilución en agar. Los resultados del estudio demostraron que la crema al 0,06% sometida a condiciones ambientales y a 30°C mantiene sus características organolépticas, físico – químicas y microbiológicas durante los 3 meses a condiciones aceleradas de almacenamiento dadas por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical (INH) “Leopoldo Izquieta Pérez”, así mismo, en lo que se refiere a la actividad de la crema sólo demostró ser activa frente a *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 a una dosis de 60 µg/mL.

De acuerdo a los resultados obtenidos en lo que respecta a la actividad biológica de la crema, se procedió a realizar dos formulaciones más a las dosis de 0.1 y 1%, ya que la actividad de la crema al 0.06% no se mantuvo hasta el primer mes de almacenamiento; en este sentido, las dos formulaciones mencionadas se sometieron sólo a condiciones ambientales por un mes para su evaluación y con ello se validó por un certificado de análisis, en donde se demuestra que la mejor actividad presentada es con la formulación al 1% a una dosis de 1000 µg/mL frente a los dos hongos: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, el mismo que puede ser empleado en estudios posteriores para evaluar su eficacia *in vivo* en el tratamiento de afecciones tópicas.

Palabras claves: *Piper ecuadorensis*, actividad antifúngica, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*.

ABSTRACT

In this work, we developed a cream (phytopharmaceutical semisolid), with fungicide action from an ethanol extract of *Piper ecuadorensis* (Matico) plant species, collected in the Province of Zamora Chinchipe. Traditionally used as wounds healing and antiseptic.

This phytopharmaceutical, was studied in three storage conditions: ambient, 30°C and 45°C, for 3 months based on the Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical "Leopoldo Izquieta Pérez". We evaluated the organoleptic, physical-chemical, microbiological characteristics and also determined the activity of the cream through techniques of macrodilution in agar. The results of the study showed that the cream (at 0.06%) subject to ambient conditions and to 30°C maintains its organoleptic, physical-chemical and microbiologic characteristics, for 3 months at accelerated condition given by the (INH), likewise, in regard to the activity of the cream only proved to be active against *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 at a dose of 60 µg/mL.

According to the results obtained with respect to biological activity of the cream, they proceeded to make two formulations more at doses of 0.1 and 1%, since the activity of the cream (0.06 %) was not sustained until the first month of storage in this sense, two formulations above were subjected only to ambient conditions for one month for assessment and thereby validated by a certificate of analysis, showing that the best activity is the formulation to 1% at a dose of 1000 µg/mL against the two fungi: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 and *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, the same formulations that can be used in future studies to assess its efficacy *in vivo* in the treatment of hackneyed affections.

Keywords: *piper ecuadorensis*, fungicide action, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación e importancia

El Ecuador es uno de los 17 países megadiversos del mundo, alberga una alta diversidad biológica por unidad de superficie, ésta megadiversidad se atribuye básicamente a su ubicación netamente tropical, presencia de la cordillera de los Andes y del ramal oriental e influencia de las corrientes marinas del Niño y Humboldt (León *et al.* 2006). Estos factores han dado origen a una variedad de zonas ecológicas que poseen alrededor de 17058 especies de plantas vasculares (Ulloa *et al.* 2005), 500 especies de plantas medicinales, incluyendo hierbas aromáticas, de las cuales 228 son las más utilizadas y 125 las más comercializadas (CORPEI 2003), constituyendo una fuente natural importante para la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas.

En los últimos años a nivel mundial se ha ido incrementando la incidencia de enfermedades fúngicas (García *et al.* 2003); debido al aumento considerable de pacientes inmunosuprimidos, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas (López *et al.* 2001). En Ecuador durante las últimas décadas del siglo XX significativos aumentos de las lluvias que se registraron en el SESA, trajo consigo algunas consecuencias, entre la más destacada el aumento de las enfermedades fúngicas y bacterianas (Magrin 2008).

Hoy en día, se explota el uso y valoración de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos (Cowan 1999). Las plantas en particular, representan un alto potencial terapéutico si se considera que desde la antigüedad son utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Mesa-Arango *et al.* 2004).

La familia Piperaceae está comprendida por 10 géneros, siendo las más representativas el género *Piper* y *Peperomia*. El género *Piper* tiene más de 700 especies que están distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; muchas de estas especies tienen aplicación en la medicina tradicional como antisépticos y anti-infecciosos (Flores *et al.* 2000), sus propiedades farmacológicas han sido ampliamente estudiadas y algunas de

ellas utilizadas para la atención primaria en salud (Mesa *et al.* 2007). Entre las más estudiadas están *Piper nigrum* (pimienta negra), *Piper methysticum* (Kava), *Piper hispidum* (matico), *Piper tuberculatum* (matico), entre otras (Molina *et al.* 2001, Delgado *et al.* 2007). Sin embargo, para la especie *Piper ecuadorensis*, distribuida abundantemente en las provincias Carchi, Pichincha (Joergensen *et al.* 1999), Loja y Zamora, no se ha encontrado reportes acerca de su composición química ni propiedades farmacológicas; no obstante, es ampliamente empleada en medicina tradicional por los pobladores de Zamora (Tene *et al.* 2007) y por miembros de la étnia Saraguro (Andrade 2007, Jaramillo 2006, Morocho 2006), como cicatrizante y antiséptico de heridas.

En estudios realizados a especies del género *Piper* se ha logrado aislar metabolitos secundarios, que han demostrado actividad antifúngica, insecticida, antiagregante de plaquetas, estimulante, bactericida y citotóxica (Peña 1997). Los aceites esenciales de algunas especies del género inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y los hongos *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* (López *et al.* 2001).

Los fármacos disponibles en la actualidad, tienen una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia. Debido a que la resistencia es cada vez mayor, es necesario contar con nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas, es por ello que esta investigación está procurando elaborar un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie *Piper ecuadorensis* (Matico) y evaluar su actividad antifúngica, para establecer su eficacia. El extracto de esta planta es de interés para nuestro medio porque podría ser un sustituto más eficaz que los agentes antimicrobianos producidos sintéticamente, pues, en estudios preliminares realizados en el Instituto de Química Aplicada (IQA) de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), utilizando el extracto metanólico total de esta especie se ha reportado una actividad antifúngica

considerable de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ y 31,25 $\mu\text{g/ml}$ frente a *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* respectivamente.

1.2. EXPOSICIÓN DE OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Elaborar un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie *Piper ecuadorensis* (Matico), y evaluar su actividad antifúngica.

1.2.2. Objetivo Específicos

1. Identificar las características macroscópicas de la hoja (forma, textura, superficie, color, olor, dimensiones, peculiaridades).
2. Determinar las características físico-químicas de la droga cruda como: humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico y sustancias solubles.
3. Determinar la composición química general cualitativa mediante tamizaje fitoquímico.
4. Estandarizar una técnica para la elaboración de un fitopreparado semisólido con actividad antifúngica a partir del extracto fluido de *Piper ecuadorensis*.
5. Evaluar la actividad antifúngica del fitopreparado frente a dos hongos de afección tópica (*Thrychopyton metagrophytes* y *Thrychopyton rubrum*).
6. Evaluar la estabilidad físico-química, organoléptica y microbiológica del producto elaborado.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos conceptuales de la medicina natural y tradicional

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica clínica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos (Ortiz *et al.* 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Oliveira *et al.* 2005, Ordoñez 2007).

Estas plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna, ya que son fuente directa de agentes terapéuticos, que se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos. Es por ello que la OMS dentro de su programa “Salud para todos en el año 2000”, ha promovido el estudio de las plantas como fuente de medicamentos (Oliveira *et al.* 2005, Soto *et al.* 2006).

2.2. Información del material vegetal

2.2.1. Características botánicas de la familia Piperaceae

La familia Piperaceae, son hierbas o arbustos que consta de unos 10 géneros y más de 2000 especies de distribución tropical y subtropical; en el Ecuador están representados 4 géneros (*Piper*, *Peperomia*, *Lepianthes* y *Sarcorrhachis*) y 380–400 especies; sólo *Piper* tiene especies arbustivas en los bosques andinos (Ulloa *et al.* 2009).

Los géneros *piper* y *peperomia* son los más abundantes y al mismo tiempo, conocidos por su importancia a nivel económico,

ya que al género *Piper* pertenecen *Piper nigrum*, *Piper officinarum*, *Piper longum* y *Piper cubeba* de las que se obtienen los distintos tipos de pimienta; mientras que al género *Peperomia* pertenecen muchas especies ornamentales (Aguilar 2007).

Las plantas de la familia Piperaceae pueden ser erectas o postradas, tienen hojas alternadas, opuestas o verticiladas. Los tallos tienen nodos, pueden ser articulados o aéreos y subterráneos. El tipo de reproducción es por polinización (son plantas hermafroditas); y por esquejes de los tallos, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo espada, son flores diminutas con brácteas suculentas. El fruto es una drupa o baya, y consta de una semilla (Navarro *et al.* 2002).

2.2.2. Características botánicas del género *piper*



Figura Nº 1. *Piper* sp.

Fuente: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=125531

Las *Piper* son arbustos, árboles pequeños, sufrútices o hierbas, erectos o escandentes, aromáticos, con tallos nudosos, hojas alternas, con nervaduras pinnadas, palmadas o paralelas y nervación secundaria conspicua, profilos recubriendo las yemas axilares. Inflorescencia, espigas carnosas, flores bisexuales,

diminutas, axilares a brácteas peltadas, fruto una drupa (Ulloa *et al.* 2009).

2.2.3. Características botánicas de la especie *Piper ecuadorensis* sodiro (Matico)



Figura Nº 2. *Piper ecuadorensis*.
Fuente: La autora

Piper ecuadorensis Sodiro es un arbusto nativo de 2 m de altura que se encuentra en las provincias del Carchi, Pichincha y Zamora Chinchipe entre los 0 y 2500 m.s.n.m. Presenta tallos nudosos con pubescencia blanca, hojas ovadas oblicuamente redondeadas en la base, haz rugoso; envés con nervios muy marcados, flores aclamídeas, inflorescencia en espiga o amentos de color verde claro y bráctea crema (Ulloa *et al.* 2009).

2.2.3.1. Composición química del género *Piper*

Químicamente los constituyentes más comunes del género *Piper* son las amidas, lignanos, neolignanos, flavonoides, fenoles, terpenos y los compuestos esteroides, los cuales pueden ser los responsables de la actividad biológica (Flores *et al.* 2000).

2.2.3.2. Usos de la especie *Piper*

Se emplea los tallos, hojas, raíces para afecciones respiratorias, luxaciones, trastornos digestivos, malaria, antiinflamatorio, diarreas sanguinolentas, expectorante, antitusígeno (Flores *et al.* 2000).

2.2.3.3. Modo de uso de la especie *Piper*

Tintura, Infusión, decocción y maceración (López 1995).

2.3. Especie medicinales empleadas para tratar afecciones tópicas

En el Ecuador se ha encontrado 3118 especies pertenecientes a 206 familias más usadas con fines medicinales. El 75% de las especies medicinales son plantas nativas y el 5% de ellas son endémicas, mientras que el 11% son introducidas. Constituyendo el 26% del total de especies medicinales para tratar infecciones e infestaciones causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos, platelmintos, nemátodos, anélidos y artrópodos (Torre *et al.* 2008).

Las plantas que tratan infecciones causadas por virus y bacterias son las más comunes (63%) (Torre *et al.* 2008).

El uso de plantas para tratar afecciones fúngicas es común sobre todo en las zonas bajas del Ecuador occidental y nororiental. El 18% de especies se utilizaron para este fin, siendo las más mencionadas *Iryanthera paraensis*, *Calathea metallica* y *Fittonia albivenis* (Torre *et al.* 2008).

Estudios realizados en la Provincia de Loja y Zamora Chinchipe se han identificado un total de 275 plantas para 68 diferentes usos medicinales. Las plantas más utilizadas corresponden a: *Solanum americanum* Mill. (3,6%); *Viola odorata* L. (3,2%); *Triumfetta althaeoides* Lam. (2,4%); *Artemisia sodiroi* Hieron (2,0%); *Cestrum sendtnerianum* C. Martius (1,9%); *Alnus acuminata* Kunth (1,8%); *Costus comosus* (Jacq) Roscoe (1,7 %); *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. (1,5%); *Sambucus nigra* L. (1,4%); *Piper barbatum* Kunth (1,4%); *Verbena litoralis* Kunth

(1,4%); *Callesia integrifolia* (Spreng) Harms (1,4%); *Siparuna eggersii* Heiron (1,4%); *Peperomia congona* Sodiro (1,4%); *Rosa centifolia* (1,2%); *Ludwigia peruviana* (L.) H. Hara (1,2%); *Bidens andicola* Kunth, *Ficus subandina* Dugand, *Oreocallis grandiflora* L., y *Baccharis obtusifolia* Kunth, con el (1,2%), entre ellas un 4 % para tratar cicatrización de heridas e infecciones y un 2.23 % para dermatitis (Tene *et al.* 2007).

2.4. Fitofármacos

El término “fitofármaco” se desprende de dos raíces “fito” procede del griego que significa planta y “fármaco” medicamento, por lo tanto, en términos generales los fitofármacos son medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien preparaciones obtenidas a partir de ellas (Romero *et al.* 2005).

Según la OMS los fitofármacos “son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales” (Morales 2007).

2.4.1. Usos de los fitofármacos

Después de muchos años de poca atención a la medicina tradicional y sus recursos naturales, el interés por las posibilidades terapéuticas que ofrecen los fitofármacos fue creciendo. El valor de estos productos, dentro del marco de la terapia medicamentosa moderna, tiene cada día mayor relevancia y se puede afirmar que más del 80% de las personas a nivel mundial hace uso de estos productos (Ordoñez 2007), debido a que su uso se concentra fundamentalmente en la Atención Primaria de Salud, donde contribuyen a resolver muchos problemas de salud.

Para valorar su uso siempre se debe tomar en cuenta estudios etnobotánicos, fitoquímicos que permitan comprobar sus acciones farmacológicas (Rodríguez *et al.* 2002).

2.5. Formas farmacéuticas semisólidas

2.5.1. Cremas

Son formas farmacéuticas constituidas por dos fases, una lipofílica y otra acuosa, tienen consistencia blanda y flujo newtoniano o pseudoplástico por su alto contenido acuoso (Faulí 1993).

2.5.2. Diferencia entre crema y pomada

- La pomada fluye con dificultad y son siempre monofásicas.
- Las cremas fluyen fácilmente (Figura N° 1).

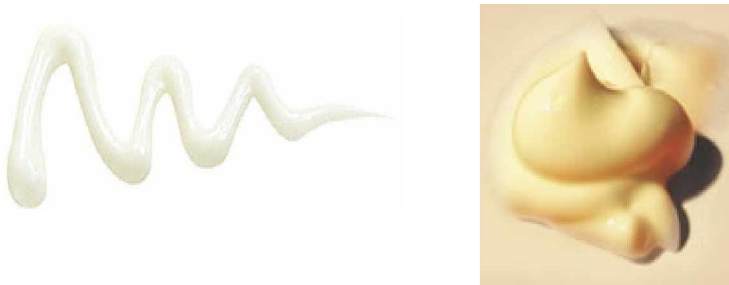


Figura N° 3. Diferencias estructurales entre crema (izquierda) y pomada (derecha).

Fuente: www.fzyb.uba.ar/farmacotecnia%20I/Dermatofarmacologia%5B1%5D.htm

2.5.3. Clasificación:

- **Cremas hidrófobas** (*Emulsiones W/O*). La fase continua o externa es la fase lipofílica debido a la presencia en su composición de tensoactivos tipo W/O. (Faulí 1993, Lieberman 1989).
- **Cremas hidrófilas** (*Emulsiones O/W*). La fase externa es de naturaleza acuosa debido a la presencia en su composición de tensoactivos tipo O/W, tales como jabones sódicos o de ceras, esterios de ácidos grasos, alcoholes grasos de alto peso molecular, etc., a veces combinados en proporciones

convenientes con tensoactivos tipo W/O. (Faulí 1993, Lieberman 1989).

2.5.3.1. Emulsión aceite en agua (o/w)

Este tipo de crema es para piel normal o con presencia de ligera resequedad, ya que las gotitas oleosas de la preparación se sitúan dentro de la fase acuosa, se absorben rápidamente en la piel sin dejar un rastro oleoso, la parte acuosa se evapora generando un efecto refrescante, la fase oleosa engrasa la piel y son solo levemente oclusivas (Faulí 1993, Lieberman 1989).

2.5.3.2. Emulsión agua en aceite (w/o)

Este tipo de crema es para piel seca o con dermatosis crónica. La fase interna consiste en gotitas de agua rodeadas por la fase oleosa, no se absorben con tanta rapidez en la piel, tienen un efecto oclusivo que reduce la pérdida transepidérmica de agua en la piel. Son adecuadas para liberar principios activos en la piel y no pueden ser lavadas con agua sola (Faulí 1993, Lieberman 1989).

2.5.4. Excipientes

Son sustancias que constituyen elementos habituales e imprescindibles en las formulaciones galénicas de los medicamentos y a pesar que no tiene acción farmacológica y son inertes, sirven para dar la forma farmacéutica (Faulí 1993). A continuación se muestra algunos de los excipientes que se utilizan en la formulación de cremas:

Ø Vehículos principales:

Para la **fase oleosa** se utilizan derivados vegetales, animales y minerales.

- s **Minerales:** Petrolatos, parafina.
- s **Vegetal:** Aceite de algodón, oliva, maíz, almendras.
- s **Animal:** aceite de bacalao.

Para la **fase acuosa**: Agua purificada.

- Ø **Vehículos secundarios:** Líquidos miscibles en agua: sorbitol, glicerina, polietilenglicoles, propilenglicol, etanol.
- Ø **Conservantes (prolonga la vida del producto).** Parabenos tales como metilo, propilo, butilo, etc.
- Ø **Reguladores de pH:** ácido cítrico, citrato de sodio, fosfatos.
- Ø **Agentes emulsificante (impiden la separación del aceite y el agua, ingredientes principales de las cremas humectantes):** estearatos glicéricos, carbómero 934, éteres tales como estearat 2, lauret 4, cera de abejas, estearato de sorbitán, alcohol cetearílico, polisorbato 60 y 80 (Raichur 2003).
- Ø **Modificadores sensoriales:** Se utiliza con el fin de dar una buena presentación del producto, entre ellos tenemos los colorantes y aromatizantes (Faulí 1993).

2.5.4.1 Excipientes grasos y productos lipoideos

Se utiliza para:

- s Mejorar las características físico-químicas, ej: mejorar la untuosidad en la piel.
- s Mayor solubilización de p.a.
- s Buscar una mejor cesión del p.a. para conseguir la absorción deseada (Faulí 1993, Lieberman 1989)

2.5.5. Métodos de manufactura de la crema

A continuación se exponen algunos protocolos de manufactura de crema, los cuales se pueden hacer por métodos manuales y mecánicos.

- Ø **Método del Vaso Precipitado** se utiliza generalmente con emulgentes sintéticos. Este consiste en calentar por separado, la fase acuosa y la fase oleosa a 60-70°C, y luego se agrega la fase interna sobre la fase externa bajo agitación. Se mantiene la agitación hasta la solidificación de la emulsión o hasta que alcance una temperatura de unos 40°C (Irache 2007).
- Ø **Método de Inversión de Fase** utilizado en el mismo caso anterior, consiste en calentar, por separado, la fase acuosa y

la fase oleosa a 60-70°C, y luego se agrega la fase externa sobre la fase interna bajo agitación. Se mantiene la agitación hasta la solidificación de la emulsión o hasta que alcance una temperatura de unos 40°C. Con este método, a pesar que es más difícil de elaborar la emulsión es estable en el tiempo (Irache 2007).

- Ø **Método de formación de emulgente in situ.** Esta es una variante del método del vasoprecipitado que se utiliza cuando el emulgente se forma in situ por saponificación de una grasa. Consiste en calentar por separado, la fase acuosa que contiene la sal alcalina que formará el emulgente y la fase oleosa que contienen el ácido graso a 60-70°C, y luego se agrega la fase interna sobre la fase externa bajo agitación. Se mantiene la agitación hasta la solidificación de la emulsión o hasta que alcance una temperatura de unos 40°C (Irache 2007).

2.5.6. Envases

El acondicionamiento y embalaje de un medicamento se efectúa a dos niveles bien definidos.

- Ø **Envase primario:** contacto directo del medicamento. Los materiales más utilizados son envases de vidrio y plástico.
- Ø **Envase secundario o estuche:** acondicionamiento del medicamento envasado. Los materiales utilizados en papel y cartón (Faulí 1993).

Para formas farmacéuticas semisólidas se utilizan envases como tubos colapsibles, que son de forma cilíndrica, flexible, plástico o metálico con recubrimiento interior y que dispensa el producto por extrusión. Estos deben ser inertes respecto a las formulaciones (Riveros 2002). Los más utilizados son las láminas de aluminio (Faulí 1993).

2.5.7. Especificaciones para cremas

Una vez elaborada la crema, se procede a realizar algunos controles descritos en la literatura especializada y adecuados

para este tipo de forma farmacéutica, entre los que se encuentran:

2.5.7.1. Características organolépticas

Su determinación u observación proporciona una primera impresión de la calidad del producto. Deben presentar aspecto homogéneo, color y olor agradable o por lo menos aceptable y textura suave luego de la aplicación vía tópica. Una vez elaborada la muestra se deben observar a diferentes intervalos de tiempo (24 horas, 1, 2, y 3 meses) con la finalidad de examinar: homogeneidad, textura, consistencia, color y olor (Signorelli 2005).

2.5.7.2. Estabilidad térmica

Consiste en determinar la estabilidad física de las preparaciones a diferentes temperaturas, en nuestra investigación (ambiente, 30°C y 45°C) condiciones dadas por el INH, mediante la observación macroscópica, pH, densidad, y extensibilidad (Signorelli 2005).

Ø Observación microscópica

Se emplea un microscopio óptico, con objetivos de: 10, 40 y 100 aumentos y ocular de 10 aumentos. Se realizan frotis de las distintas formulaciones propuestas (Fernández 2007)

Ø Determinación del pH

Se emplea un medidor de pH digital. El procedimiento para la medición del pH varía en función de la forma farmacéutica analizada (Fernández 2007). Como las emulsiones aplicadas a la epidermis deben mantener el pH de la misma, estas son de pH ligeramente ácido. Mantener este pH es complicado, debido a que algunos emulgentes sólo actúan como tales cuando el pH de la solución tiene un determinado intervalo (Devia 2007).

Ø Determinación Densidad Relativa.

La densidad relativa de una sustancia, también llamada gravedad específica, es la relación entre su densidad y la

densidad del agua a una determinada temperatura (Devia 2007).

Ø **Determinación de la Extensibilidad**

Se puede definir como el incremento de superficie que experimenta una cierta cantidad de semisólido cuando se la somete a la acción de pesos crecientes, en intervalos fijos de tiempo (Fernández 2007).

2.5.7.3. Control microbiológico

El ensayo de límite microbiano se entiende tanto como un atributo de buenas prácticas de manufactura, como de aseguramiento de calidad. Los criterios de aceptación deben estar basados en la naturaleza del producto, el método de manufactura y el uso. Todos los productos farmacéuticos naturales o de origen vegetal, deben declarar este ensayo en sus especificaciones.

Los criterios de aceptación deben contar con un recuento total de microorganismos aerobios, hongos y levaduras. También debe contemplarse la ausencia de patógenos, al menos de *Escherichia coli* y *Salmonella* para productos de uso oral y de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, si son para uso tópico.

2.6. Microorganismos de ensayo

2.6.1. Hongos

Los hongos se consideran como un reino independiente dentro de la clasificación de los seres vivos, junto a los animales, las plantas, los protozoos y las moneras (Crespo 2008).

Los hongos son organismos eucariotas, es decir, poseen un núcleo con membrana nuclear, así como una pared celular compuesta por quitina, polisacáridos y polipéptidos (Mims *et al.*1999).

Su nutrición es heterótrofa, no pueden realizar la fotosíntesis porque no tienen clorofila. Tienen digestión externa, pues vierten

al exterior enzimas digestivas, sustancias proteicas que actúan sobre los alimentos dividiéndolos en moléculas sencillas, que atacan a los alimentos. Los hongos absorben los alimentos después de digerirlos, viven como saprofitos, comensales o parásitos en una gran variedad de sustratos orgánicos y en hábitat son lugares húmedos, con abundante materia orgánica en descomposición y ocultos a la luz del sol. También pueden habitar medios acuáticos o vivir en el interior de ciertos seres vivos parasitándolos. Su estructura puede ser unicelular, como en las levaduras, o multicelular, que se caracteriza por la formación de unas células tubulares alargadas que conocemos como hifas o filamentos.

La reproducción de los hongos puede ser asexual, por esporas, y sexual (Crespo 2008, Mims *et al.* 1999).

2.6.2. Dermatofitos

Los dermatofitos o tiñas integran un grupo de hongos potencialmente patógenos para el hombre y los animales, tienen la capacidad de producir infecciones en la piel, el pelo y las uñas (Castro *et al.* 1995, Fernández. 2005).

La etimología del término “dermatofito” es muy antigua: proviene de los términos griegos *derm* (que significa piel) y *phyte* (que significa planta) (Fernández. 2005).

Los dermatofitos son hongos queratinolíticos; es decir, tienen la capacidad de digerir y utilizar la queratina como sustrato, produciendo las dermatofitosis (descritos por los griegos y los romanos, los primeros los llamaron herpes por su forma circular y los segundo tiñas que significaba larva o polilla) (Castro *et al.* 1995)

Son micosis superficiales que, aunque suelen estar restringidas al estrato córneo de la piel y sus apéndices, también pueden afectar la dermis y el tejido subcutáneo causando granulomas o pseudomicetomas (Chen *et al.* 1996, Smith *et al.* 2001).

Estos hongos filamentosos pertenecientes a los géneros anamorfos (asexuales): *Trichophyton*, *Microsporum* y

Epidermophyton, con proximadamente 43 especies, fue realizada por Emmons en 1934. Dicha clasificación estaba basada en las características de los conidios, células reproducidas mediante una fase asexual, única forma de reproducción conocida hasta entonces. Según la adaptación de cada una de las especies o variedades de estos hongos a diferentes animales u otros reservorios ecológicos se dividen, clásicamente, en especies geofílicas (viven en la tierra y ocasionalmente infectan al hombre), zoofílicas (viven en los animales y con frecuencia pueden infectar al hombre) y antropofílicas (aquellos que viven en el hombre y se transmite la enfermedad de una persona a otra) (Fernández 2005)

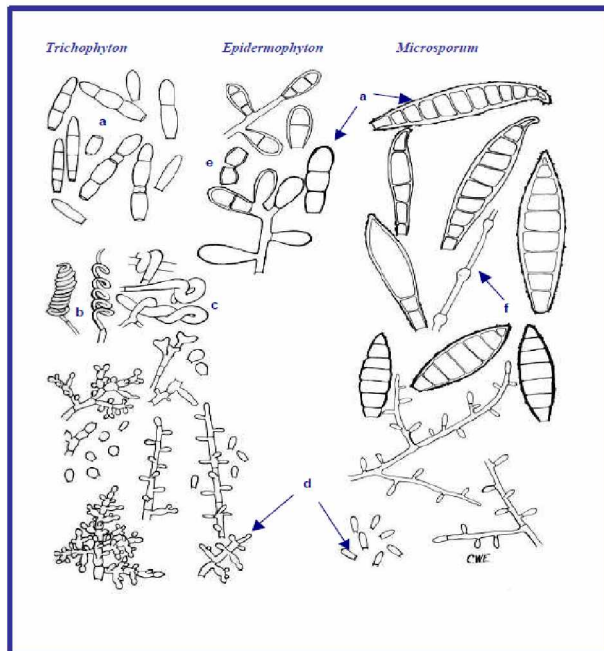


Figura Nº 4. Estructura morfológica de los diferentes tipos de géneros dermatofitos

Fuente: *Emmons 1934*

2.6.2.1. *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum es el agente causal hasta del 80% de los casos más comunes de micosis, entre ellos la tinea corporis (dermatofitosis en el cuerpo), barbae (dermatofitosis en la barba), cruris (dermatofitosis en las ingles), manuum (dermatofitosis en las manos) y onicomicosis de las manos y pies. Es una especie antropofílica de distribución mundial, alcanza cerca de un 40% de los casos de tinea. Este hongo puede infectar los vellos y la piel. Los procesos inflamatorios causados por estos agentes son generalmente crónicos, algunas veces con lesiones profundas llamadas granulomas tricofíticos (Trabulsi *et al.*1999, Fisher *et al.* 2001).

2.6.2.2. *Trichophyton mentagrophytes*

Trichophyton mentagrophytes es un dermatofito cosmopolita, que afecta con más frecuencia a humanos y animales, además este es el más aislado del hombre y animales. De acuerdo con la variedad de especies aislada puede ser zoofílico o antropofílico; por ejemplo: la variedad mentagrophytes provoca tinea pedis y tinea corporis, algunas veces invade la lámina ungueal, presentando puntos blancos en la uña. Es un agente contagioso, pudiendo ser transmitido entre animales, de animales a personas y de persona a persona (Trabulsi *et al.*1999, Fisher *et al.* 2001, Rueda 2002).

2.7. Evaluación antifúngica del extracto y del fitofármaco elaborado

Los métodos empleados para evaluar la actividad antifúngica, permiten medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a agentes antifúngicos determinando la potencia de la sustancia (extracto) (Cáceres *et al.* 1996).

Es indispensable en la evaluación de la actividad antifúngica, tomar en cuenta ciertas condiciones, debido a que los hongos presentan ciertas características como dimorfismo, requerimiento de crecimiento por tiempo prolongado, temperatura,

concentración del inóculo, el punto de lectura, el medio de cultivo, etc (Cáceres *et al.* 1996).

2.7.1. Microdilución en caldo

Esta prueba hace uso de una placa de 96 pocillos, el método de microdilución permite determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que se considera la menor concentración del compuesto frente a la cual el microorganismo ensayado no presenta desarrollo visible. El criterio de desarrollo es una turbidez definida como se presenta en el control de crecimiento; y la CMI se observa cuando no hay turbidez, es transparente como el control de esterilidad (Cos *et al.* 2006).

2.7.2. Microdilución en agar

Esta prueba es muy parecida a la anterior, con la modificación del uso de una placa de cultivo de 24 pocillos, esta prueba se realiza con la finalidad de probar una determinada concentración del extracto positivo con los microorganismos ensayos y los resultados se reportan por visualización de inhibición o crecimiento de los microorganismos comparando con el control de crecimiento. La lectura es cualitativa (Cantón *et al.* 2000).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de recolección

Tabla Nº 1. Lugar de recolección de la especie vegetal

Nombre científico	Nombre común	Lugar de recolección
<i>Piper ecuadorensis</i> Sodirol	Mático	Numbani (Zamora Chinchipe)

Fuente: La autora

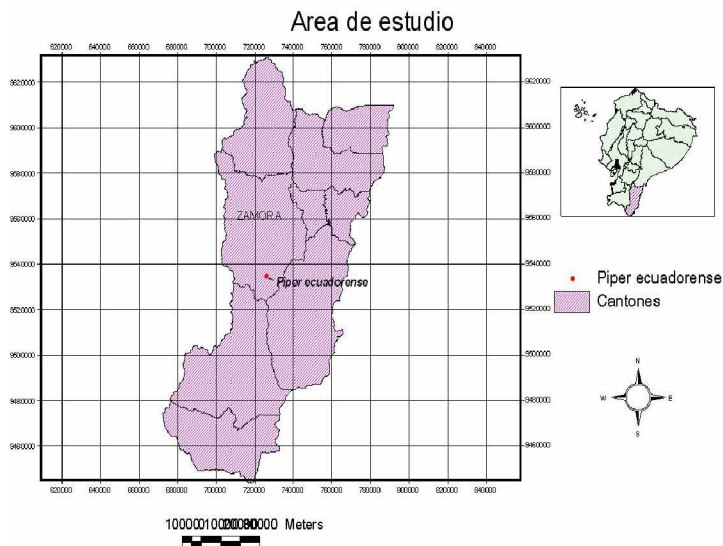


Figura Nº 5. Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal en la Provincia de Zamora Chinchipe.

Fuente: La autora

3.2. Control de calidad físico-químico de materia vegetal

Mediante el empleo de los métodos físico-químicos se pueden determinar y establecer la calidad de una droga, para ello al material vegetal se realizó una selección y limpieza luego se procedió a secar las partes útiles de la planta (hojas) a 37°C por 8 días hasta lograr un contenido promedio de humedad final

menor al 14%, el mismo que fue triturado y tamizado hasta obtener una partícula entre 250 y 600 μm tamaño apropiado para la producción de extractos (Sharapin 2000).

3.3. Observación macroscópica

La observación macroscópica de la especie se lo llevó a cabo en el Herbario de la UTPL, basándose en la forma, condición y peculiaridades de la planta según Bernal 1994.

3.4. Métodos físico-químicos aplicados al análisis de drogas crudas

3.4.1. Determinación de contenido de humedad

Se realizó de acuerdo a la Farmacognosia y Productos Naturales de Miranda 2002, para ello se tomó 2g de muestra, se transfirió a una cápsula tarada y se colocó a 105°C durante 3h en una estufa, los cálculos se realizan de acuerdo a la bibliografía citada.

3.4.2. Determinación de cenizas totales

Se procedió de acuerdo a la técnica descrita en la Farmacognosia y Productos Naturales de Miranda 2002, para ello se tomó 2g de muestra pulverizada y se lo colocó en una mufla a 700°C por 2h, los cálculos se realizan de acuerdo a la bibliografía citada.

3.4.3. Determinación de cenizas solubles en agua

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita en la Farmacognosia y Productos Naturales de Miranda 2002, para ello se tomó las cenizas totales obtenidas anteriormente, se le añade de 15 a 20mL de agua, se hace hervir suavemente a llama del mechero durante 5 min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700°C, durante 2h. Los cálculos se realizan de acuerdo a la bibliografía citada.

3.4.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

A las cenizas totales obtenidas, se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua en punto de ebullición durante 10min. Se lava el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico, no muestre presencia de cloruros (lechoso), añadiéndole una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L. El filtrado con el residuo se deseca a una temperatura de 100 a 105°C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700°C durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante.

3.5. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico

Para ello se tomó 50g de planta seca pulverizada en forma individual fue sometida a tres extracciones sucesivas, éter etílico, etanol y agua destilada, el mismo que en cada uno de las extracciones se debe macerar por un tiempo de 48h y luego filtrar, al extracto obtenido se realizaron ensayos respectivos como se detalla en los esquemas que se encuentran en el ANEXO I y el material vegetal húmedo es pesado y secado al ambiente para proceder con el siguiente solvente, en cada uno de las extracciones del extracto se calculó su concentración (Miranda 2002).

3.6. Obtención del extracto fluido

Los extractos fluidos son líquidos y corresponden, en general, a la droga seca en una proporción de 1:1 (1ml de extracto conteniendo 1g de la materia vegetal). La obtención del extracto fluido se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Silva *et*

al 2008, en el ANEXO II, se indica el protocolo y el esquema a seguir.

Una vez obtenido el extracto fluido, este fue rotaevaporado a temperatura moderada de 30-35°C, hasta obtener un extracto seco, para así evitar la degradación de los componentes activos. Finalmente el extracto obtenido perfectamente seco es almacenado a -20°C hasta su posterior empleo.

3.6.1. Cromatografía de capa fina (TLC) del extracto

Se realizó un ensayo de TLC general para el extracto seco, para ello se utilizó una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los solventes utilizados para la fase móvil fueron: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (2:0.5:0.5), los cuales permitieron una mejor separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se realizó con luz UV 254 y 366 nm. Luego se mide las distancias recorridas denominados R_f los cuales nos permiten localizar los compuestos bioactivos (Choma 2005)

Los R_f de los compuestos químicos que se muestran en las placas se calcularon de acuerdo a la fórmula que se indica a continuación y considerando como referencia la figura N°6.

Fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia desde el origen hasta el compuesto}}{\text{Distancia desde el origen al frente del solvente}}$$

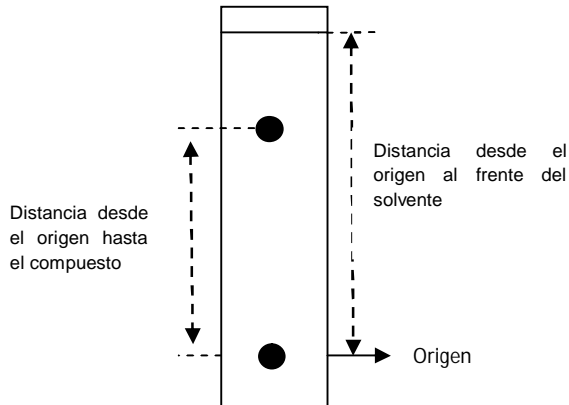


Figura Nº 6. Medida de los Rf en la placa de sílica gel 60 F₂₅₄.
Fuente: Silva *et al* 2008

3.7. Microorganismos de Prueba

Se emplearon 2 especies fúngicas: el *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y el *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188.

3.8. Prueba antifúngica del extracto

3.8.1. Microdilución en caldo

3.8.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para este ensayo se preparó una disolución de 20mg/mL de extracto seco en 1mL de Dimetil sulfóxido (DMSO), una vez preparada esta solución se empleó las placas de cultivo de 96 pocillos, en la cual se pone 180µL de caldo del primer pocillo se adiciona 20µL de la solución del compuesto de prueba, se efectúan diluciones seriadas tomando 100µL del primer pocillo y diluyendo con 100µL del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 12 diluciones consecutivas. Para la inoculación de las placas se utiliza una suspensión fúngica ajustado su población a 2×10^3 ufc/mL en medio de cultivo. 100µl de esta suspensión se usarán para completar a 200µL el volumen final en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta

tanto la población a 2×10^4 ufc/mL, así como la concentración final del extracto de 1000 a 0,5 ug/ml. Se sigue el mismo procedimiento para el control negativo (DMSO) como para el control positivo (Itraconazol 1mg/mL) y se incuba a 28°C durante 96 horas. La lectura de la CIM se realiza de manera visual y se define como la menor concentración del extracto necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba. (NCCLS 2006).

3.9. Elaboración del fitopreparado semisólido

Para la elaboración del fitopreparado semisólido se realizaron ensayos de compatibilidad entre los excipientes y el extracto, la selección de los excipientes se realizó utilizando las combinaciones basadas en el Handbook of pharmaceutical excipients 2006, con el propósito de lograr una formulación que manifieste un comportamiento estable con características organolépticas agradables, finalmente la crema elaborada fue de tipo O/W (oleoso/acuoso).

3.9.1. Formulación

Para determinar la cantidad de los excipientes, nos basamos en la formulación de Silva *et al* 2008, como se describe en la tabla N° 2.

Con referente al porcentaje de extracto, para la formulación se consideró la CMI y también basándonos en la literatura de (Sharapin 2000) que se menciona en el apartado “modelos de fichas de producción de fitofármacos semisólidos”.

Tabla Nº 2. Formulación del producto elaborado

COMPONENTES	FORMULA UNITARIA mg	FORMULA DE MANUFACTURA g	FUNCIÓN
Alcohol cetílico	800mg	8g	Agente reológico
Vaselina líquida	1500mg	15g	Fase oleosa
Vaselina sólida	500mg	5g	Fase oleosa
Cetomacrogol	800mg	8g	Emulgente aniónico
Propilenglicol	500mg	5g	Agente penetrante
Metil parabeno	18mg	0.18g	Conservantes
Propil parabeno	2mg	0.02g	Conservantes
Extracto <i>Piper ecuadorensis</i>	6.25mg	0.0625g	Principio activo
Agua	c.s.p	c.s.p	Fase acuosa
TOTAL	10000mg	100g	

Fuente: la autora

3.9.2. Procesos de fabricación

Para la fabricación del fitopreparado semisólido nos basamos en la USP 32 de los Estados Unidos y se procedió según el esquema que se muestra en la siguiente figura:

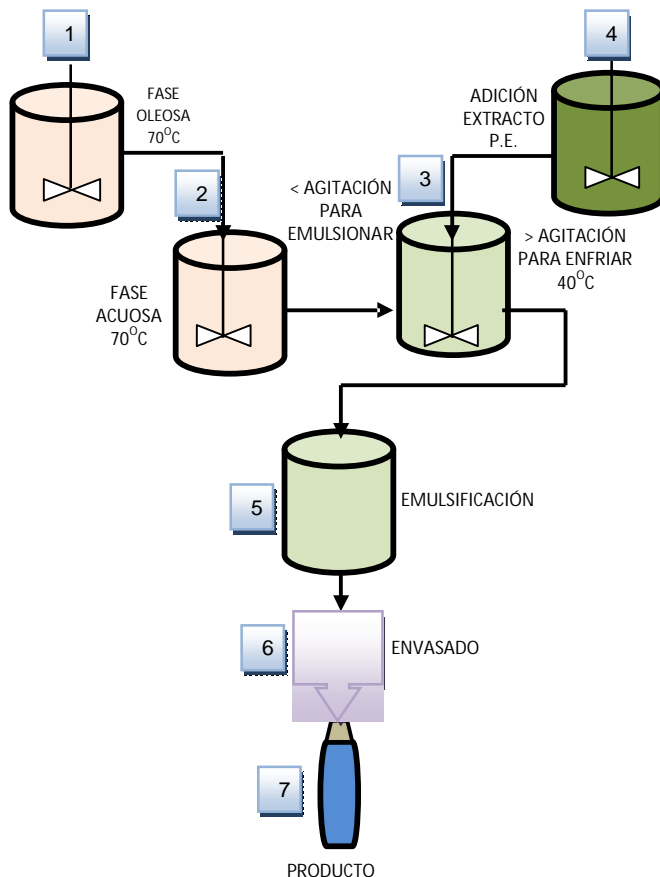


Figura Nº 7. Esquema del proceso para la obtención de la crema.

Fuente: La autora

3.9.2.1. Dilución de las fases (1 y 2)

Para la elaboración de la crema se preparó dos fases acuosa (2) y oleosa (1) por separado.

Ø **Fase oleosa (1):** Se utilizó un vaso de precipitación de 1000mL, el mismo que fue sometido a baño maría, sobre el

cual se incorporó los siguientes componentes: alcohol cetílico, vaselina líquida, vaselina sólida y como tensoactivo: cetomacrogol, manteniendo el orden de cada uno de ellos con el propósito de que se unan los excipientes, a una temperatura de 70°C y se obtenga una mezcla de color transparente.

- Ø **Fase acuosa (2):** Al igual como en la fase oleosa a baño maría se incorporan los siguientes componentes: propilenglicol y parabenos, con la ayuda de una varilla se agita hasta que alcance una temperatura de 70°C.
- Ø **Mezcla de las dos fases (3):** Manteniendo la temperatura de las dos fases se mezcla O/W y se aumenta la agitación a 100 r.p.m. por un tiempo de 10 min hasta conseguir una temperatura de 40°C, para la Incorporación del extracto (4), teniendo en cuenta que a una temperatura mayor el extracto fluido sufre degradación de los componentes químicos.

3.9.2.2. Emulsificación (5)

La emulsión débil es expuesta a shock térmico (4°C) con el fin de lograr una rápida y buena consistencia y evitar que se formen burbujas de aire y poder obtener una buena estabilidad del fitopreparado.

3.9.2.3. Envasado (6)

El fitopreparado fue envasado en tubos colapsibles de 10g previo a la esterilización en lámpara de UV por 1h (Silva *et al.* 2008).

3.10. Ensayos de Estabilidad del fitopreparado

La crema se la sometió a estabilidad durante 3 meses a temperatura ambiente, 30°C y 45°C con una humedad relativa del 75% y se le realizaron los ensayos organolépticos, físicos-químicos y microbiológicos.

Los análisis considerados, así como los métodos y técnicas aplicadas para realizar el ensayo en ésta investigación se detallan en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Técnicas aplicadas al fitopreparado.

ACTIVIDAD	MÉTODO/TÉCNICA
Análisis físico-químico	Densidad (INEN 1 595 1987-10) pH (INEN 1 596 1987-10) Extensibilidad (INEN 1 597 1987-10)
Análisis microbiológicos	<i>Aerobios mesófilos (USP 32)</i> <i>Escherichia coli (USP 32)</i> <i>Hongos-levaduras (USP 32)</i> <i>Staphylococcus aureus (USP 32)</i> <i>Speudomona aeruginosa (USP 32)</i> <i>Salmonella (USP 32)</i>
Prueba organolépticas	Aspecto, textura, consistencia y color (Tablas colorimétricas)

Fuente: la autora

3.11. Actividad biológica del fitopreparado

El ensayo se realizó sobre microplacas de 24 pocillos utilizando 100 mg de crema en 1 ml de agar sabouraud en los 3 primeros pocillos, homogenizando rápidamente para inmediatamente poner 1mL del inóculo fúngico (7mL agar sabouraud + 15 uL de hongos dermatofitos). Como testigo negativo se empleó una solución de 20µL de DMSO en 980 uL de agar y 1mL de inóculo y como testigo positivo una solución de 20 µL de Itraconazol (1mg/mL) en 980uL de agar y 1mL de inóculo, ver ANEXO IV (Cáceres *et al.* 1996).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de evaluación preliminar de material vegetal

4.1.1. Observación macroscópica de la especie en estudio

Al observar la parte macroscópica de la hoja, se puede describir que posee forma cordiforme, margen crenado, base cordada, nervadura cladódromo, superficie reticulada en el haz y reticulada pubescente en el envés y presenta una textura áspera, como se puede visualizar en la figura N° 8.



Figura N° 8. Fotografía de la hoja de *Piper ecuadorensis*
Fuente: La autora

4.2. Análisis físico-químico de material vegetal

Los resultados del análisis físico-químico realizado al material vegetal seco de la planta se indican en la tabla siguiente:

Tabla N° 4. Análisis físico-químico del material vegetal seco.

ANÁLISIS	UNIDAD	<i>Piper ecuadorensis</i>
Cenizas totales	%	7,5
Cenizas solubles en agua	%	4,1
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	%	1,5
Contenido Humedad	%	9,4

Fuente: La autora

Como se puede observar en la Tabla N° 4 el porcentaje de cenizas totales de la *Piper ecuadorensis* es de 7.5%, por lo que es necesario realizar cenizas insolubles en ácido clorhídrico, como lo menciona Miranda 2000, para conocer si las mismas están compuestas por metales pesados, la cual debe estar dentro del rango permisible de hasta 2%, el resultado que se obtuvo fue del 1,5%.

Miranda 2000, menciona que el material vegetal debe contener una humedad entre 8 – 14% para extractos fluidos, la humedad que se obtuvo es de 9,4%, de acuerdo a este resultado se puede mencionar que el material vegetal se encuentra dentro de los límites permisibles para la elaboración del extracto.

4.3. Análisis del estudio químico del extracto

4.3.1. Identificación de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico

Tomando como referencia Miranda 2002, se realizó los diferentes ensayos fitoquímicos.

La expresión de los resultados se reportan en la siguiente tabla:

Tabla N° 5. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de la especie utilizada.

METABOLITO ENSAYADO	TIPO DE EXTRACTO		
	ETEREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
Alcaloides	-	-	-
Compuestos grasos	-		
Cumarinas	-	-	
Triterpenos y esteroides	Esteroides	Esteroides	
Taninos		-	-
Saponinas		-	-
Aminoácidos		-	
Quinonas		-	
Catequinas		+	
Cartenoides		-	
Flavonoides			+
Azúcares reductores			++
Resinas		-	
Mucílagos		-	-

Fuente: La autora

(+)(++) = presencia (amarillo)

(-) = ausencia

Cuadros vacíos = no existen ensayos fitoquímicos con ese solvente

Piper ecuadorensis, no reporta información fitoquímica ni biológica; sin embargo Rubi *et al.* 1991 hace referencia al género *Piper* y reporta la presencia de amidas, lignanos, neolignanos, flavonoides, fenoles y terpenos. En nuestro caso se determinó esteroides en la fracción etérea, catequinas esteroides en la fracción alcohólica, flavonoides y azúcares reductores en la fracción acuosa, de estos los compuestos lignanos y flavonoides son los responsables de actividad antifúngica (Nayive 2008, Reddy *et al.* 2004).

Además las especies vegetales del género *Piper*, tienen una importante actividad biológica como antiviral, antibacteriano (Mesa *et al.* 2007), y particularmente antimicótico como es el caso de *Piper crassinervium* Kunth, *Piper lanceaefolium* HBK, *Piper angustifolium*, *Piper guineense*, *Piper tuberculatum*, *Piper arboreum*, *Piper hispidum*, *Piper fulvescens*, y *Piper coruscans* (Huamaní *et al* 2005).

4.4. Obtención del extracto fluido de la especie

Se eligió el proceso de percolación que a pesar de ser un procedimiento milenario, permite extraer la mayor cantidad de principios activos (Signorelli 2005), donde el contenido de sólidos totales depende del % alcohólico del mensturo y del tiempo de extracción. Los pasos a seguir en el proceso de obtención del extracto se esquematizan en el ANEXO II (Silva, *et al.* 2008); se utilizó etanol al 70% como mensturo y 48 horas de maceración, con la droga de 2mm de tamaño de partícula, posteriormente fue rotaevaporado hasta no contener etanol.

4.4.1. Análisis de cromatografía de capa fina (TLC) del extracto

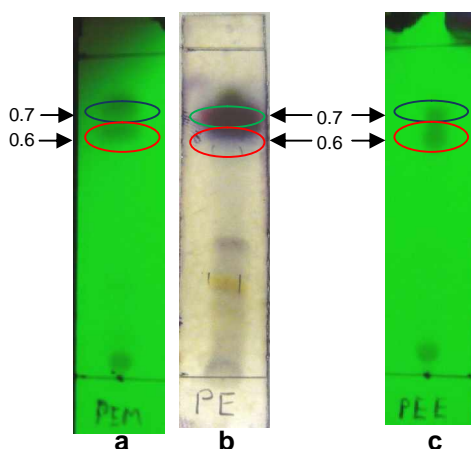


Figura Nº 9. TLC comparativa entre el extracto metanólico y etanólico de *Piper ecuadorense*

Fuente: La autora

Los resultados de la TLC directa del extracto *Piper ecuadorensis*, como se muestra en la figura N° 9, fotos (a) y (b) (revelado con vainilina) metanólico y (c) etanólico, corridos en una misma fase, indica la presencia de dos posibles compuestos bioactivos con un Rf de 0.6 y 0.7 bien definidos que nos indica la riqueza fitoquímica. Como se puede visualizar en la Figura N°10, foto d y e, se trata de los Bioautogramas de *Piper ecuadorensis* (Matico) (extracto metanólico), los mismo que indican la actividad antifúngica de esta especie frente a los dermatofitos: *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos nos indican (la zona clara) que los mismos compuestos que se observan en las fotos a, b y c, son los responsables de ésta actividad contra los dos microorganismos ensayados (Palacios 2009), lo que indica que nuestro extracto etanólico (foto c) al poseer estos compuestos también posee ésta actividad, ya que se corrieron con la misma fase y poseen los mismo Rf.

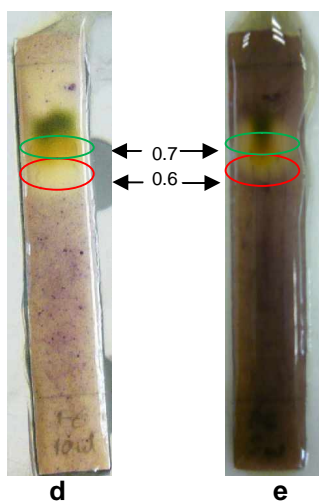


Figura N° 10. Bioautogramas del extracto metanólico de *Piper ecuadorensis* (Matico) frente a: d) *T. mentagrophytes* y e) *T. rubrum*

Fuente: Palacios 2009

4.5. Método de microdilución en caldo para el extracto

La tabla N° 6 muestra la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la especie *Piper* ecuatorense, frente a los hongos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

Tabla N° 6. Concentración Mínima inhibitoria (CMI) del extracto ensayado frente a los microorganismos de prueba.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µG/ML)		
ESPECIE EVALUADA	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Piper ecuatorense</i>	62,5	31,25
CONTROL		
Itraconazol 1mg/ml	0,03	0,03

Fuente: La autora

4.6. Elaboración del fitopreparado semisólido

El fitopreparado semisólido para aliviar afecciones tópicas causadas por dermatofitos ha sido elaborado en el laboratorio de tecnología del IQA y presenta las siguientes características como se indica en las tablas N°7, N°8, N°9, N°10, N°11 y N°12. El producto prototipo se muestra en la (figura N°11).



Figura N° 11. Producto terminado

Fuente: La autora

4.6.1. Fórmula de composición

Cada 100g contiene:	
Extracto <i>Piper ecuadorese</i>	0.0625g
Excipientes.....	c.s.p.

4.6.2. Pruebas de estabilidad del fitopreparado semisólido

Las cremas se almacenaron a las condiciones propuestas por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INH) que son: al ambiente, a temperatura de 30°C y 45°C con una Humedad relativa de 75%, durante 3 meses.

Se preparó un solo lote a escala piloto de 100 unidades, cada uno de las muestras fueron seleccionadas al azar con la finalidad de determinar la densidad, pH, extensibilidad, de igual manera evaluar las propiedades organolépticas, microbiológicas y medir la actividad biológica de la misma.

4.6.2.1 Análisis organolépticos del fitopreparado

Como se puede apreciar en la tabla N° 7 la crema presenta un aspecto homogéneo, una textura cremosa y un color yellow-green group 145 D (aportado por el extracto), solo hubo un ligero cambio de color al tercer mes en las cremas almacenadas al ambiente y a 30°C, pero se mantiene en yellow-green.

Todas poseen consistencia de crema, pero las almacenadas a 45°C, una vez transcurrido el período de 3 meses, mostró cierta fluidez.

Tabla Nº 7. Resultado de las pruebas organolépticas de la crema

ANÁLISIS	CONDICIONES	MESES			
		0	1	2	3
ASPECTO	Ambiente	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	30°C	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	45°C	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
TEXTURA	Ambiente	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
	30°C	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
	45°C	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
CONSISTENCIA	Ambiente	Crema	Crema	Crema	Crema
	30°C	Crema	Crema	Crema	Crema
	45°C	Crema	Crema	Crema	Crema
COLOR	Ambiente	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D	yellow-green group 150 D
	30°C	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D	yellow-green group 150 D
	45°C	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D	yellow-green group 145 D

Fuente: La autora

4.6.2.2. Análisis físico-químicos del fitopreparado

En la tabla N° 8 se indican los resultados de los análisis físico-químicos de la crema al ambiente, a 30°C y a 45 °C, el mismo que ha sido evaluado durante 3 meses.

Tabla N° 8. Resultados del análisis físico-químico de la crema

ANÁLISIS	UNIDADES	CONDICIONES	MESES			
			0	1	2	3
Densidad	g/cm ³	Ambiente	0.8625	0.8648	0.8649	0.8651
		30°C	-	0.8692	0.8689	0.8695
		45°C	-	0,8671	0,8589	0,8019
pH	-----	Ambiente	5.4	5.6	5.7	5.8
		30°C	-	5.7	5.7	5.8
		45°C	-	5.4	5.4	5.9
Extensibilidad	cm ²	Ambiente	81,71	85,43	85,93	85,97
		30°C	-	84,59	85,38	85,40
		45°C	-	85,44	85,48	86,54

Fuente: La autora

Al realizar un análisis estadístico de la Tabla N° 8 mediante el programa XLSTAT, los resultados fueron los siguientes:

Tabla N° 9. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre Densidad vs. Tiempo

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
45 °C vs AMBIENTE	0.028	4.340	2.448	0.005	Si
45 °C vs 30 °C	0.023	3.671	2.448	0.010	Si
30 °C vs AMBIENTE	0.004	0.668	2.448	0.529	No

Fuente: La autora

Tabla N° 10. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre pH vs. Tiempo

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
30 °C vs 45 °C	0.167	1.137	2.448	0.299	No
30 °C vs AMBIENTE	0.033	0.227	2.448	0.828	No
AMBIENTE vs 45 °C	0.133	0.910	2.448	0.398	No

Fuente: La autora

Tabla N° 11. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre Extensibilidad vs. Tiempo

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
45 °C vs 30 °C	0.697	1.775	2.448	0.126	No
45 °C vs AMBIENTE	0.043	0.110	2.448	0.916	No
AMBIENTE vs 30 °C	0.653	1.665	2.448	0.147	No

Fuente: La autora

Estos resultados nos indican que entre los factores pH y extensibilidad no existe una diferencia significativa (ver tablas N° 9 y N° 10), sin embargo, en cuanto a la densidad (ver tabla N° 8) si existe una diferencia significativa (con un límite de confianza del 95%) al comparar las condiciones de 45°C - ambiente y 45°C - 30°C, ya que la densidad depende de la composición de la fase oleosa, la proporción de las fases y la concentración del emulsificante, reflejadas en el grado de emulsificación, además mientras más alta es la temperatura más fluido se vuelve el producto, por tanto la densidad baja (Ponce *et al.* 1970). En nuestra investigación se afirma éste fenómeno ya que las cremas almacenadas a 45°C presentaron cierta fuidéz a partir del 3 mes.

4.6.2.3. Análisis microbiológico del producto

El análisis microbiológico de las muestras, se realizó en el laboratorio de bioactividad del IQA de la UTPL, los resultados se muestran en la tabla N° 11, los ensayos se indican en el ANEXO IV.

Tabla Nº 12. Resultado de análisis microbiológico de la crema

ANÁLISIS	ESPECIFICACIONES USP	CONDICIONES	RESULTADO			
			0	1	2	3
Bacterias aerobias mesófilos / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Menor a 10 ufc/g	30 ufc/g	40 ufc/g	60 ufc/g
		30°C		30 ufc/g	30 ufc/g	30 ufc/g
		45°C		30 ufc/g	30 ufc/g	30 ufc/g
Hongos, mohos y levaduras / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g
		30°C		Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g
		45°C		Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g	Menor a 10 ufc/g
Escherichia coli / g	Ausencia	Ambiente	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		45°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococcus aureus / g	Ausencia	Ambiente	ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		45°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Pseudomona aeruginosa / g	Ausencia	Ambiente	ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		45°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp / g	Ausencia	Ambiente	ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		45°C		Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: La autora

Al realizar el análisis microbiológico de la crema, se pudo comprobar que no hubo contaminación en las tres condiciones, solo un ligero crecimiento a partir del 1 mes en bacterias aerobias mesófilas, pero están dentro de los límites permisibles dados por la USP 32.

4.7. Ensayos de actividad biológica del producto

De acuerdo al ensayo realizado, se comprobó que la crema sólo presentó actividad antifúngica frente a *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 hasta el primer mes en todas las condiciones, es por ello que se procedió a realizar dos formulaciones con diferentes concentraciones de extracto; como se indica en la siguiente tabla:

Tabla N° 13. Porcentaje del extracto en las nuevas formulaciones

CANTIDAD DE EXTRACTO (g)	% EN CREMA	FUNCIÓN
0.1357 g	0.1 %	Principio activo
1.018 g	1 %	Principio activo

Fuente: La autora

Para validar éstas formulaciones se procedió a realizar certificados de análisis para cada una en base a la misma metodología utilizada para la evaluación de la crema al 0,06% durante los 3 meses, como se puede observar en el ANEXO VI y VII.

La crema al 0.1% sólo presentó actividad frente a *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, mientras que la crema al 1% es activa frente a los dos hongos: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188. Cabe recalcar que el análisis se lo realizó solamente hasta el primer mes.

En la tabla N° 14 se indica la dosis a la cual las cremas inhiben el crecimiento fúngico; por lo tanto, a una dosis de 100µg/mL la crema al 0.1% es activa solamente contra el *Trichophyton rubrum* mientras que a una dosis de 1000µg/mL la crema al 1% es activa para *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, lo cual nos permite asegurar que al aumentar la dosis del extracto,

va a aumentar la actividad de la misma, ya que la crema al 0.06% hasta el primer mes presentó actividad solo contra el *Trichophyton rubrum*, a una dosis de 60µg/mL, mientras que la crema al 1% demostró tener actividad hasta el primer mes contra los dos dermatofitos.

Tabla N° 14. Dosis del extracto (en la crema) para la inhibición del crecimiento fúngico

CREMA 0.06%		
Microorganismo	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Dosis µg/mL	NA	60 µg/mL
CREMA 0.11%		
Microorganismo	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Dosis µg/mL	NA	100 µg/mL
CREMA 1%		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Dosis µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL

Fuente: La autora

NA: No activo

4.8. Presentación del producto terminado

4.8.1. Etiqueta interna

Composición: cada 100 g contiene:
Extracto *piper ecuadorensis*..... 0.06 g
Excipientes..... C.S.P.

Dosis: La duración del tratamiento varía según la indicación y gravedad de la infección. Vía de administración: Tópica

PESO NETO: 10 g

IOA-LAB

FungiActiv®
Crema
Piper ecuadorensis 0.06 %

Elaborado por: Laboratorio IOA-UTPL. Loja-Ecuador.
B.O. Responsable: Guisella Rivera

Precauciones: Manténgase fuera del alcance de los niños. Consérvese el tubo cerrado. No exponer a temperatura mayor a 30°C y proteger de la luz.
Advertencia: Producto de uso delicado.

Figura Nº 12. Etiqueta interna de la crema prototipo 0.06%

Fuente: La autora

4.8.2. Etiqueta externa



Figura Nº 13. Etiqueta interna de la crema prototipo 0.06%

Fuente: La autora

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Ø El tamizaje fitoquímico realizado con tres solventes orgánicos (éter, etanol y agua) permitió determinar de manera general la presencia de metabolitos secundarios como: esteroides, catequinas, flavonoides y azúcares reductores, que pueden servir como puntos de inicio para aislamiento de compuestos puros y encontrar moléculas que pueden ser útiles a nivel farmacéutico.
- Ø A través del método de Microdilución en caldo, se determinó que *Piper ecuadoreense*; presenta una buena actividad antifúngica, por lo que se propuso desarrollar una forma farmacéutica, lo que garantizará un uso más sostenible de la misma.
- Ø Los resultados obtenidos de los ensayos de estabilidad del producto a los 3 meses sometidos a temperatura ambiente y a 30°C, no presentan cambios representativos en las características organolépticas, físico-químicas y microbiológicas, por lo que se puede concluir que el fitopreparado mantiene una estabilidad en ambos casos durante el tiempo establecido.
- Ø Al no ser estudiada *Piper ecuadoreense*, los resultados obtenidos del material vegetal, reportan datos importantes que podrían servir como referencia en próximas investigaciones.
- Ø Finalmente se puede concluir que el presente estudio confirmó la actividad antifúngica del fitopreparado hasta el primer mes que se evaluó la actividad; ésta actividad respalda el uso de esta planta en la medicina tradicional para tratar afecciones tópicas iniciadas por estos tipos de dermatofitos.

5.2. Recomendaciones

- Ø Continuar con el estudio de *Piper ecuadoreense*, realizando el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios con el fin de generar nuevas alternativas para la obtención de antifúngicos de amplio espectro a partir de fuentes de origen natural.
- Ø Realizar estudios *in vitro* sobre la toxicidad del extracto vegetal estudiado en la presente investigación.
- Ø Realizar estudios de estabilidad acelerada (6 meses) y de estante (1 año) del fitopreparado y verificar la variación de las características iniciales con el fin de conocer la vida útil del mismo.
- Ø Realizar análisis de HPLC al extracto para evaluar el porcentaje y la presencia de compuestos promisoriamente activos.
- Ø Perfeccionar la formulación mediante pruebas pre-clínicas y realizar estudios *in vivo* del fitopreparado con el fin de validar el producto.
- Ø En la elaboración de los productos semisólidos se empleó una tecnología accesible, por lo que se recomienda trabajar con equipos más sofisticados con el fin de escalar dicha formulación a una aplicación industrial.
- Ø Realizar trabajos de investigación similares, principalmente en el campo etnobotánico en las diferentes regiones del país, en la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos en particular y antimicrobianos en general.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Acero C.M., Cárdenas L. M., Ponce D. L.L.** (1981). Influencia de la formulación en el comportamiento del sistema emulsionado: petrolato, alcohol cetílico, lauril éter, sulfato de sodio y agua. Trabajo de tesis. *Disponible en:* <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V4N1P58-91.pdf>.
- **Aguilar. O.** (2007). Estudio Fitoquímico Exploratorio de *Peperomia uchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz (Piperaceae), Especies Endémicas. Para optar al título de Química. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- **Agrin G.** (2008). Gestión del Riesgo y Adaptación al Cambio Climático, un solo trabajo para Reducir Vulnerabilidad. Equipo Regional de Competencias “Gestión del Riesgo y Adaptación al Cambio Climático” - GTZ.
- **Andrade, J.** (2007). Estudio Etnobotánico de las plantas medicinales empleadas por la etnia Saraguro, en la parroquia San Lucas, Cantón Loja, Tesis de grado previa a la obtención de Ingeniero Agropecuario, Escuela de Ingeniería Agropecuaria. Universidad Técnica Particular de Loja.
- **Bernal C.,** (1994). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello, Tomo X. Colombia. 549p.
- **Cantillo E, Gispert E, Rivero A.** (2000). Crema dental con Manzanilla. Resumen Congreso Internacional por el Centenario de la fundación de la Escuela de Odontología, Ciudad de la Habana.
- **Cantón R., García J.E., Gómez L., Martínez L., Rodríguez C., Vila J., García J.A.** (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J. <http://www.seimc.org>
- **Cáceres A., et al.** (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1ª. Edición. Guatemala, Guatemala. Editorial Universitaria. pp. 27-33.

- **Castro A., et al.** (1995). Micosis en el Hospital universitario del Valle, 1980 –1992. *Revista Colombia Médica*, 26: 150-153.
- **Chen S, O'Donnell M, Gordon S.** (1996). Antifungal susceptibility testing using the Etest: comparison with the broth macrodilution technique. *J. Antimicrob. Chemother*, 37:265-273.
- **Choma I.** (2005). The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe.
- **Cowan M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Rev Clin Microbiol*, 12:564-582.
- **Corporación De Promoción De Exportaciones e Inversiones (CORPEI).** (2003). Estudio de Oferta y Demanda del Sector de Productos Naturales. *Latinpharma*. 47p. *Disponible en:* <http://www.intracen.org/TDC/SSTP/SUPPLYDEMANDSURVEYS/31140.pdf>
- **Cos et al.** (2006). "Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept". *Ethnopharmacology*, 106:290-302.
- **Crespo V.** (2008). Generalidades sobre los hongos. *Dermatomycosis: saprofitias y dermatofitosis Piel*, 23(7): 389-396.
- **Delgado W., Cuca L** (2007). Chemical composition of essential oil from fruits of piper hispidum Kunth. *Revista Productos Naturales*, 1(1):5-8
- **Devia P.J.** (2007). *Desarrollo De Nuevos Productos (DNP)*. Edición Dirección de Investigación y Docencia Universidad EAFIT Medellín, Colombia.
- **Faulí T. C.** (1993). *Tratado de farmacia galénica*. Primera Edición. Ediciones Copyright. Madrid. 625p
- **Fernández M. E.** (2007). Estudio comparativo de la elaboración de fórmulas magistrales semisólidas obtenidas por agitación manual y mediante un sistema de agitación mecánica. Tesis para optar al grado de Doctor en la Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia departamento de farmacia y tecnología farmacéutica.

- **Fernández B.** (2005). Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili Reus, España.
- **Fisher F., Cook N.B.** (2001). Micología: Fundamentos y diagnóstico, Rio de Janeiro: revinter.
- **Flores E., Jiménez A., Ravelo A., Bourdy G., Giménez A.** (2000). Estudio Fitoquímico de catorce especies del Género Piper con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. Biofarbo, VIII: 9-16.
- **García N, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, Rojas MG.** (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol, 87(1):85-8.
- **Huamaní A.M., Ruiz Q.J.** (2005). Determinación de la actividad antifúngica contra Candida albicans y Aspergillus niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico. *Disponible en:* http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani_am/html/index-frames.html
- **Irache J.M.** (2007). Formas farmacéuticas destinadas a la vía percutánea. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Navarra.
- **Jaramillo L.** (2006). Estudio Etnobotánico en la Parroquia San Lucas, Cantón Loja, Provincia Loja. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Ambiental, in Escuela de Gestión Ambiental: Universidad Técnica Particular de Loja. 99 p.
- **Joergensen, P. & S. Leon-Yanez.** (1999). Catalogue of vascular plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis. U.S.A. 798 p.
- **León L., Cueva P., Aguirre Z, Kvist L** (2006). Floristic composition, structure, endemic and ethnobotany in the native forest "El Colorado", in Puyango, Province of Loja. Lyonia, 10(2):105-115. *Disponible en:* <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.413.1>
- **Lieberman.** (1989). "Pharmaceutical Dosage Forms Disperse Systems", Marcel Decker, USA. *Disponible en:*

www.ffyb.uba.ar/farmacotecnia%20I/De
rmatofarmacia%5B1%5D.htm

- **López SN., Castelli MV., Zacchino SA., Dominguez JN., Lobo G., Charris-Charris J., Cortes JC., Ribas JC., Devia C., Rodriguez AM., Enriz RD.** (2001). In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem.* 9(8):1999-2013.
- **López Y.** (1995). Determinación de los fitoconstituyentes de las hojas de *Piper angustifolium* L. "matico" ensayo de la actividad antihemorrágica de sus extractos en *Oryctolagus cuniculus*. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo - Perú
- **Lopez A., Hudson JB., Towers GH.** (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombia medicinal plants. *J Ethnopharmacol,* 77:189-196
- **Mesa AC., Bueno S.J., Betancur G.L.** (2004) Natural products with antimycotic activity. *Rev Esp Quimioter.* 7: 325-331.
- **Mesa A., Montiel J., Martínez C., Zapata N., Bueno J., Stashenko E** (2007). Actividad in vitro anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia piperaceae. *Rev. Scientia et Technica Año XIII, N° 33:* 247-249.
- **Mims C., et al.,** (1999). *Microbiología Médica*, 2ed. Manole: São Paulo.
- **Molina J., García A** (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva,* 20: 377-387.
- **Miranda C,** (2002). Folleto de prácticas de farmacognosia y productos naturales, La Habana-Cuba. 126p.
- **Morales S. M.** (2007). Fitofármacos en el Hospital. SOCHIFITO. *Phytomedchile. Disponible en:* <http://phytomedchile.blogspot.com/2007/01/fitofarmacos-en-el-hospital.html>
- **Morocho V.** (2006) Estudio etnobotánico de especies medicinales en la comunidad indígena Saraguro de la

- Provincia de Loja Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, in Escuela de Ingeniería Agropecuaria. Universidad Técnica Particular de Loja. 109 p.
- **Nayive P. B.** (2008). Actividad Antibacteriana A Partir Del Extracto De Hojas de Seis Especies del Género Piper L. (PIPERACEAE). Revista Institucional Tecnológica del Choco, 27(1): 67-75.
 - **Navarro G., Fabiola R.** (2002). Comprobación del efecto cicatrizante de Peperomia scutellaefolia R. et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Tesis (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, p 104.
 - **National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI.** (2006). Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard- Ninth Edition. M2-A9: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 - **Oliveira M., Velázquez, D., Bermúdez. A.** (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Revista de ciencia y tecnología de América.30 (8): 453-459
 - **Ordoñez A.L.** (2007). Fitofármacos: Medicina Alternativa en Comuna Rural “El Manantial” (Argentina). Latin American Journal of Pharmacy. 26 (3):449-453.
 - **Ortiz S.Y., Lopez G. T., Padro R.L and Velásquez A.Y.** (2009). Estabilidad de dos tinturas de *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. (ítamo real). *Rev Cubana Plant*, 14(2): 1-10.
 - **Peña L. A., et al.** (1997). Actividad biológica comprobada en algunas especies de Piper. Memorias V Congreso Colombiano de Fitoquímica. Medellin. P. 107-120.
 - **Palacios D.** (2009). “Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante) y *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro)”. Tesis de grado

previa a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutico Universidad Técnica Particular de Loja. 86p.

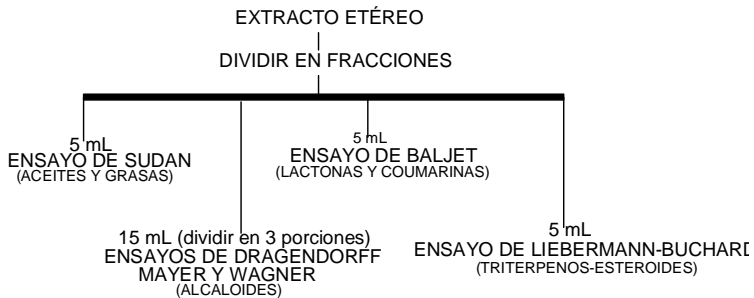
- **Raichur P.** (2003). Ayurveda: las mejores técnicas para conseguir una belleza verdadera. 3ª edición. Editorial AMAT. 480p. *Disponible en:* <http://books.google.com>.
- **Reddy, S.V., Srinivas, P.V., Praveen, B.** (2004). Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine*11:697-700
- **Remington** (1995). Farmacia Tomo II, 19ª edición. Panamericana. Madrid-España. 3020p.
- **Riveros D. G., et al.** (2002). Manual De Normas Técnicas De Calidad Guía Técnica De Análisis. Tercera Revisión. Bogota, D.C.
- **Rodríguez. R, M., López. G, R y Casas. B, J.** (2002). Fitofármacos en la Atención Primaria de la Salud: Disponibilidad y Uso. *Acta Farm. Bonaerense.* 21 (3): 213-7.
- **Romero O., Reyes H., Torres I., Barrio T., Herrera A y Tortoriello H.** (2005). *Conocimiento sobre fitofármacos* en médicos de atención primaria del estado de Morelos. *Revista Medica IMSS;* 43(4): 281-286. *Disponible en:* <http://www.schwabe.com.mx/fito/index.html>.
- **Rowe R.** (2006). Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. Published by the Pharmaceutical Press. 889p.
- **Rubi L., et al.** (1991). "Investigacao Fitoquimica em especies de Piperaceae", *Revista Brasileira de Farmacia,* 72(1):15-17.
- **Rueda R.** (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colomb Med,* 33: 10-16
- **Serralta L., Castro, A.** (1994). "Las plantas medicinales: un recurso terapéutico de la medicina tradicional en Quintana Roo. *Revista Salud Quintana Roo,* 4 (3): 16-18.
- **Sharapin N,** (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos, Convenio Andrés Bello, Bogotá-Colombia. 246p.
- **Smith KJ., Welsh M., Skelton H.** (2001). *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. *Br. J. Dermatol.* 145:344-348.

- **Signorelli I., Isla M.** (2005). Elaboración de una crema para uso tópico a base de *Urtica dioica* L. Revista de la facultad de farmacia, 47 (2).
- **Silva P, Tene A.** (2008). Adaptación tecnológica para la elaboración de un fitopreparado semisólido para aliviar la tos causado por resfrió a partir de *Lepidium chichicara* Desv., *Mentha piperita* L., *Solanum americanum* Mill., *Clinopodium* sp. L., en base a los conocimientos ancestrales de los Hampi yachakkuna de San Lucas - Loja – Ecuador. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutico e Ingeniero Químico. Escuela de Bioquímica y Farmacia e Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ingeniería Agropecuaria. 86p.
- **Soto R., Aguila Y., Delgado I.** (2006). Producción, uso y comercialización de las plantas medicinales en el municipio Rodas. Centro de Estudios para la Transformación Agraria Sostenible. Editorial Universo Sur. Universidad de Cienfuegos. 34 pág.
- **Tene, V., Malagón O.,Vita FinziP., Vidari G., Armijos Ch., Zaragoza T.** (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador, *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 63-81
- **Torre L., Alarcón S.D., Kvist L.P and Salazar L.J.** (2008). Usos medicinales de las plantas. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus: 105–114
- **Trabulsi R., et al.** (1999). *Microbiología*, 3ed. Atheneu: Saõ Paulo.
- **Ulloa Ulloa Carmen and Moller Jorgensen Piter** (2009) *Arboles y Arbustos de los Andes Ecuatorianos*. Disponible en: www.efloras.org
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=125531
- **Ulloa C., Neill D.** (2005). Cinco años de ediciones de la flora del Ecuador, 1999-2004. Editorial UTPL, Quito, 94 p.

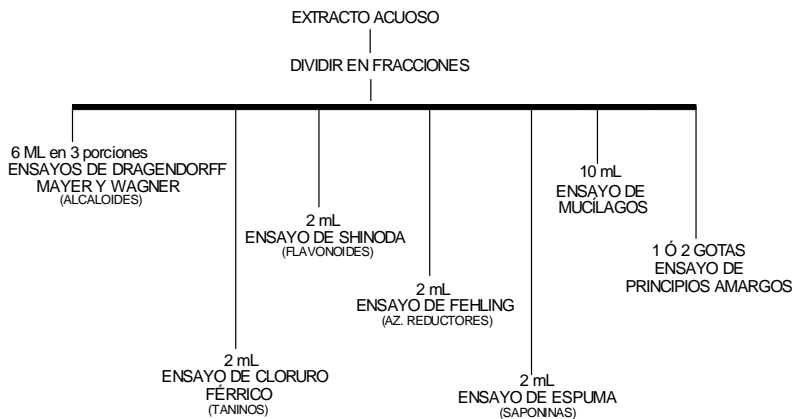
ANEXOS

ANEXO I

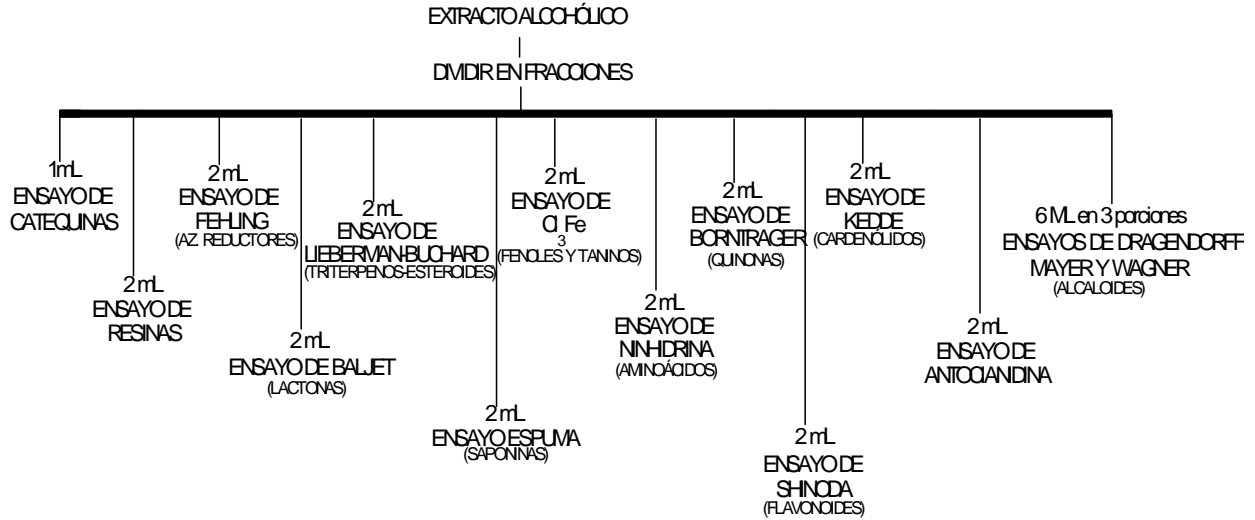
Esquema I. Reacciones a realizar en el extracto de éter etílico



Esquema II. Reacciones a realizar en el extracto acuoso



Esquema III. Reacciones a realizar en el extracto alcohólico

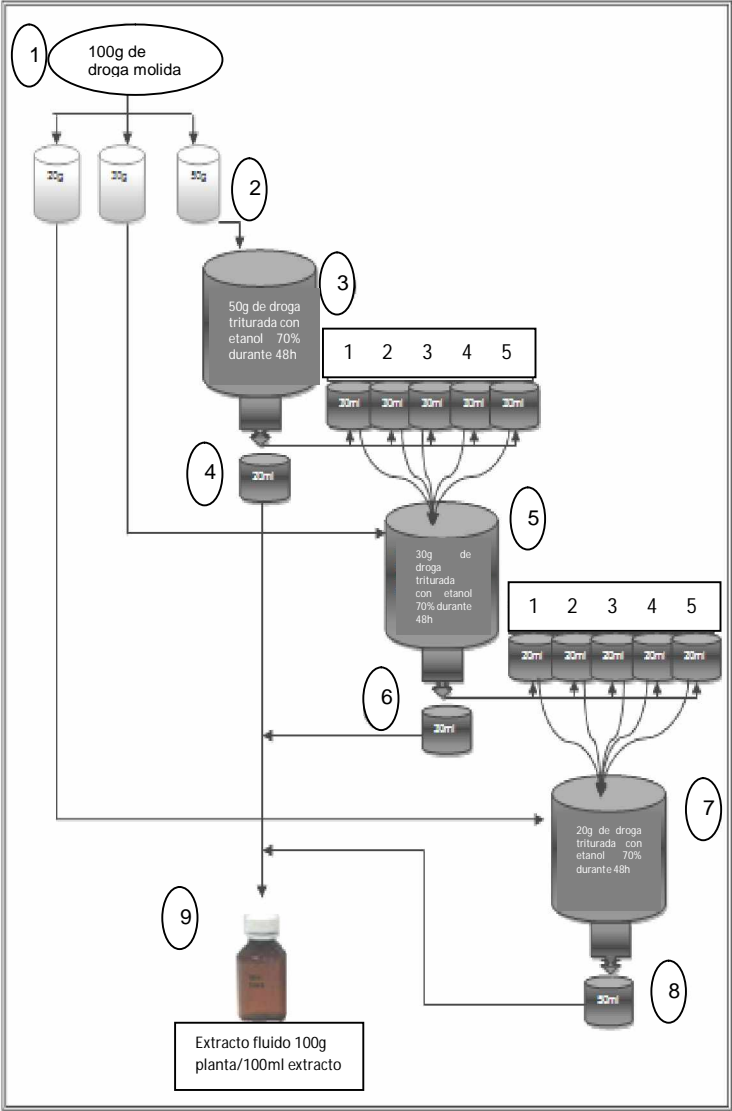


ANEXO II

Protocolo de percolación en un tiempo de 48h y alcohol al 70%

- Dividir 100g de droga molida en 3 porciones: 50g, 30g, 20g.
- Humectar con solvente hidro-alcoholica al 70% los 50g por 15 minutos.
- Trasladar el polvo humedecido de 50g a un percolador, cuya capacidad no debe ser mucho mayor que la del volumen de droga húmeda, presionar suavemente sobre el mismo, seguidamente saturar con el solvente etanol-agua al 70% y macerar por 48h.
- Luego del tiempo establecido realizar la percolación, recoger y apartar los primeros 20ml (primera fracción), luego recoger 5 porciones sucesivas de 30ml cada una de las cuales se enumeran en el orden en que se obtienen.
Humedecer la segunda porción de droga molida (30g) con los primeros 30ml del extracto, presionar suavemente, luego incorporar en orden los extractos apartados de la percolación anterior y macerar por 48h.
- Realizar la percolación, recoger 30ml (segunda fracción) y las 5 porciones sucesivas de 20ml.
- Humedecer la tercera porción de droga molida (20g) con los primeros 20ml del extracto, presionar suavemente, luego incorporar en orden los extractos apartados de la percolación anterior y macerar por 48h.
- Realizar la percolación y recoger los primeros 50ml (tercera fracción).
- Mezclar el extracto de las 3 fracciones, apartados anteriormente para obtener la relación 1:1 es decir 100ml de extracto fluido obtenida de 100g de droga molida.

Esquema del proceso de percolación



ANEXO III

Resultados cualitativos de metabolitos secundarios en el tamizaje fitoquímico



Azúcares reductores

Extracto acuoso

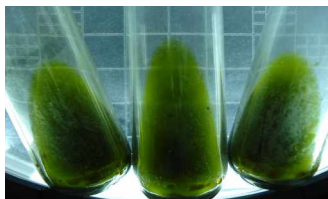
Fuente: La autora



Catequinas

Extracto alcohólico

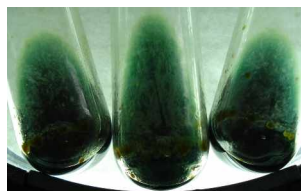
Fuente: La autora



Triterpenos y esteroides

Extracto alcohólico

Fuente: La autora



Triterpenos y esteroides

Extracto acuoso

Fuente: La autora



Flavonoides

Extracto acuoso

Fuente: La autora

ANEXO IV

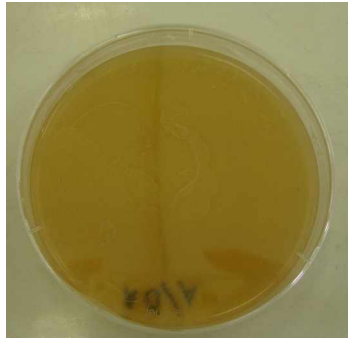
Resultados de los análisis microbiológicos en agar realizados al producto

Fotografía de Aerobios mesófilos



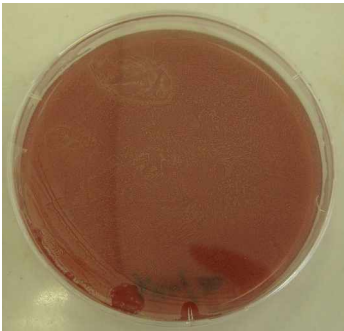
Fuente: La autora

Fotografía Hongos, mohos y levaduras



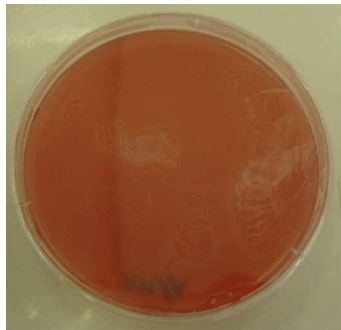
Fuente: La autora

Fotografía de *Escherichia coli*



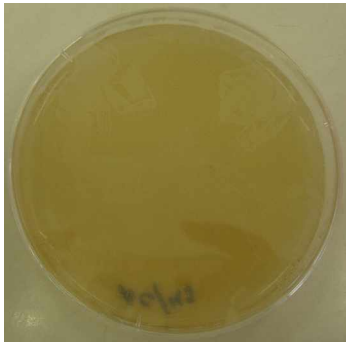
Fuente: La autora

Fotografía de *Staphylococcus aureus*



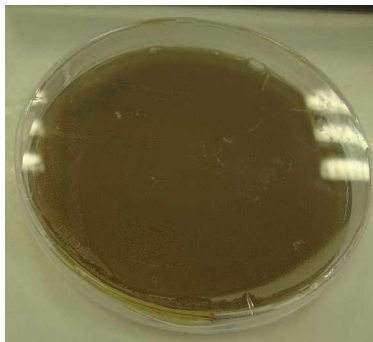
Fuente: La autora

Fotografía de Pseudomona aeruginosa



Fuente: La autora

Fotografía de Salmonella



Fuente: La autora

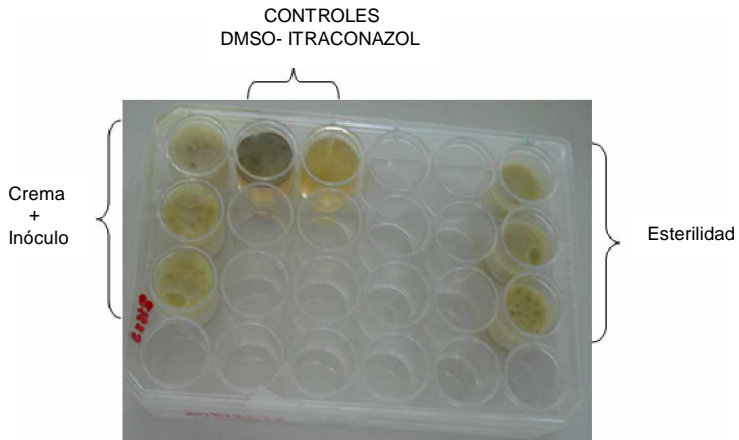
ANEXO V

Actividad biológica de la crema al 1 % frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185



Fuente: La autora

Actividad biológica de la crema al 1 % frente a *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188



Fuente: La autora

ANEXO VI



INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA Ecuador C. Ltda.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

PRODUCTO: CREMA Fungi Active 0.1 %

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN	Crema viscosa de color amarillento ligeramente verdoso (yellow-green group 145 C) de aspecto uniforme, libre de impurezas visibles.	Conforme
IDENTIFICACIÓN: DEL p.a	Por macrodilución en agar para <i>T. rubrum</i>	Positivo
PESO MEDIO	25 g ± 1g	Conforme
pH	5.1 – 5.7	Conforme
UNIFORMIDAD DE DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS	Distribución al observar al microscopio	Conforme
EXTENSIBILIDAD	70.00 – 90.00 cm ²	84.95 cm ²
DENSIDAD	0.800 – 0.900 g/cm ³	0.8516 g/cm ³

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Bacterias aerobias mesófilos / g	Máximo 100 ufc / g	Menor a 10 ufc / g
Hongos, mohos y levaduras / g	Máximo 100 ufc / g	Menor a 10 ufc / g
Escherichia coli / g	Ausencia	Ausencia
Staphylococcus aureus / g	Ausencia	Ausencia
Pseudomona aeruginosa / g	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp / g	Ausencia	Ausencia

ANEXO VII



INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA Ecuador C. Ltda.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

PRODUCTO: CREMA Fungi Activ 1%

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN	Crema viscosa de color amarillento ligeramente verdoso (yellow-green group 146 C) de aspecto uniforme, libre de impurezas visibles.	Conforme
IDENTIFICACIÓN: DEL p.a	Por macrodilución en agar para <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	Positivo
PESO MEDIO	25 g ± 1g	Conforme
pH	5.1 – 5.7	Conforme
UNIFORMIDAD DE DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS	Distribución al observar al microscopio	Conforme
EXTENSIBILIDAD	70.00 – 90.00 cm ²	80.91cm ²
DENSIDAD	0.800 – 0.900 g/cm ³	0.8612g/cm ³

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Bacterias aerobias mesófilos / g	Máximo 100 ufc / g	Menor a 10 ufc / g
Hongos, mohos y levaduras / g	Máximo 100 ufc / g	Menor a 10 ufc / g
Escherichia coli / g	Ausencia	Ausencia
Staphylococcus aureus / g	Ausencia	Ausencia
Pseudomona aeruginosa / g	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp / g	Ausencia	Ausencia