



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Optimización y evaluación *in vitro* de un fitocosmético a partir del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* Sodiro de la región sur del Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Sarango Granda, Paulo Cesar

DIRECTOR: Ojeda Riascos, Edgar Santiago, M. Sc.

LOJA - ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Master of Science.

Edgar Santiago Ojeda Riascos.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **Optimización y evaluación *in vitro* de un fitocosmético a partir del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* Sodiro de la región sur del Ecuador** realizado por **Sarango Granda Paulo Cesar**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2017

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Sarango Granda Paulo Cesar** declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Optimización y evaluación *in vitro* de un fitocosmético a partir del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* Sodiro de la región sur del Ecuador**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Edgar Santiago Ojeda Riascos director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigado, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 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 tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Autor: Sarango Granda Paulo Cesar

Cédula: 1105339442

DEDICATORIA

Dedico de manera especial este trabajo a toda mi familia, principalmente a mi madre Rocío Granda, a mi querida abuelita Celina Rodríguez y mi tía Rosa Granda quienes son el pilar fundamental para mi formación como persona y profesional, por brindarme su cariño y amor desde mi nacimiento, por cuidarme, brindarme cobijo, confianza, consejos y por enseñarme a que uno siempre tiene que seguir los sueños y hacerlos realidad siempre manteniendo la debida responsabilidad, respeto y humildad.

También dedico este trabajo a todas las personas que me brindaron su apoyo y aquellas que forman parte de mi vida desde el momento que ingresé a la universidad.

AGRADECIMIENTO

“Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán...” [Proverbios 16:3], Gracias Dios porque tu amor y bondad no tienen fin, y me permites sonreír ante mis logros que son el resultado de tu ayuda.

Este trabajo de fin de titulación es una dicha y agradezco a mi madre Rocío Granda, por brindarme el apoyo incondicional que una madre puede dar a sus hijos.

A la Universidad Técnica Particular de Loja a través de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, por enseñarme el camino del humanismo de Cristo, el desarrollo en la formación integral como persona y por acogerme y abrirme las puertas para poder cumplir mis objetivos a nivel personal como académico.

Al M. Sc. Santiago Ojeda Riascos que además de ser coordinador de titulación y mi tutor de tesis, ha llegado ser un buen amigo, y gracias a su apoyo y enseñanzas se ha logrado completar con éxito cada punto de este trabajo, asimismo a la Mgtr. Carolina Espinoza que muy amablemente a través de su guía y sus enseñanzas me brindó el apoyo necesario para el desarrollo de este proyecto.

Al Grupo de Danza Jahua Ñan que llegaron a convertirse en mi segunda familia y que presentación a presentación fueron ocupando un gran espacio en mi vida y gracias a ellos aprendí el verdadero valor del tiempo.

En el transcurso de la vida conocemos a muchas personas y cada una de ellas remarca un punto importante en nuestra persona, es por ello que agradezco a toda mi familia, mis docentes, mis amigas y amigos de carrera, de danza, de voluntariado, etc., que me brindaron sus consejos y palabras de aliento en cada momento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
CAPÍTULO 1	6
MARCO TEÓRICO	6
1.1. Medicina Natural y Tradicional	7
1.2. Plantas Medicinales empleadas en Ecuador	7
1.3. <i>Piper ecuadorensis Sodiro</i>	8
1.3.1. Taxonomía y distribución de la especie vegetal.	8
1.3.1.1. <i>Características botánicas de Piper ecuadorensis</i>	9
1.3.1.2. <i>Composición química de Piper ecuadorensis y aplicaciones terapéuticas.</i>	10
1.4. Actividad biológica antifúngica	10
1.4.1. Hongos.	11
1.4.2. Dermatofitos.	11
1.5. Extractos de plantas para fines farmacológicos	13
1.5.1. Métodos de obtención y caracterización de extractos.	13
1.5.1.1. <i>Molienda y maceración.</i>	13
1.5.1.2. <i>Tamizaje fitoquímico</i>	13
1.6. Fitocosmético	14
1.7. Forma farmacéutica	15
1.7.1. Formas farmacéuticas semisólidas	16
1.7.1.1. <i>Crema hidrófila (O/W)</i>	16
1.7.1.2. <i>Crema hidrófoba (W/O)</i>	16
1.8. Desarrollo de formas farmacéuticas	17
1.8.1. Estudios de preformulación.....	17
1.8.2. Estudio de compatibilidad API/Excipiente.....	17

1.9.	Control de Calidad.....	19
1.9.1.	Evaluación organoléptica.....	19
1.9.3.	Evaluación microbiológica.....	20
1.9.4.	Estabilidad.....	20
1.10.	Sistema de garantía de la calidad.....	22
1.10.1.	Optimización de los procesos de fabricación.....	22
CAPÍTULO 2		24
METODOLOGÍA		24
2.1.	Área de recolección de material vegetal.....	25
2.2.	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	25
2.3.	Procesamiento Pos-cosecha.....	26
2.4.	Triturado y Tamizado de material vegetal seco.....	26
2.5.	Control de calidad de material vegetal.....	26
2.5.1.	Análisis físico – químicos por método gravimétrico.....	27
2.5.1.1.	<i>Determinación de humedad.....</i>	27
2.5.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales.....</i>	27
2.5.1.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua.....</i>	28
2.5.1.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i>	28
2.5.1.5.	<i>Determinación de sustancias solubles.....</i>	29
2.5.2.	Análisis microbiológico.....	29
2.5.2.1.	<i>Determinación de aerobios mesófilos.....</i>	29
2.5.2.2.	<i>Identificación cualitativa de E. coli.....</i>	29
2.5.2.3.	<i>Recuento de hongos y levaduras.....</i>	30
2.5.3.	Análisis Cualitativo.....	30
2.5.3.1.	<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	30
2.6.	Extracto etanólico.....	30
2.7.	Control de calidad del extracto etanólico.....	31
2.7.1.	Análisis organoléptico del extracto.....	31
2.7.2.	Análisis físico – químicos del extracto.....	31
2.7.2.1.	<i>Determinación de pH.....</i>	31
2.7.2.2.	<i>Determinación de densidad relativa.....</i>	31
2.7.2.3.	<i>Determinación de sólidos totales.....</i>	32
2.7.3.	Valoración del principio activo.....	32
2.7.3.1.	<i>Cromatografía en capa fina.....</i>	32
2.7.3.2.	<i>Espectrofotometría UV-vis.....</i>	31
2.7.4.	Evaluación antifúngica del extracto.....	32
2.7.4.1.	<i>Microorganismos de estudio.....</i>	32
2.7.4.2.	<i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Método M-38A.....</i>	33

2.7.4.3.	<i>Preparación del inóculo</i>	34
2.8.	Estudios de preformulación.....	34
2.8.1.	Ensayos de solubilidad.....	34
2.8.1.1.	<i>Ensayos de solubilidad entre excipientes candidatos</i>	34
2.8.1.2.	<i>Ensayos de solubilidad API/Excipientes</i>	34
2.8.2.	Diseño factorial.....	35
2.8.2.1.	<i>Composición de las mezclas</i>	35
2.8.2.2.	<i>Elaboración y acondicionamiento de las mezclas</i>	36
2.8.2.3.	<i>Análisis de mezclas</i>	36
2.9.	Formulación.....	37
2.9.1.	Desarrollo de crema antifúngica O/W.....	37
2.9.2.	Proceso de fabricación.....	37
2.9.3.	Control de calidad de producto terminado.....	38
2.9.3.1.	<i>Evaluación organoléptica</i>	38
2.9.3.2.	<i>Evaluación físico – química</i>	38
2.9.3.3.	Evaluación microbiológica.....	39
CAPÍTULO 3	41
RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
3.1.	Caracterización de material vegetal.....	42
3.1.1.	Observación macroscópica.....	42
3.1.2.	Análisis físico – químicos y microbiológicos del material vegetal.....	42
3.1.3.	Optimización del rendimiento en base al tamaño de partícula.....	44
3.2.	Tamizaje Fitoquímico.....	44
3.3.	Extracto etanólico.....	45
3.3.1.	Control de calidad del extracto etanólico.....	46
3.3.2.	Valoración del principio activo.....	46
3.3.3.	Evaluación antifúngica <i>in vitro</i> del extracto etanólico.....	50
3.4.	Preformulación.....	51
3.4.1.	Ensayos de solubilidad.....	51
3.4.2.	Estudio de compatibilidad del extracto etanólico – excipientes a través del diseño factorial 2 ³	53
3.5.	Formulación.....	63
3.5.1.	Control de calidad de producto terminado.....	64
3.5.1.1.	<i>Evaluación física, química y microbiológica</i>	64
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la especie vegetal de estudio	8
Tabla 2. Disolventes sugeridos en los estudios de preformulación.....	18
Tabla 3. Terminología descriptiva de propiedades organolépticas.....	31
Tabla 4. Características de crecimiento in vitro de <i>Trichophyton spp.</i>	34
Tabla 5. Categorización de solubilidad basada en valoración descriptiva.....	35
Tabla 6. Diseño factorial 2 ³	36
Tabla 7. Distribución de mezclas.....	36
Tabla 8. Fórmula de determinación de extensibilidad.....	38
Tabla 9. Análisis físico - químicos de material vegetal.....	43
Tabla 10. Análisis microbiológico de las hojas de <i>P. ecuadorensis</i>	43
Tabla 11. Rendimiento del extracto en base al tamaño de partícula.....	44
Tabla 12. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto de <i>P. ecuadorensis</i>	45
Tabla 13. Rendimiento del extracto	45
Tabla 14. Resultado de análisis organolépticos, físico-químicos y microbiológicos del extracto.....	46
Tabla 15. Curva de calibración de Pinocebrin.....	49
Tabla 16. Porcentaje de pinocebrin en 50 µg/mL de extracto de <i>P. ecuadorensis</i>	50
Tabla 17. CMI del extracto de <i>P. ecuadorensis</i> frente a cepas dermatofíticas.....	51
Tabla 18. Solubilidad entre excipientes candidatos	52
Tabla 19. Matriz para el desarrollo de las mezclas	54
Tabla 20. Mezclas obtenidas a partir diseño factorial 2 ³	54
Tabla 21. Concentración y porcentaje de degradación de pinocebrin en crema (2mg/ml) después de almacenamiento a Temperatura ambiente y 40°C por 20 días	55
Tabla 22. Resultado del Análisis de Varianza de los efectos principales (T°Ambiente)	57
Tabla 23. Resultados del ANOVA de las interacciones dobles Respuesta vs. Tratamiento.	58
Tabla 24. Comparación en parejas de Tukey de las interacciones dobles (confianza de 95%)	59
Tabla 25. Regresión factorial 40°C vs. Factores, resultados de ANOVA.	62
Tabla 26. Fórmula porcentual, unitaria y de manufactura del prototipo de <i>Piper ecuadorensis</i> 1,5%.....	63
Tabla 27. Evaluación física, química y microbiológica del producto terminado	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Piper ecuadorese</i> en Ecuador.....	9
Figura 2. Espécimen de <i>Piper ecuadorese</i> Sodiro en estado silvestre a 2410 m.s.n.m, Parroquia de San Lucas, Loja - Ecuador.....	9
Figura 4. Micronidios, macronidios y micelio de <i>T. methagrophytes</i> ATCC® 9533, tinción Floxin. 100x aumento.	12
Figura 3. Micronidios y macronidios de <i>T. rubrum</i> ATCC® 28188, tinción azul de algodón lactoferol. 360x aumento.....	12
Figura 5. Proceso simplificado de desarrollo de formulación, puntos claves.	21
Figura 6. Procesos de control e integración de validación y optimización de productos dentro de la industria farmacéutica.	23
Figura 7. Ubicación del área de recolección de <i>Piper ecuadorese</i> Sodiro, Parroquia San Lucas, Loja, Ecuador.	25
Figura 8. Rango ideal de porcentaje de humedad en planta seca.	26
Figura 9. Ensayo de Fehling para azúcares reductores	30
Figura 10. Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F ₂₅₄ (fase inversa).....	31
Figura 11. Descripción de la estructura química del pinocebrin.....	32
Figura 12. Modelo de caja multipocillos TC96 para hongos con las concentraciones del extracto (µg/mL)	33
Figura 13. Esquema de elaboración de fitocosmético a base de <i>Piper ecuadorese</i>	37
Figura 14. Proceso de identificación y recuento de aerobios mesófilos en fitocosmético	39
Figura 15. Hojas de <i>Piper ecuadorese</i> . A) Haz de la hoja. B) Envés de la hoja.....	42
Figura 16. Cromatografía en Capa Fina (TLC) de extracto y estándar.	47
Figura 17. Coloración del producto terminado.....	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Máximo espectro de absorción del estándar de referencia (pinocembrin 5 ug/mL)..	48
Gráfico 2. Curva de calibración. Estándar de Pinoembrin (5µg/mL)	49
Gráfico 3. Prueba de solubilidad de excipientes/api	53
Gráfico 4. Efectos Principales (temperatura ambiente)	56
Gráfico 5. Interacciones dobles (temperatura ambiente)	58
Gráfico 6. Grafica de Caja. Respuesta vs. Tratamiento	59
Gráfico 7. Diagrama de pareto de efectos estandarizados (T° ambiente, $\alpha=0,05$)	60
Gráfico 8. Efectos principales (40°C)	61
Gráfico 9. Interacciones dobles 40°C (ajuste de medias)	62

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO 001.** POE: Preparación y procesos de caracterización de material vegetal.
- ANEXO 002.** POE: Molienda, extracción y análisis cualitativo de material vegetal.
- ANEXO 003.** POE: Control microbiológico de material vegetal.
- ANEXO 004.** POE: Activación, esporulación y criopreservación de cepas fúngicas.
- ANEXO 005.** POE: Ensayo de concentración mínima inhibitoria con cepas fúngicas.
- ANEXO 006.** POE: Elaboración de crema antifúngica 1,5%.

RESUMEN

En la presente investigación se estudió el extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* (Matico) como principal componente de una crema fitocosmética. Para ello se realizaron estudios de preformulación y formulación utilizando un diseño experimental factorial que permitió encontrar los excipientes adecuados que no influyan en la degradación o disminución del potencial terapéutico del extracto. Asimismo se valoró la cantidad de principio activo mediante Espectrofotometría UV-vis. Los resultados obtenidos se sometieron a tratamiento estadístico utilizando el programa Minitab®18, lo que permitió elegir la fórmula más estable, en este caso se eligió una fórmula en la cual se excluye al Alcohol Cetílico como agente reológico debido a que su presencia produce disminución en la concentración del extracto, así como también en algunos casos floculación. Finalmente la fórmula obtenida se compone de: Alcohol Estearílico (agente reológico), Parabenos (conservantes) y Citrato de Sodio (Regulador de pH) brindando una mayor robustez a la fórmula y así garantizar la eficacia y seguridad de la crema antifúngica.

Palabras claves: *Piper ecuadorensis*, Matico, Crema antifúngica, Excipientes.

ABSTRACT

In this research, the extract of *Piper ecuadorensis* (Matico) was studied as the main component of a phytocosmetics cream. For this purpose, preformulation and formulation studies were carried out using a factorial experimental design that allowed to find the appropriate excipients that do not influence the degradation or decrease of the therapeutic potential of the extract. The amount of active ingredient was also valued using UV-vis spectrophotometry. The results were submitted to statistical treatment using the program Minitab® 18, which allowed to choose the most stable formula, in this case we chose a formula in which it excludes Alcohol Cetyl as a rheological agent because its presence produces a decrease in the concentration of the extract, as well as in some cases flocculation. Finally the formula obtained consists of: Alcohol stearyl (Agent rheological), parabens (preservatives) and sodium citrate (PH regulator) providing a greater strength to the formula and thus guarantee the efficacy and safety of the antifungal cream.

Key words: *Piper ecuadorensis*, Matico, antifungal cream, excipients.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el sector industrial realiza procesos innovadores con el objetivo de obtener nuevas tecnologías, bajos costos y mejor calidad en sus productos, y de esta manera llegar a ser más competitivas dentro del mercado. La optimización de un proceso o diseño de un nuevo proceso conlleva de un programa específico de investigación y desarrollo de producto, en este programa se detallan cada uno de los puntos y pasos a seguir, tales como: fórmula, diseño del proceso, pruebas *in vitro*, pruebas piloto, entre otras (García, 2014).

En las últimas décadas del siglo XX en Ecuador, se han incrementado episodios de enfermedades ocasionados por hongos y bacterias (Navarro et al., 2003; Palacios, 2009). Las micosis por hongos han llegado a ser un grave problema de salud pública (Castro & González, 1995), va desde infecciones superficiales a infecciones profundas (Larypoor, Akhavansepahy, Rahimifard, & Rashedi, 2009), además de la aparición de cepas multi resistentes a los agentes quimio terapéuticos, es por ello que es urgente el descubrimiento, desarrollo y aplicación de nuevos productos antimicrobianos para combatir de manera efectiva a éstos agentes infecciosos y sus formas resistentes (Palacios, 2009).

La utilización de plantas medicinales ha resultado ser un medio muy importante del ser humano para la alimentación y los tratamientos de diversas enfermedades (Bucay, 2009; Vidaurre, Querevalu, De los Rios, & Ruiz, 2007). Diversas plantas han demostrado ser un enorme reservorio a partir del cual se han encontrado una gran diversidad de sustancias antimicrobianas y antifúngicas que puedan servir para el desarrollo de nuevos medicamentos (Palacios, 2009).

Siendo una planta nativa del Carchi, Pichincha, Loja y Zamora Chinchipe, *Piper ecuadorensis* Sodiro (Familia *Piperaceae*, Género *Piper*) o también llamada "Matico de monte", es empleada como remedio tradicional de la etnia Saraguro de Loja y Zamora. Investigaciones a esta especie han determinado que químicamente está conformada por amidas, lignanos, neolignanos, flavonoides, fenoles, terpenos y compuestos esteroides; llegando a ser estos los responsables de la actividad biológica antifúngica (Malagón & Ojeda, 2012; Ramirez, Cartuche, Morocho, Aguilar, & Malagon, 2013).

Ésta actividad medida a través de ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria han dado como resultado un valor de 62,5 y 31,25 ug/mL para los extractos metanólico y etanólico (Ramirez et

al., 2013) y 62,5-125 ug/mL y 31,25-62,5 ug/mL para el aceite esencial, ante los hongos: *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (Flores, 2015). Otros estudios de investigación han logrado aislar dos moléculas reconocidas como flavonoides denominadas Pinostrobin y Pinocebrin; de las cuales esta última se conoce como la responsable la actividad antifúngica (Flores et al., 2000; Malagón & Ojeda, 2012; Ramirez et al., 2013; Ulloa & Moller, 2009).

Actualmente la mayor parte de fármacos poseen una toxicidad relevante, asimismo ocasionan recurrencia o en algunos casos provocan resistencia (Rivera, 2010). Diversos agentes antifúngicos encontrados en el mercado de manera general poseen una doble desventaja, entre ellas encontramos la insolubilidad al agua y la toxicidad variable a porciones terapéuticas (Flores et al., 2000). Debido a la resistencia que presentan las diversas cepas, es necesario contar con nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas (Fournet & Perrois, 1995). *Piper ecuadorensis* siendo una planta autóctona del sur del Ecuador, reporta escasos estudios a nivel fitoquímico, biológico y de formulación, los pocos existentes en su mayoría fueron desarrollados tras investigaciones de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). Por esta razón resulta importante desarrollar la estandarización y optimización de los estudios ya realizados y paralelamente continuar con la búsqueda de nuevos componentes útiles con propiedades antifúngicas, bactericidas, entre otras, que inhiban el crecimiento de microorganismos perjudiciales para la salud humana.

El presente estudio consiste en optimizar y evaluar la actividad biológica *in vitro* de un fitocosmético creado a partir del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis*, empleando un diseño experimental factorial que garantice la compatibilidad de sus componentes y estabilidad, además de proporcionar un protocolo de manufactura y control de calidad del producto terminado, que certifique la reproductibilidad, consistencia y uniformidad de los distintos procesos realizados. Esta investigación contribuye al estudio y fortalecimiento de los conocimientos ancestrales de plantas medicinales y la generación de nuevas fórmulas farmacéuticas a partir de estos conocimientos etnobotánicos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
USP	United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estados Unidos)
UTPL	Universidad Técnica Particular de Loja
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
API	Active Pharmaceutical Ingredients
DMSO	Dimetilsulfóxido
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
g	Gramo
mg	Miligramo
μg	Microgramo
ppm	Partes por millón
h	Hora
min	Minutos
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
m	metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius
ClNa	Cloruro de sodio
UFC	Unidad formadora de colonia
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial hidrógeno
%	Porcentaje

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1. Medicina Natural y Tradicional

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado que más del 80% de la población a nivel mundial emplea la medicina tradicional, donde muchos de los tratamientos implican la utilización de extractos o principios activos (API) para compensar a las necesidades de atención primaria de salud (Bucay, 2009).

En el año 2000, La OMS define a la medicina tradicional como *“el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de enfermedades físicas o mentales”* (Zhang, 2000).

La medicina natural y tradicional juega un rol importante en la vida de una comunidad (Bucay, 2009), sus aplicaciones son basadas en conocimientos ancestrales que en la actualidad son validados para una aplicación más efectiva y segura, constituyendo otra opción de curación para el sistema de salud pública de cada país (Cabrera, 2014).

1.2. Plantas Medicinales empleadas en Ecuador

La variedad de plantas y estudios medicinales conocidos en Ecuador es muy elevada y a la vez dispone de una gran riqueza cultural y terapéutica (Balslev, Navarrete, De la Torre, & Macía, 2008). Un 75% de especies medicinales son nativas, 5% endémicas, 11% introducidas (De la Torre, Alarcón, Kvist, & Salazar, 2008). Las plantas medicinales se utilizan en muchos casos como materias primas para la elaboración de nuevos medicamentos o medicamentos semisintéticos, debido a que la conformación química que éstas presentan nos ayudan para la elaboración de nuevas drogas sintéticas (Oliveira, Velázquez, & Bermúdez, 2005).

Un 26% de todas las plantas medicinales ayudan al tratamiento de infecciones y enfermedades causadas por bacterias, hongos, virus, nematodos, protozoos, artrópodos, entre otros; en las zonas bajas de Ecuador el empleo de las plantas para tratamiento de afecciones fúngicas es muy común (Balslev et al., 2008). En las provincias de Loja y Zamora Chinchipe se han encontrado 275 especies de plantas medicinales aproximadamente, las cuales se emplean para 68 diferentes afecciones (Tene et al., 2007). La exuberancia de especímenes registrados corresponde a la

diferencia cultural y étnica, dentro de las plantas medicinales mayormente empleadas se mencionan a las *Asteraceas*, *Laminaceas*, *Apiaceas*, *Fabaceas*, *Rosaceas*, *Piperaceas*, entre otras (Leon et al., 2011), de éstas un 4% ayudan como cicatrizante de heridas y curación de infecciones, y, aproximadamente un 2.23% se emplean para afecciones de la piel (dermatitis) (Rivera, 2010).

1.3. *Piper ecuadorensis* Sodiro

1.3.1. Taxonomía y distribución de la especie vegetal.

La *Piper ecuadorensis* la podemos encontrar principalmente distribuida en los Departamentos de Huila y Caldas en Colombia a menos de 570 y 2728 m.s.n.m, respectivamente (Little, 2007).

En Ecuador crece en los bosques de las diferentes pendientes occidentales de Pichincha (2000 – 24000 m.s.n.m) y, en la cordillera oriental inmersa en la Reserva Ecológica Cayambe-Coca (menos de 2660 m.s.n.m)(Sodiro, 1898). Otras provincias del Ecuador (**Figura 1**) en donde también ha sido catalogada y estudiada por su abundancia corresponden al Carchi, Loja y Zamora Chinchipe (Malagón & Ojeda, 2012).

Tabla 1. Taxonomía de la especie vegetal de estudio

Reino	<i>Plantae/Vegetal</i>
Subreino	<i>Embryobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Hamamelidae</i>
Super orden	<i>Magnolianaes</i>
Orden	<i>Piperales</i>
Familia	<i>Piperaceae</i>
Género	<i>Piper</i>
Especie	<i>Ecuadorensis</i>
Epíteto específico	<i>Piper ecuadorensis</i>
Autor epíteto específico	Sodiro, L 1898

Fuente: Little, 2007; Aguirre, Merino & Gutierrez, 2013; Sodiro, 1898

Elaboración: El autor

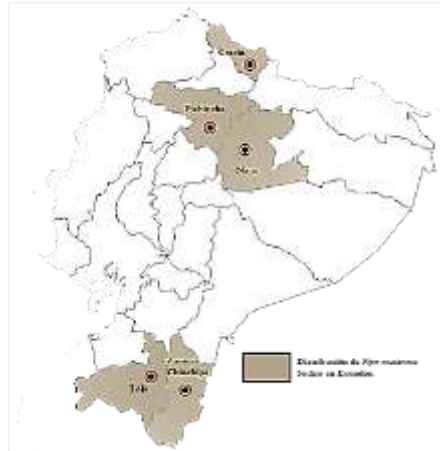


Figura 1. Distribución de *Piper ecuadorensis* en Ecuador.

Fuente: Sodiro, 1896; Malagón & Ojeda, 2012

Elaboración: El Autor

1.3.1.1. **Características botánicas de *Piper ecuadorensis*.**



Figura 2. Espécimen de *Piper ecuadorensis* Sodiro en estado silvestre a 2410 m.s.n.m, Parroquia de San Lucas, Loja - Ecuador.

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Piper ecuadorensis Sodiro o también conocido como “Matico de Monte”, se presenta como un arbusto de 2 o 3 metros de alto (**Figura 2**); tallos y ramas achaparrados, crasos, muy verrugosos; peciolo casi cilíndricos, robustos con una base abrazadora abultada; limbo casi orbiculares de más o menos 40 cm de largo y ancho, algo inequiláteros, profundamente acorazonados en la base, brusca y brevemente acuminados en el ápice, membranáceos, muy rugosos, finamente

pelúcido-punteados, lampiños, salvo en los nervios e intensamente verdes en la haz superior, pálidos, densos y brevemente pubescentes en el envés (Rivera, 2010; Sodiro, 1898).

1.3.1.2. Composición química de *Piper ecuadorensis* y aplicaciones terapéuticas.

Los estudios realizados por Flores *et al.* 2000 y Ramírez *et al.* 2013 demuestran que la composición química de *Piper ecuadorensis* consiste en amidas, lignanos, neolignanos, flavonoides, fenoles, terpenos y compuestos esteroides, asimismo se realizó el aislamiento de dos moléculas: el Pinostrobin y Pinocebrin, llegando a ser éste último el responsable de la actividad biológica antifúngica.

En las comunidades indígenas de las provincias de Loja y Zamora, las hojas de la planta conocida como “matico de monte” se emplean en infusión o tintura para el tratamiento de la resaca, también como desinfectante o cicatrizante de heridas y, antiinflamatorio (Cerón, 2008; Ramirez *et al.*, 2013). Además, en investigaciones desarrolladas previamente se ha comprobado su potencial antibacteriano y antifúngico frente a ciertas bacterias y hongos dermatofitos, respectivamente (Flores, 2015; Malagón & Ojeda, 2012; Rivera, 2010; Tene *et al.*, 2007).

1.4. Actividad biológica antifúngica

Es la capacidad de un fármaco o compuesto natural que tiene para eliminar o frenar el crecimiento de hongos. Los principios antifúngicos o antimicóticos engloban a toda sustancia que llega a desarrollar una alteración en las estructuras de la célula fúngica, consiguiendo así la inhibición de su desarrollo y viabilidad, y, permitiendo facilitar la función de los sistemas de defensa del huésped (Cruz, 2009).

El estudio de susceptibilidad *in vitro* de estos microorganismos ante extractos vegetales, permiten conocer el potencial antifúngico que presentan dichos extractos. La evaluación de la actividad antifúngica es necesaria, sin embargo hay que tomar en cuenta ciertos factores al momento del análisis frente al hongo, tales como: presencia de dimorfismos, crecimiento prolongado, temperatura, medio de cultivo apropiado, concentración del inóculo, entre otros (Rivera, 2010).

Uno de los ensayos mayormente utilizados para evaluar la actividad antifúngica de un compuesto es la microdilución en caldo, este tipo de método nos permite establecer la Concentración Mínima

Inhibitoria (CMI), la misma que nos indica la concentración mínima del compuesto o extracto capaz de evitar el desarrollo del microorganismo utilizado en el ensayo; los resultados se reportan por la inhibición o no de los microorganismos en las diferentes concentraciones del tratamiento, siempre comparando con el control de crecimiento, en otras palabras los resultados son cuantitativos (Picazo, 2000; Rivera, 2010).

1.4.1. Hongos.

El reino *fungi* en términos de biodiversidad es uno de los más grandes, además de ser de importancia a nivel ecológico y económico (Pasaca, 2016); se presentan como organismos eucariotas, con al menos un núcleo, membrana nuclear, retículo endoplásmico y mitocondrias; crecen como filamentos ramificados y entrelazados o denominados “*hifas*”; su reproducción es asexualmente o por esporas de forma sexual; viven en diversos ambientes e inclusive llegan a ser parásitos en algunos seres vivos (Flores, 2015). Las micosis de tipo superficial son un grupo diverso de afecciones muy comunes, causadas por hongos como: dermatofitos (*Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*), levaduriformes (*Candida*), *Pitirosporum ovale* y *orbiculare*, *Cladosporium werneckii*, *Piedraia hortae*, *Tricosporum beigelii*; siendo los más comunes en el medio los dermatofitos o tiñas (Larrondo, González, & Hernández, 2001).

1.4.2. Dermatofitos.

Son un grupo de microorganismos compuestos por tres géneros de hongos: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Se reproducen de forma sexual y están inmersos dentro del tipo *Ascomycota*, familia *Arthrodermataceae*. Éste tipo de hongos crecen en un ambiente de características cálido/húmedo, es por ello que son muy comunes en climas tropicales y subtropicales (CFSPH, 2005). Los dermatofitos presentan una capacidad para digerir y emplear la queratina como sustrato (Rivera, 2010). Estos hongos en la actualidad tienen dos nombres, uno para su etapa de huésped y la otra para su estado perfecto (crecimiento en el ambiente), en este último los *Trichophyton* pertenecen al género *Arthroderma* (CFSPH, 2005). Los dermatofitos se clasifican en: *Dermatofitos zoofílicos*, se hallan en animales, pero pueden estar en humanos; *Dermatofitos antropofílicos*, exclusivos de los humanos y muy raramente en animales, y, *Dermatofitos geofílicos*, se encuentran en el suelo, se asocia con pelos, pezuñas, plumas o diversas fuentes de queratina; se encuentran tanto en hombres como animales.

Trichophyton methagrophytes (Figura 3) afectan principalmente a seres humanos y animales, en la mayoría de los casos se aíslan de lesiones de la piel, barba y cuero cabelludo de personas que viven y trabajan en el sector rural (Rivas, 2015). Otro grupo de hongos como ***Trichophyton rubrum*** representa uno de los principales causantes de micosis, atribuyéndose a éste el 80% de los casos, asociándolo directamente con dermatofitosis del cuerpo, barba, ingle, manos y pies (Figura 4) (Flores, 2015; Rivera, 2010)

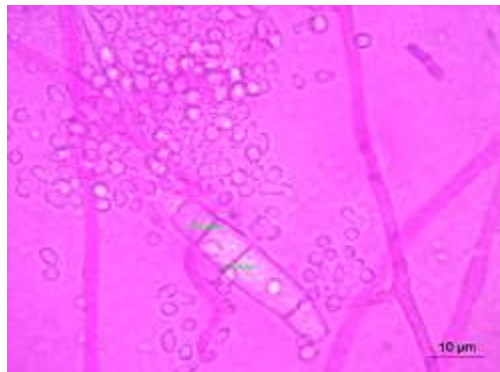


Figura 3. Micronidios, macronidios y micelio de *T. methagrophytes* ATCC® 9533, tinción Floxin. 100x aumento.

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor



Figura 4. Micronidios y macroneuridios de *T. rubrum* ATCC® 28188, tinción azul de algodón lactoferol. 360x aumento.

Fuente: Rodríguez, 2016

Elaboración: Rodríguez, 2016

1.5. Extractos de plantas para fines farmacológicos

Con la separación de fracciones biológicas activas que se encuentran en los tejidos de las plantas, la ayuda de un solvente y un determinado proceso de extracción, se pueden obtener extractos líquidos, sólidos y/o polvos secos. En la elección del solvente hay que tener presente muchos aspectos, sin embargo uno de los más importantes a considerar es el grado de toxicidad que presente, a pesar de ello, la mayor parte de productos fitoterapéuticos son desarrollados a través de mezclas hidroalcohólicas. Los procesos de extracción sólido – líquido se pueden desarrollar por maceración, percolación o lixiviación (Muzo, 2016).

1.5.1. Métodos de obtención y caracterización de extractos.

1.5.1.1. Molienda y maceración.

En el proceso de molienda se desarrolla la disminución del tamaño de partícula de la planta, si los fragmentos de la planta son gruesos la penetración del solvente en los tejidos vegetales es incompleta; lo óptimo es dividir el material vegetal a tal punto que sus membranas se encuentren parcialmente destruidas, de esta manera se facilita la disolución de los componentes celulares en el líquido. La planta molida se clasifica tomando en cuenta el tamaño de partícula, el mismo que tiene que ser el adecuado para el proceso de extracción (Sharapin, 2000).

La maceración consiste en dejar la planta triturada en un solvente durante varios días, con agitación en intervalos de tiempo predeterminados; es un proceso en donde se obtiene un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente (Muzo, 2016; Sharapin, 2000).

1.5.1.2. Tamizaje fitoquímico.

Denominado también “*screening fitoquímico*” se basa en pruebas fáciles y rápidas que permiten establecer cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta mediante formación de precipitados, reacciones de coloración, entre otras (Estrada, 2010; Sharapin, 2000).

Los esquemas mayormente empleados son los que consisten en extracciones sucesivas con solventes de polaridad ascendente, con la finalidad de aprovechar la mayoría de los metabolitos existentes en la droga vegetal (Calvopiña, 2010).

1.6. Fitocosmético

El término “fitocosmético” se desglosa de las palabras griegas «*Kosmein*» que significa “decorar” y «*Phytos*» que significa “planta” (Ortis, 2015), es decir, los fitocosméticos emplean los API de procedencia vegetal en productos cosméticos, estos productos se emplean en muchos casos para dar solución a alteraciones que se producen en la piel (Rodas, López, & Tul, 2010).

Los principios activos no siempre se hallan en toda la planta, en muchos casos solo encontraremos en partes específicas como hojas, flores, tallos, frutos, bulbos (Ortis, 2015; Villalba, 2013); durante el proceso de elaboración se selecciona la parte donde se encuentra el principio activo y posteriormente atraviesa por procesos técnicos de extracción y purificación que da como resultado un producto final libre de impurezas (Rodas et al., 2010; Villalba, 2013).

Cerca de 250.000 especies de plantas presentan gran diversidad de compuestos con actividad biológica, sin embargo una porción pequeña de éstas especies han sido estudiadas a profundidad para posibles aplicaciones médicas (Bucay, 2009). Actualmente la industria farmacéutica y cosmética abre sus puertas e intenta crear nuevos y novedosos productos a base de extractos estandarizados de diferentes especies de plantas (Muzo, 2016).

Según Martínez *et al.* 2008, para lograr que un extracto sea categorizado y considerado para un posterior desarrollo de un fitocosmético, éste debe cumplir con diferentes parámetros de uniformidad en donde se incluyen los siguientes puntos:

- a. **Certificación de la especie vegetal a usar**, consiste en catalogar a la planta por género y especie. La certificación debe de estar validada por un especialista en botánica.
- b. **Partes de la planta utilizada**, es importante definir la parte de la planta que será empleada, ya que entre la raíz, tallo, corteza, hojas, flores o frutos siempre existen diferencias en su composición química y por ende en su acción farmacológica.
- c. **Factores ambientales**, condicionan el estado de la planta, las plantas varían en su composición de acuerdo al clima, altura, riqueza del suelo o uso de pesticidas, edad de la planta, entre otras.
- d. **Condición en la que se desarrolla la cosecha**, la composición química se ve afectada por el ciclo de crecimiento de la planta, es por ello que se debe establecer un momento adecuado

de cosecha, además, considerar el procesamiento y las condiciones en las que se almacenará el material vegetal que será empleado para la obtención del extracto.

- e. **Calidad del material vegetal**, el material vegetal seleccionado debe estar en condiciones óptimas, es decir, no contener insectos, hongos, excrementos de animales, bacterias, pesticidas, metales tóxicos, etc.
- f. **Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)**, las BPM aseguran todas las operaciones de control del producto terminado, entre ellas tenemos: calidad, estabilidad y tiempo de duración.
- g. **Estandarización de extractos**, el conocimiento de los principales componentes que se encuentran en la planta es de vital importancia, asimismo el extracto debe atravesar por un proceso de cuantía de los mismo, de esta manera se garantiza la calidad y seguridad del extracto.
- h. **Especificaciones del producto final**, indica cualitativa y cuantitativa el resultado final de los diferentes análisis de calidad por el cual debe ser aceptado el extracto.
- i. **Ensayos de estabilidad**, a través de métodos analíticos adecuados permite analizar la interacción de los componentes que integran una preparación para determinar si el producto se mantiene estable.

1.7. Forma farmacéutica

Es la disposición específica en las que se adecua el principio activo y los excipientes para conformar un medicamento, la gran variedad de formas farmacéuticas tienen como finalidad proteger al fármaco y permitir su fácil dosificación y administración (Muzo, 2016).

En términos relacionados a plantas medicinales, el principio o principios activos son aquellos componentes extraídos de una planta que tienen una determinada acción farmacológica; pueden ser de dos tipos, aquellos conformados por metabolitos primarios y los otros conformados por metabolitos secundarios (Muzo, 2016). Los excipientes también denominadas “*sustancias aditivas*”, no poseen un efecto farmacológico, pero cumplen con la misión de servir como soporte al principio activo, de esta manera se obtienen formulaciones estables, eficientes y seguras. En el caso de la aplicación sobre la piel, los excipientes determinan un factor importante a la hora de la penetración del API hacia los lugares más o menos profundos de la zona donde se aplican, de esta manera también contribuyen a la eficacia del preparado (Cruz, 2009; Montaña, 2011; Yambay, 2013). Según la aplicabilidad y vía de administración se puede elegir entre formas

farmacéuticas sólidas (tabletas, granulados, etc.), líquidas (soluciones, jarabes, suspensiones, etc.) y semisólidas (cremas, pomadas, ungüentos, etc.).

1.7.1. Formas farmacéuticas semisólidas.

Las cremas son consideradas pomadas en forma de emulsiones conformadas por dos fases, una hidrofílica y una lipofílica, en muchos casos de tipo aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O), su aspecto es líquido viscoso a veces semisólido, de consistencia blanda, un poco más fluida que las pomadas (Lozano, Córdoba, & Córdoba, 2012; Yambay, 2013).

Las cremas son desarrolladas para aplicación tópica o sobre mucosas, cuyo fin es ejecutar una acción local o permitir la penetración cutánea del medicamento; se componen de fase acuosa, oleosa, sistema emulgente, humectante y medios espesantes (Yambay, 2013, García, 2014).

1.7.1.1. Cremas hidrófilas (O/W).

La fase externa es fundamentalmente acuosa debido al emulgente, desaparece fácilmente en la piel, es lavable, sirve como vehículo para todas las sustancias hidrosolubles y cosméticamente es aceptable. En piel normal o ligeramente reseca es recomendable la aplicación de una emulsión aceite en agua (O/W), esto debido a que la fase oleosa de la preparación se ubica inmerso a la fase acuosa, la absorción que ejerce la piel es rápida, la fase acuosa produce un efecto refrescante mientras que la constitución oleosa no deja rastro a pesar de dejar engrasada la piel (Rivera, 2010; Yambay, 2013)

1.7.1.2. Cremas hidrófobas (W/O).

Debido a la presencia de tensoactivos de tipo W/O, la fase externa es de tipo lipofílica. Estas cremas o emulsiones de tipo agua en aceite, habitualmente se emplean para pieles secas o que presenten dermatosis crónica, la fase interna está conformada por la parte acuosa mientras que la fase externa está compuesta de una parte oleosa. Presenta problemas de absorción en la piel, siendo ésta más lenta que en las cremas hidrofílicas, sin embargo su ventaja está encaminada en la liberación de los API's, debido a que este tipo de crema no puede ser lavada con facilidad lo que permite una difusión de todo el API a través de la piel (Rivera, 2010; Yambay, 2013).

1.8. Desarrollo de formas farmacéuticas

1.8.1. Estudios de preformulación.

Los estudios de preformulación son aquellas investigaciones de las propiedades fisicoquímicas de un API o la combinación de éste con excipientes (Lieberman, Lachman, & Schwartz, 1989), estos estudios proporcionan información necesaria para definir la naturaleza de la sustancia farmacológica, y la fabricación de una forma farmacéutica (**Figura 5**) (Allen, 2010).

La mayor parte de los API's se integran a una forma farmacéutica, de esta manera se asigna una particularidad en la administración y dosificación, sin embargo, el elaborar una nueva fórmula conlleva grandes retos como la elección de excipientes y desarrollo del proceso tecnológico (Trillo, 1993).

El mejoramiento de las características organolépticas, la protección del fármaco ante los procesos de degradación, la facilidad de ingreso del fármaco, la dosificación y control de los procesos de liberación del API, son las razones más importantes que conllevan a justificar la aplicación de los procesos de formulación (Trillo, 1993)

Dentro de la preformulación se incluyen las características organolépticas, estabilidad química, velocidad de disolución, solubilidad, constante de ionización, cristalinidad, coeficiente de partición, solvatos, polimorfismos y tamaño de partícula, además de la compatibilidad de la molécula o API empleado con los excipientes que se incluyen en el diseño de una forma farmacéutica (Salazar, 2001).

1.8.2. Estudio de compatibilidad API/Excipiente.

Permite reconocer los excipientes más idóneos para la formulación de una fórmula farmacéutica desde la perspectiva de la compatibilidad físico – química de sus componentes, además de afrontar los estudios de estabilidad posterior y de esta manera brindar la máxima garantía posible del preparado (Salazar, 2001).

Se fundamenta en la mezcla del API y los excipientes más comunes para la forma farmacéutica a desarrollar y posteriormente el análisis de la degradación del API bajo condiciones aceleradas; la compatibilidad en muchos casos se basa en el tanteo; los resultados pueden presentar

incompatibilidades a condiciones aceleradas sin embargo no presentarse a condiciones ambientales (Salazar, 2001).

Cuando la formulación del principio activo depende de su solubilidad en una forma líquida, es necesario realizar una selección minuciosa del disolvente (**Tabla 2**), es lógico que se emplee en primera instancia el agua, sin embargo muchos principios activos son raramente hidrosolubles o inestables en una disolución de carácter acuoso, para estos casos se puede emplear disolventes de tipo no acuoso, pero que contengan características hidromiscibles como cosolventes, de esta manera logramos mejorar la solubilidad y estabilidad del principio activo (Trillo, 1993)

Tabla 2. Disolventes sugeridos en los estudios de preformulación.

DISOLVENTE	CONSTANTE DIELECTRICA	PARÁMETRO DE SOLUBILIDAD
Agua	80	24.4
Etanol	24	12.7
Propilenglicol	32	12.6
Glicerol	43	16.5
PEG 300 ó 400	35	-

Fuente: Trillo, 1993

Elaboración: El autor

Las mezclas de principio activo y excipientes se deben desarrollar durante la fase de preformulación con la finalidad de seleccionar los excipientes más idóneos para el producto deseado, éste proceso se puede obtener a través de diversos diseños experimentales, que proporcionan la mayor información posible con menor desarrollo de experimentos. Entre los más importantes encontramos las mezclas binarias, diseños factoriales centrados y los de Plackett y Burmann (Salazar, 2001).

El diseño factorial nos permite conocer los factores más importantes de un proceso e investigar la interacción existente entre ellos. Este es uno de los más empleados debido a su practicidad en el ahorro de dinero, tiempo y flexibilidad, ya que cada corrida ofrece información para todos los factores del ensayo y además, se los puede ajustar (en el caso de ser necesario) (Ruiz, 2014).

La empleabilidad del diseño factorial nos lleva a la obtención de gran información para el estudio de la estabilidad de un número determinado de mezclas. La elección de los factores a trabajar, establece el número de ensayos a desarrollar, un diseño factorial 2^3 emplea 3 factores en dos niveles diferentes marcados por + y -, es decir los excipientes llegan a ser los factores (Salazar, 2001).

1.9. Control de Calidad

El control de calidad involucra a las materias primas, materiales de acondicionamiento, procesos desarrollados y producto terminado; en otras palabras el control de calidad es el conjunto de actividades debidamente organizadas cuyo objetivo principal es precautelar que los medicamentos posean la calidad necesaria para su uso (Yambay, 2013). Para determinar la aceptabilidad de los productos terminados se desarrollan pruebas físicas, químicas y microbiológicas, así como estudios de estabilidad para determinar el tiempo de vida útil de los mismos.

1.9.1. Evaluación organoléptica.

Son las características físicas que tiene el producto elaborado, estas características se guían a través de los sentidos, es decir el producto debe presentar un color, olor, textura y aspecto agradable, aceptable, homogéneo y suave para su aplicación (Rivera, 2010). Un producto de administración tópica debe poseer una gran capacidad dispersante en la piel y no dejar residuos (USP33, 2010)

1.9.2. Evaluación físico – química.

La evaluación de las características fisicoquímicas permite determinar las alteraciones que se producen en la formulación y que en muchos casos no son perceptibles, en primera instancia, normalmente estos ensayos indican inconvenientes de estabilidad entre excipientes o excipientes - principio activo. Los ensayos mayormente empleados son: pH, densidad, viscosidad, punto de fusión, entre otras (ARCSA, 2017).

1.9.3. Evaluación microbiológica.

Las materias primas y el producto terminado, necesariamente tienen que atravesar por un arduo análisis microbiológico, que consiste en el recuento microbiano de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, asimismo la ausencia de ciertos indicadores como: *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, siendo estos últimos de mayor relevancia para productos de destino tópico (Muzo, 2016; Rivera, 2010).

1.9.4. Estabilidad.

Se considera como el tiempo durante el cual el producto se conserva dentro los rangos específicos, es decir que a pesar del tiempo de almacenamiento, el producto mantiene sus propiedades físicas, químicas, biológicas y microbiológicas estables (Yambay, 2013); las pruebas de estabilidad califican el estado de las propiedades de una formulación frente a ciertos factores como la temperatura (temperatura ambiente, 30 °C y 45 °C), luz y humedad. Otros parámetros que ayudan a estimar la estabilidad del preparado son: pH, extensibilidad, densidad, observación macro y microscópica (Rivera, 2010; Yambay, 2013).

Todas las formulaciones deben presentar aproximadamente un período de validez de 5 años, y durante ese tiempo su potencial farmacológico no debe descender del 90 a 95%, rigiéndose a las condiciones de almacenamiento recomendadas (Trillo, 1993).

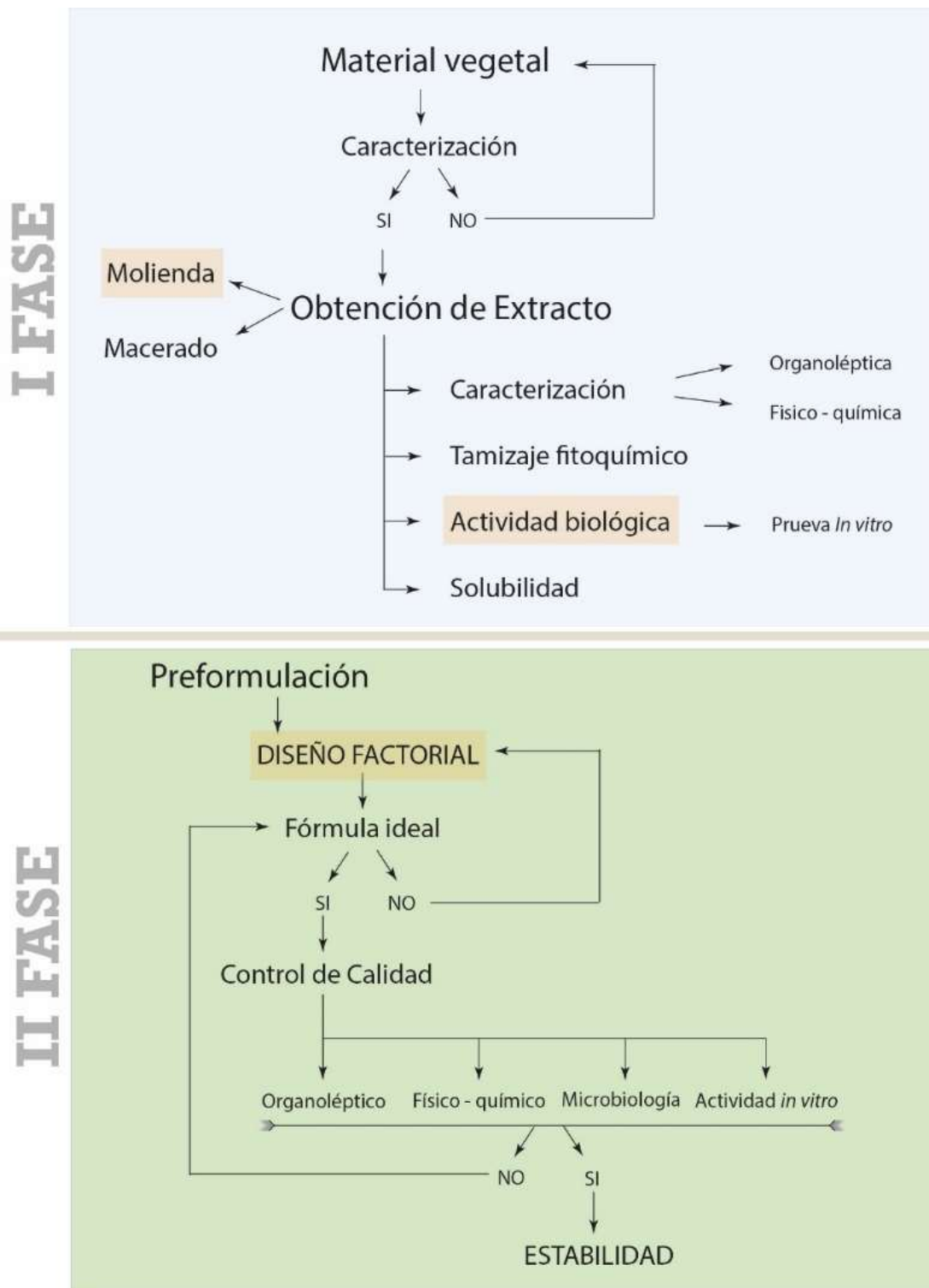


Figura 5. Proceso simplificado de desarrollo de formulación, puntos claves.

Fuente: El Autor

Elaboración: El autor

1.10. Sistema de garantía de la calidad

Desde sus inicios, la industria farmacéutica y cosmética ha tenido como enfoque principal el desarrollar productos con calidad y total garantía de seguridad. La garantía de calidad incluye todas las medidas que deben incorporarse con el fin de asegurar la obtención de productos con la calidad adecuada. Estos sistemas de garantía de la calidad aseguran que los productos que se desarrollan, estén diseñados de una forma en la que se contemplan todas las Normas Correctas de Fabricación y las Buenas Prácticas de Laboratorio y/o Manufactura, de igual manera, garantizan que las operaciones de elaboración y control estén detalladamente especificadas por escrito, a través de Protocolos Operativos Estándar (POES) (Trillo, 1993; García, Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia, 2001).

1.10.1. Optimización de los procesos de fabricación.

En la actualidad la industria farmacéutica busca optimizar cada vez más los procesos de elaboración, es decir, ya no se conforma con solamente validar los procesos, sino que además se enfoca en mejorar los procesos de fabricación de productos con mayor eficacia y rentabilidad (**Figura 6**), sin alterar su constitución inicial como la dosis, biodisponibilidad, entre otras. De esta manera podemos determinar que la optimización sugiere la obtención de una máxima eficiencia de los procesos, siempre manteniendo firmes los estándares de calidad (Trillo, 1993).

Las vías de optimización nos permiten localizar los puntos críticos de la fórmula durante su fase de desarrollo, mejorar la calidad del producto, marcar tolerancias y generar procedimientos de elaboración que conlleven un ahorro a nivel económico. La fase de desarrollo marca un punto importante previo al proceso de los lotes y validación de los mismos, es por ello, que se hace hincapié en la conformación de un diseño experimental adecuado y el tratamiento científico empleando variables del proceso y control (García, 2001).

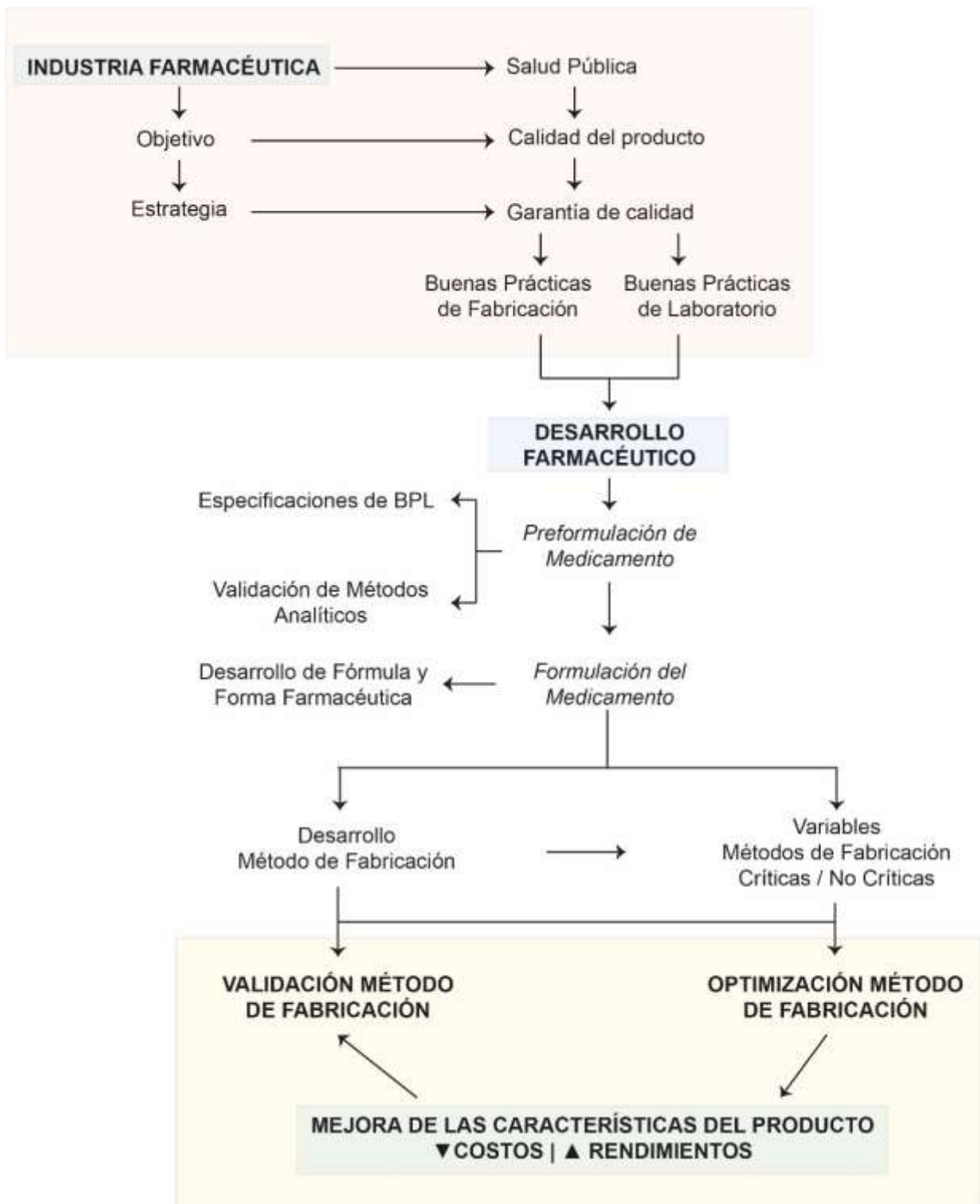


Figura 6. Procesos de control e integración de validación y optimización de productos dentro de la industria farmacéutica.

Fuente: Trillo, 1993; García, 2001

Elaboración: El Autor

CAPÍTULO 2
METODOLOGÍA

2.1. Área de recolección de material vegetal

Las plantas de *Piper* ecuatorense fueron recolectadas cuando se llegaba al punto más alto de la floración, lo cual correspondió al mes de Octubre en la Parroquia San Lucas, Loja, Ecuador, ubicada a una altura de 2410 m.s.n.m. (Latitud 3°44'48.665" S., Longitud 79°15'58.526" O) (Figura 7). Posteriormente para su tratamiento fueron trasladadas al Laboratorio Instrumental de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

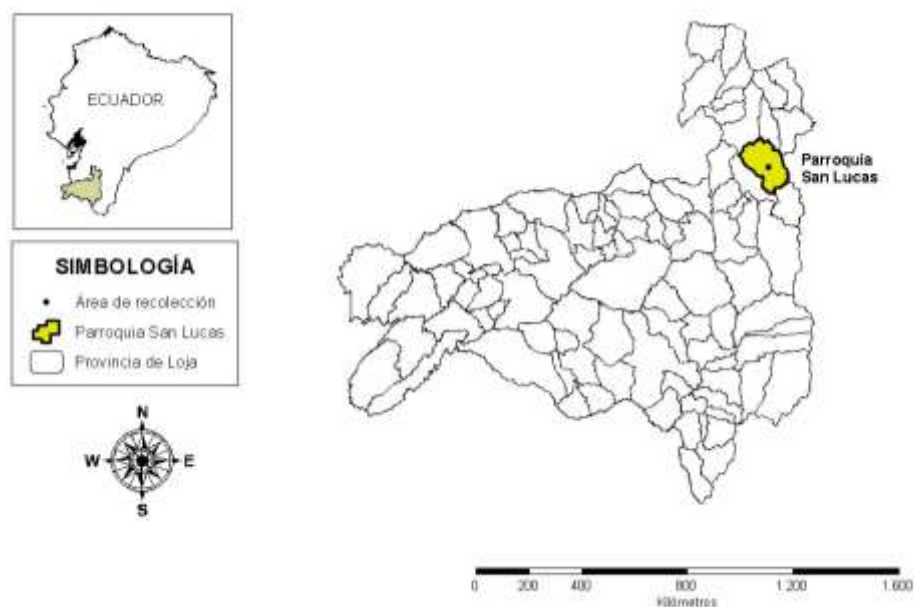


Figura 7. Ubicación del área de recolección de *Piper ecuatorense* Sodirol, Parroquia San Lucas, Loja, Ecuador.

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

2.2. Comprobación taxonómica e identificación botánica

Se tomaron cinco plantas óptimas de la especie en estudio y se las transportó al Herbario de la Universidad Nacional de Loja dirigido por el Ing. Bolívar Merino, quién certificó los ejemplares vegetales de *Piper ecuatorense*, basándose en su forma, textura, superficie, dimensiones, entre otras más características.

2.3. Procesamiento Pos-cosecha

El material vegetal utilizado para el proyecto fueron las hojas de *Piper ecuadoreense*, para ello el material recolectado fue adecuadamente tratado, eliminándose cuerpos extraños y hojas en mal estado. El material seleccionado se lavó con agua y se desinfectó utilizando hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos, finalmente se realizó un enjuague con agua destilada y se dejó escurrir por 60 minutos (Aragadvay, 2009; Bucay, 2009). Las hojas escurridas fueron sometidas a una temperatura de 40 ± 3 °C, durante 8 días en el cuarto de secado hasta conseguir un promedio de humedad $\leq 14\%$ (Figura 8) (Rivera, 2010). Posteriormente, el material vegetal seco fue almacenado en bolsas de tela en un lugar fresco y seco del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la UTPL hasta su utilización.

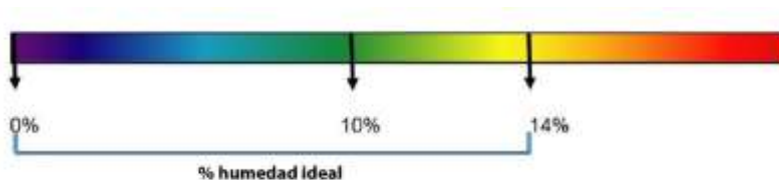


Figura 8. Rango ideal de porcentaje de humedad en planta seca.

Fuente: García & Carrión, 2010

Elaboración: El Autor

2.4. Triturado y Tamizado de material vegetal seco

El material vegetal seco se trituró en un molino manual y se tamizó utilizando tamices de diferente luz de malla (2mm, 1mm, 850 μ m, 500 μ m y 250 μ m) para seleccionar el tamiz que proporcione un polvo de tamaño moderadamente grueso que favorezca a la obtención de un mayor rendimiento de extracto (Sharapin, 2000).

2.5. Control de calidad de material vegetal

Los análisis físico – químicos y microbiológicos de una droga vegetal constituyen uno de los parámetros primordiales de calidad y estabilidad, es por ello que según (Aragadvay, 2009; Miranda, 2002; Proaño, 2013; Rivera, 2010), las siguientes determinaciones son importantes ya que brindan la seguridad al producto final a desarrollar, entre las más importantes se desarrollaron:

2.5.1. Análisis físico – químicos por método gravimétrico.

2.5.1.1. Determinación de humedad.

El análisis de humedad se realizó en estado fresco como seco de la droga vegetal; se pesó 2g de planta fresca o seca y se trasladó a una estufa a 100°C por una hora, posteriormente se dejó enfriar la muestra, se pesó y repitió el procedimiento hasta obtener valores constantes. Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos, aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Fórmula de porcentaje de humedad

$$\%humedad = (m_1 - m_2) \frac{100}{m_1 - m_0}$$

m_0 = masa crisol vacío (g)
 m_1 = masa crisol + muestra antes del secado (g)
 m_2 = masa crisol + muestra después de secado (g)

Fuente: Proaño, 2013

Elaboración: Proaño, 2013

2.5.1.2. Determinación de cenizas totales.

Se pesó 2g de planta tamizada y se carbonizó, posteriormente se incineró en un horno mufla a 750 °C por 2 horas, se dejó enfriar la muestra y se pesó; a partir de aquí, se incineró las muestras por 30 min y se enfrió y pesó, repetimos este proceso hasta masa constante. A las trazas de carbón existentes se añadió unas gotas de ácido nítrico 10mg/100mL y se calentó hasta evaporación del solvente, al enfriarse se observó un residuo color blanquecino (Proaño, 2013). Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos, aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Fórmula de porcentaje de cenizas totales

$$\%Cenizas = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

m_0 = masa crisol vacío (g)
 m_1 = masa crisol + muestra antes del secado (g)
 m_2 = masa crisol + muestra después de secado (g)

Fuente: Proaño, 2013

Elaboración: Proaño, 2013

2.5.1.3. *Determinación de cenizas solubles en agua.*

De las cenizas totales obtenidas anteriormente se añadió 15 mL de agua destilada e hirvió por 5 minutos, se filtró la solución, el residuo del papel filtro se lo colocó en el crisol inicial y se carbonizó, posteriormente se incineró a 750 °C por 2 horas, se dejó enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesó (Proaño, 2013). Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos, aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 3. Fórmula de porcentaje de cenizas solubles en agua

$$\% \text{Cenizas} = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m} \times 100$$

m_0 = masa crisol vacío (g)

m_1 = masa crisol + muestra (g)

m_2 = masa crisol + cenizas (g)

m_3 = masa crisol + cenizas solubles (g)

Fuente: Proaño, 2013

Elaboración: Proaño, 2013

2.5.1.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.*

De las cenizas totales obtenidas, se añadió 15 mL de ácido clorhídrico al 10% e hirvió por 5 min, se filtró la solución, se lavó el residuo con agua caliente, se añadió 2 gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L, y se repitió este el procedimiento hasta eliminación de cloruros; el papel filtro que contenía el residuo se lo colocó al crisol inicial, se carbonizó e incineró en un horno mufla a 750 °C por 2 horas, se enfrió y pesó (Aragadvay, 2009). Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos, aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Fórmula de porcentaje de cenizas insolubles en HCl

$$\% \text{Cenizas} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

m_0 = masa crisol vacío (g)

m_1 = masa crisol + muestra (g)

m_2 = masa crisol + cenizas en HCl (g)

Fuente: Aragadvay, 2009

Elaboración: Aragadvay, 2009

2.5.1.5. Determinación de sustancias solubles.

Se pesó 5g de planta tamizada y mezcló con 100 mL de agua destilada, se agitó durante 6 horas y reposó 24 horas, posteriormente se agitó durante 30 minutos y reposó por 30 minutos más, se filtró. Se tomó una alícuota de 20 mL, se evaporó el líquido empleando un baño María y se trasladó a una estufa a 105 °C por 3 horas, se enfrió y pesó (Aragadvay, 2009). Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos, aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 5. Fórmula de porcentaje de sustancias solubles

$$\%Sustancias\ solubles = \frac{R \times 500 \times 100}{M(100 - h)} \times 100$$

h = % humedad
R = Residuo de la muestra
M = Peso de la muestra
100 y 500 = Factores matemáticos

Fuente: Aragadvay, 2009

Elaboración: Aragadvay, 2009

2.5.2. Análisis microbiológico.

2.5.2.1. Determinación de aerobios mesófilos.

Se pesó 25g de planta tamizada y mezcló con 250 mL de agua peptonada (dilución 10⁻¹), reposó por 60 min, de ésta dilución se tomó 1 mL y mezcló con 9 mL de agua peptonada (dilución 10⁻²), asimismo se desarrollaron dos diluciones más 10⁻³ y 10⁻⁴. Paralelamente se prepararon tubos con 15 mL de Agar Plate Count; a cada tubo se le colocó 1 mL de cada dilución anteriormente preparada y se vertió sobre cajas Petri, se incubaron las cajas por 48 horas a 35 ± 2 °C (Aragadvay, 2009).

2.5.2.2. Identificación cualitativa de E. coli.

De las diluciones 10⁻¹ y 10⁻² se realizó una siembra en agar McConkey y se incubó por 24 horas a 37 °C. De las colonias existentes en la placa, se realizó una siembra en baterías bioquímicas (SIM, TSI, LIA, Urea, Citrato), se incubaron por 24 h a 37 °C (Aragadvay, 2009).

2.5.2.3. Recuento de hongos y levaduras.

De las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , se tomó 100 μL de cada dilución y se colocó sobre cajas Petri con medio de cultivo Saboraud, se incubó a temperatura ambiente por 7 días, se realizó el conteo de las colonias formadas (Aragadva, 2009).

2.5.3. Análisis Cualitativo.

2.5.3.1. Tamizaje fitoquímico.

Se tomó 50g de planta seca tamizada y atravesó por tres extracciones sucesivas en: éter etílico, etanol y agua, cada extracción sufrió un tiempo de maceración de 48 horas, al extracto obtenido de cada solvente se desarrollaron diversas pruebas cualitativas tales como: Compuestos grasos, alcaloides, azúcares reductores (**Figura 9**), lactonas, coumarinas, triterpenos, esteroides, saponinas, entre otras (Miranda, 2002).

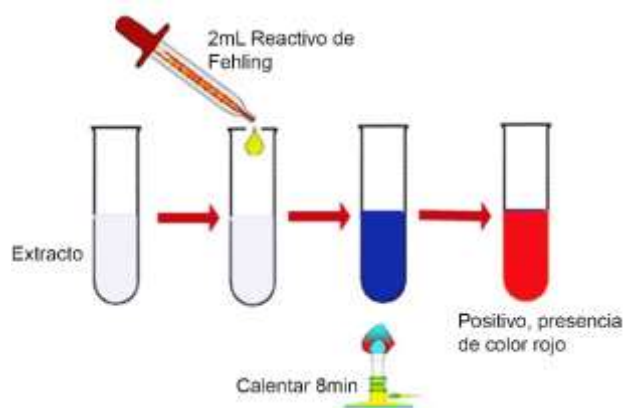


Figura 9. Ensayo de Fehling para azúcares reductores

Fuente: Miranda, 2002

Elaboración: El Autor

2.6. Extracto etanólico

La droga vegetal tamizada se maceró con etanol al 60% obteniendo una tintura 1:10, la misma que se dejó por 20 días con agitación diaria de 15min (Sharapin, 2000). Finalmente se filtró el macerado y se concentró a condiciones de 38 °C, 80 rpm, 140mbar en un rotaevaporador.

2.7. Control de calidad del extracto etanólico

2.7.1. Análisis organoléptico del extracto.

Se tomó una alícuota de 30 mL de extracto y se desarrolló el análisis sensorial que involucró la determinación de: color, olor y aspecto (Tabla 3) (Proaño, 2013).

Tabla 3. Terminología descriptiva de propiedades organolépticas

COLOR	OLOR	SABOR
Blanco/ casi blanco Amarillo cremoso Marrón claro Brillante	Fuerte Sulfuroso Aromático Sulfuroso Inodoro	Ácido Suave Intenso Amargo Dulce Insipido

Fuente: García, 2014

Elaboración: El Autor

2.7.2. Análisis físico – químicos del extracto.

2.7.2.1. Determinación de pH.

Se disolvió 1g de extracto en 3 mL de agua y se midió el pH con ayuda de un pHmetro calibrado (Proaño, 2013).

2.7.2.2. Determinación de densidad relativa.

Inicialmente se lavó y secó un picnómetro vacío a 50°C por una hora, se dejó enfriar y se pesó, posteriormente se enrazó al mismo con agua destilada, y se anotó el peso; eliminamos el agua y se colocó el extracto hasta enrasar y se pesó (Proaño, 2013). Con los datos obtenidos aplicamos la siguiente fórmula:

Ecuación 6. Fórmula de densidad relativa

$$DR_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

DR₂₅ = Densidad relativa a 25 °C

M = Masa del picnómetro vacío (g)

M₁ = Masa del picnómetro + agua (g)

M₂ = Masa del picnómetro + muestra (g)

Fuente: Proaño, 2013

Elaboración: Proaño, 2013

2.7.2.3. Determinación de sólidos totales.

Se tomó un alícuota de 5 mL de la tintura, se dejó evaporar en baño maría hasta que el residuo esté seco y posteriormente se llevó a una estufa por 3 horas a 105 °C, se enfrió y pesó; se repitió el procedimiento hasta peso constante. Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 7. Fórmula de porcentaje de sólidos totales

$$\%Sólidos\ totales = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

P = peso crisol vacío (g)

Pr = peso crisol + residuo (g)

V = Volumen de porción de ensayo

Fuente: Proaño, 2013

Elaboración: Proaño, 2013

2.7.3. Valoración del principio activo.

2.7.3.1. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina (en inglés, *Thin Layer Chromatography* - TLC) consistió en diluir 2mL de extracto en 8 mL de metanol, posteriormente se aplicó 10 µL de ésta dilución sobre una placa cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase inversa) (**Figura 10**), como solvente se empleó metanol/agua 8:2 y se observó en una lámpara UV a 254 nm y 365 nm, el revelador consistió en ácido sulfúrico y vainillina (Rivera, 2010). Se realizó un estándar (25µg/mL pinocembrin) aplicando el mismo método. Se anotó los R_f (**Ecuación 8**).

Ecuación 8. Formula de R_f (ratio of front)

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

Fuente: Rivera, 2010

Elaboración: Rivera, 2010

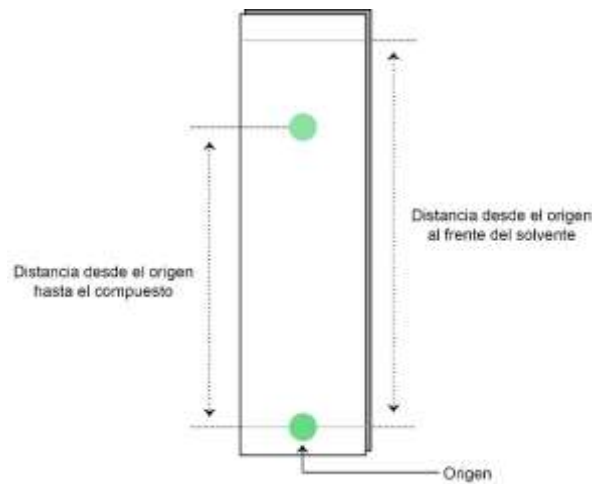


Figura 10. Medida de los R_f en la placa de silica gel 60 F₂₅₄ (fase inversa)

Fuente: Rivera, 2010

Elaboración: El Autor

2.7.3.2. Espectrofotometría UV-vis.

Se utilizó la espectrofotometría UV-vis como método analítico (Perez, Rodríguez, & Suarez, 2014) para la cuantificación del porcentaje de pinocembrin en el extracto de *P. ecuadorensis*. Para ello se utilizó un equipo espectrofotométrico JENWAY 7305 con lámpara de xenón como fuente de luz, resolución de 1nm, exactitud ± 2 nm y ancho de banda espectral de 5nm, como solución patrón se empleó pinocembrin (pureza >95%) y los procesos de extracción fueron realizados con metanol.

- *Preparación de la sustancia de referencia:* Se pesó 10mg de pinocembrin (**Figura 11**) y aforó a 50mL con metanol (concentración 200 μ g/mL). A partir de esta concentración se realizó la curva de calibración, los puntos empleados fueron: 0.5, 1, 5, 10, 20 μ g/mL.
- *Determinación de la longitud de onda de máxima absorción de pinocembrin:* Se determinó la longitud de onda (λ) de máxima absorción a partir de los espectros comprendidos en el rango de 200 – 380 nm, de pinocembrin (5 μ g/mL en metanol).

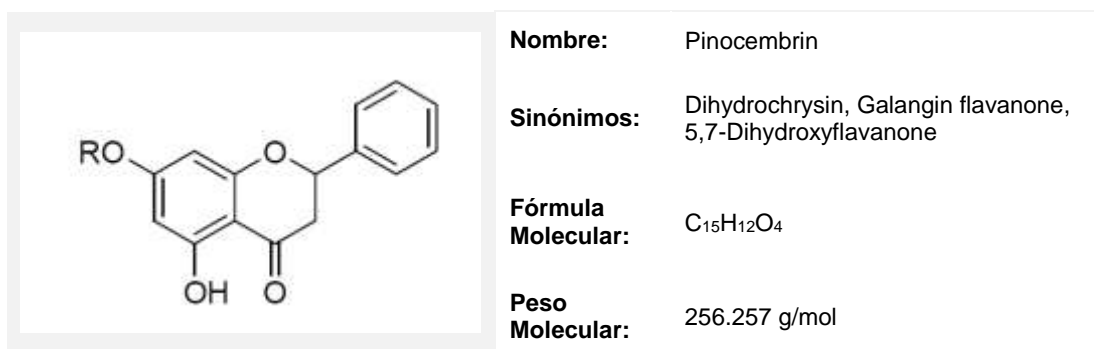


Figura 11. Descripción de la estructura química del pinocembrin

Fuente: Ramírez *et al.* 2013

Elaboración: Ramírez *et al.* 2013

- *Preparación de la muestra:* Se pesó 0.1g de extracto y disolvió en 3 mL de metanol, se calentó 2min a 45°C, se dejó enfriar y se sometió a ultrasonido por 2 min, se aforó a 10mL (concentración 10000 µg/mL) con metanol y se colocó a ultrasonido 1 min; de ésta solución se tomó 25 µL y se aforó a 5mL con metanol (concentración de 50µg/mL), se realizó la lectura a 290nm. El contenido del analito se obtuvo a través de la ecuación de la recta (**Ecuación 9**) de la curva de calibración, en donde se partió de $y = bx + a$, despejando x, para conocer la concentración del analito.

Ecuación 9. Fórmula de concentración de analito.

$$y = bx + a$$

y = Valor de la coordenada en el eje vertical del gráfico, absorbancia de la muestra.

x = Concentración de analito

a = Intercepto

b = Coeficiente de regresión

Fuente: Faulí & Trillo, 1993

Elaboración: Faulí & Trillo, 1993

2.7.4. Evaluación antifúngica del extracto.

2.7.4.1. Microorganismos de estudio.

Se empleó dos especies fúngicas, *Trichophyton metagrophytes* ATCC® 9533 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188.

2.7.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Método M-38A.

El análisis del extracto de *P. ecuadorensis* se realizó en una cabina de flujo laminar, previamente limpia y estéril. El ensayo se realizó en micro placa de 96 pocillos a través de dilución seriada, se colocaron 180 μL de caldo Sabouraud a los pocillos de la primera fila y 100 μL a lo demás pocillos, paralelamente se diluyó 20 mg del extracto en 50 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) y 50 μL de suero fisiológico, se transfirieron 20 μL de ésta solución sobre los pocillos de la primera fila, exceptuando las tres últimas en donde identificaremos: a) control de esterilidad (200 μL de caldo Sabouraud), b) control negativo (180 μL caldo Sabouraud + 10 μL DMSO + 10 μL suero fisiológico) y c) control positivo (180 μL de caldo Sabouraud + 20 μL itraconazol 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un CMI de 0,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se pipeteó de 10 a 15 veces la solución, consiguiendo mayor homogeneidad del medio, de la primera fila se tomaron 100 μL de solución y se diluyó con 100 μL del pocillo siguiente, se homogenizó y se repitió el procedimiento por ocho ocasiones consecutivas, los 100 μL que obtenemos al final, lo desechamos, de esta manera se consiguió 8 diluciones en donde el extracto diluido en el medio se encontraba entre 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 12**). Asimismo empleando el mismo procedimiento se desarrolló el control positivo, negativo y esterilidad. Las cajas multipocillos se sellaron y dejaron incubar a 28 ± 2 °C por 96 horas (CLSI, 2002; Ramírez, Cartuche, Morocho, Aguilar, & Malagón, 2013)

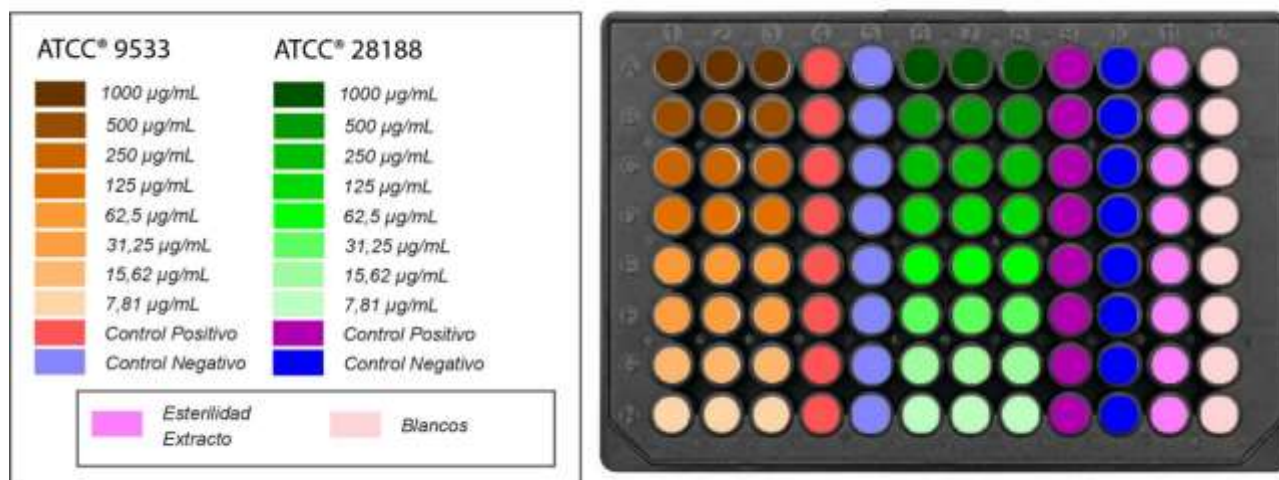


Figura 12. Modelo de caja multipocillos TC96 para hongos con las concentraciones del extracto ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Fuente: CLSI, 2002; Ramírez *et al*, 2012.

Elaboración: El Autor

2.7.4.3. Preparación del inóculo.

Consistió en una suspensión fúngica que se realizó a partir de cepas almacenadas en un reservorio congelado, mantenidas a -7 °C, y posteriormente ajustada la población a 1×10^5 esporas/mL, se tomó 100 µL de ésta suspensión y se colocó en todos los pocillos incluidos los controles negativos y positivos, exceptuando los pocillos de esterilidad.

Según la American Type Culture Collection (ATCC) las condiciones mínimas para el crecimiento de este tipo de cepas fúngicas se mencionan a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características de crecimiento in vitro de *Trichophyton spp.*

CEPA FÚNGICA	CÓDIGO	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES
<i>Trichophyton metagrophytes</i>	ATCC® 9533	Caldo y/o Agar Sabouraud	Temperatura: 38°C Tiempo de incubación:72-96 h
<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC® 28188		

Fuente: ATCC

Elaboración: El Autor

2.8. Estudios de preformulación

2.8.1. Ensayos de solubilidad.

2.8.1.1. Ensayos de solubilidad entre excipientes candidatos.

Se pesó 1g de los excipientes sólidos y se sometió a diversos solventes a temperaturas 20, 50 y 65 °C, llegando así a un total de 168 pruebas, al finalizar el ensayo se realizó una categorización descriptiva de solubilidad tal y como se detalla en la tabla **Tabla 5**.

2.8.1.2. Ensayos de solubilidad API/Excipientes.

La determinación de la solubilidad del principio activo se desarrolló a través de una valoración descriptiva tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Categorización de solubilidad basada en valoración descriptiva

Valoración	Partes de disolvente que se requiere para 1 parte de soluto
Muy soluble	< 1
Fácilmente soluble	1 a 10
Soluble	10 a 30
Moderadamente soluble	30 a 100
Poco soluble	100 a 1000
Muy poco soluble	1000 a 10000
Insoluble	>10000

Fuente: USP33, 2010

Elaboración: USP33, 2010

Los solventes empleados para el ensayo de solubilidad con el principio activo fueron: propilenglicol, agua, vaselina líquida.

2.8.2. Diseño factorial.

2.8.2.1. Composición de las mezclas.

Se trabajó con un diseño factorial 2³ utilizando el programa estadístico Minitab®18, el mismo que condujo a una máxima eficiencia y calidad de la información para el proceso de formulación del producto a desarrollar, para este diseño se empleó tres factores a dos niveles diferentes, que se los señaló con los signos “+” y “-“(Tabla 6), siendo la composición general y factores del diseño factorial de la mezcla lo siguiente:

Principio Activo 1,5 g
Excipientes..... c.s.p

Las condiciones experimentales se enfocaron a la empleabilidad de diferentes excipientes que cumplen una misma función en un mismo porcentaje dentro de la formulación, las mismas que estuvieron enfocadas en:

A: Sistema Reológico

B: Conservantes

C: Reguladores de pH

Tabla 6. Diseño factorial 2³

Función	Factores	Nivel	%	Cantidad (g)
Agente Reológico	Alcohol Cetílico	A+	8	4
	Alcohol Estearílico	A-	8	4
Conservantes	Parabenos	B+	0,2	0,1
	Ácido Cítrico	B-	0,2	0,1
Reguladores de pH	Citrato de Sodio	C+	0,3	0,15
	Benzoato de Sodio	C-	0,3	0,15
Emulgente	Cetomacrogol	/	8	4
Emoliente	Propilenglicol	/	30	15
Grasas Minerales	Vaselina Líquida	/	15	7,5
	Vaselina Sólida	/	8	4
API	Extracto <i>P. ecuadorensis</i>	/	1,5	0,75
	Agua	/	29	14,5
		TOTAL	100	50

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

2.8.2.2. *Elaboración y acondicionamiento de las mezclas*

Se preparó 50g de las mezclas, las mismas que se distribuyeron en viales de 10mL, se taparon y conservaron por 20 días en las condiciones que se explica en la **Tabla 7** a continuación:

Tabla 7. Distribución de mezclas

N° viales	Mezcla	Cantidad/ vial	Condiciones
2	Todas	8g	22 ± 2 °C
2	Todas	8g	40 °C + 70 %humedad

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

2.8.2.3. *Análisis de mezclas*

Se realizó espectrofotometría UV-vis para determinar la concentración de principio activo y se determinó la significancia del resultado calculando la varianza experimental de las interacciones, utilización de herramientas como ANOVA a través del programa estadístico Minitab®18.

2.9. Formulación

2.9.1. Desarrollo de crema antifúngica O/W.

Cada 100 g contiene:

Extracto de Matico (<i>Piper ecuadorensis</i>).....	1,5 %
Excipientes.....	c.s

La formulación se desarrolló en base a los parámetros obtenidos de los ensayos de pre-formulación y se elaboró una cantidad de 100g de producto.

2.9.2. Proceso de fabricación.

Según la United States Pharmaceutical N° 33 (USP 33) el proceso de fabricación se desarrolló basándonos en la **Figura 13** y acoplados a los parámetros de optimización realizados.

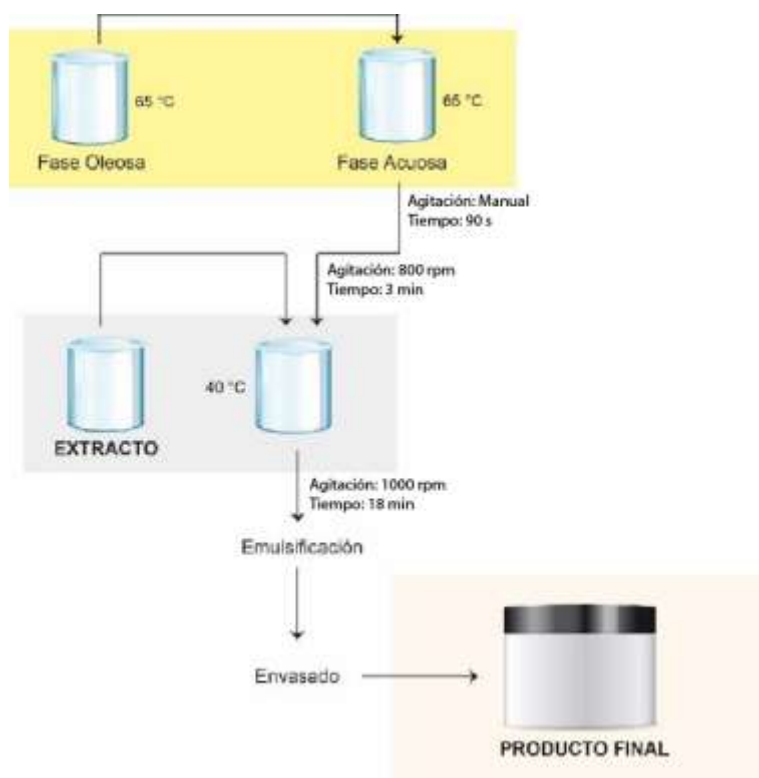


Figura 13. Esquema de elaboración de fitocosmético a base de *Piper ecuadorensis*

Fuente: USP33, 2010

Elaboración: El Autor

2.9.3. Control de calidad de producto terminado.

2.9.3.1. Evaluación organoléptica.

- *Determinación de olor:* Se introdujo una tirilla de papel de 2cm de ancho por 10cm de largo en el producto, posteriormente se procedió a oler y evaluar la presencia de olor (Mora, 2014).
- *Determinación de color:* Se colocó 10g de crema en un tubo de ensayo, se observó la coloración, transparencia, separación o no de capas y presencia de partículas (Mora, 2014).
- *Determinación de untuosidad al tacto y presencia de grumos:* Se aplicó 1g de crema en la región dorsal de la mano y se determinó la presencia o no de grumos y presencia o no de grasa (Mora, 2014).

2.9.3.2. Evaluación físico – química

- *Extensibilidad:* En el centro de una placa de vidrio se colocó 10 mg de crema, sobreponemos otra placa de vidrio y se colocó una pesa de 5g durante 3 min sobre las placas; se midió 8 radios (Fernández, 2003). Con los datos obtenidos se realizó los cálculos respectivos aplicando la siguiente fórmula:

Tabla 8. Fórmula de determinación de extensibilidad

$$AE = (rp)^2$$

AE = área de extensibilidad (cm²)

Pr = radio promedio de ocho mediciones

- *Microscopía:* Se colocó una gota del preparado en un portaobjetos, se trasladó a un microscopio y se procedió a observar el aspecto y homogeneidad a nivel micro-óptico (Fernández, 2003).
- *Determinación de pH:* Se dispensó 2g del preparado y se diluyó en 30mL de agua destilada, se procedió a medir el pH con ayuda de un pHmetro calibrado (Fernández, 2003).

2.9.3.3. Evaluación microbiológica

- *Aerobios mesófilos (Norma ISO 4833)*: Se pesó 10g de crema y agregó 100mL de agua peptonada (dilución 10^{-1}), reposó por 60 min, de ésta dilución se tomó 1 mL y se mezcló con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-2}), asimismo se repitió el procedimiento para dos diluciones más 10^{-3} y 10^{-4} (**Figura 14**). Se transfirió 1mL de cada dilución en cajas Petri y agregamos Agar Plate Count, se incubó a 30 °C por 72 horas.
- *Staphylococcus aureus*: Se incubó la dilución inicial anteriormente realizada a 30 °C por 24 horas, posteriormente se estrió con un asa bacteriológica sobre una placa de Petri que contiene Medio Agar Manitol Salado y se incubó a 30 ± 2 °C durante 24 horas.
- *Salmonella spp.*: Se tomó 1mL de la solución inicial incubada y agregamos a 10 mL de Caldo Rappaport Vassidiadis, mezclamos e incubamos a 30 °C durante 24 horas; se estrió con una asa bacteriológica llena sobre los medios: Medio Agar Verde Brillante (Agar VD), Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Agar XLD) y Medio Agar Hektoen, y se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

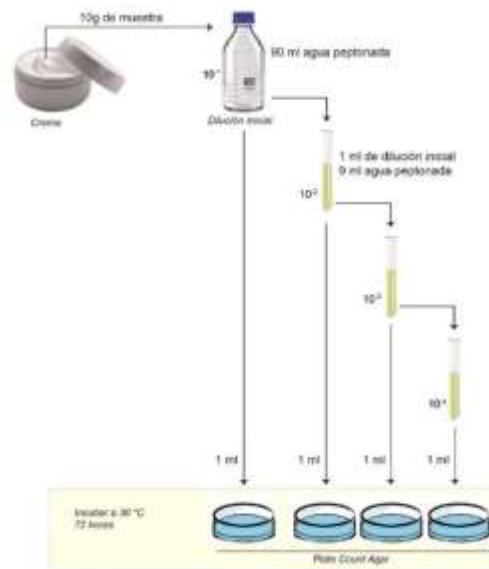


Figura 14. Proceso de identificación y recuento de aerobios mesófilos en fitocosmético

Autor: Norma ISO 4833

Elaboración: El Autor

- *Escherichia coli*: De la solución inicial incubada se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo con 10 mL de Caldo MacConkey, se mezcló e incubó a 42 °C durante 24 horas, posteriormente se estrió con un asa bacteriológica llena sobre Medio Agar MacConkey e incubamos a una temperatura de 35 °C durante 24 horas. Se realizó baterías bioquímicas para la identificación cualitativa.
- *Determinación de mohos y levaduras (norma ISO 7954)*: De las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , preparadas previamente, se tomó 1 mL de cada dilución y se colocó sobre cajas de Petri, se agregó 15 mL de Agar Sabouraud y se incubó a 25 °C por 5 días.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización de material vegetal

3.1.1. Observación macroscópica.

Las hojas que se muestran en la **Figura 15**, permiten describir claramente la forma cordiforme, envés pelúcido-punteado y pubescente (**Figura 15A**), limbos casi orbiculares, algo equiláteros, acorazonados en la base, levemente acuminados para el ápice; presenta una textura áspera. Medidas promedio de 24 cm de largo por 20.75 cm de ancho.

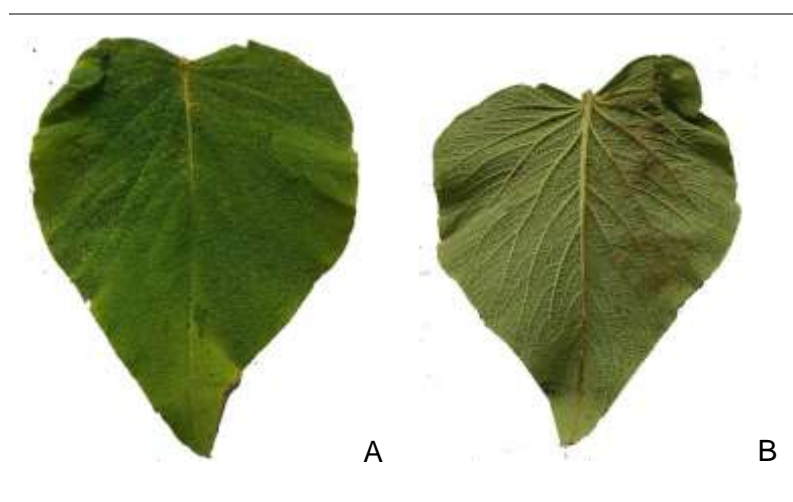


Figura 15. Hojas de *Piper ecuadorensis*. A) Haz de la hoja. B) Envés de la hoja

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

3.1.2. Análisis físico – químicos y microbiológicos del material vegetal.

Los resultados denotados en la **Tabla 9** indican que la humedad inicial del material vegetal fue de 82.8% con un pH de 7.2, humedad que según Sharapin, 2000 presentan las plantas en estado fresco (>60%); tras el proceso de secado la humedad residual llegó a un total de 10.2%, valor que se encuentra dentro de los límites permisibles (<14) para la obtención de extracto, según Miranda 2000 y USP33.

Las hojas de *Piper ecuadorensis* presentan un porcentaje de cenizas totales de 11.68%, a pesar de estar dentro de los rangos permisibles (<12), es necesario desarrollar las pruebas de solubilidad en agua e insolubilidad en HCl, para conocer si la muestra presenta metales pesados dentro de su composición. Los resultados mostraron valores de 5.64% para cenizas solubles en

agua y 3.01% para cenizas insolubles en HCl. siendo los rangos permisibles de <7 y <5, respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis físico - químicos de material vegetal

ANÁLISIS	<i>Piper ecuadorese</i>	ESPECIFICACIONES USP
Humedad inicial	82.8 %	-
pH planta fresca	7.2	-
Humedad residual	10.2 %	<14
Cenizas totales	11.68 %	<12
Cenizas solubles en agua	5.64 %	<7
Cenizas insolubles en HCl	3.01 %	<5
Sustancias solubles	21.4 %	-
pH planta seca	6.3	-

Fuente: USP33, 2010

Elaboración: El Autor

El control microbiológico es muy importante para asegurar la calidad del producto. La **Tabla 10** muestra los resultados obtenidos del análisis microbiológico del material vegetal, observándose que los valores para aerobios mesófilos, *Escherichia coli*, mohos y levaduras, se encuentran dentro de las especificaciones establecidas por la USP33, 2010 y OMS, 1998.

Tabla 10. Análisis microbiológico de las hojas de *P. ecuadorese*

ANÁLISIS	RESULTADO	ESPECIFICACIONES USP33/10	OMS/98
Bacterias aerobias mesófilas	120 UFC / caja	<300 UFC / caja	10 000 UFC / g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausencia	Ausencia
Mohos y levaduras	30 UFC / caja	< 100 UFC / caja	< 100 UFC / g

Fuente: USP33, 2010; OMS, 1998

Elaboración: El Autor

3.1.3. Optimización del rendimiento en base al tamaño de partícula.

El rendimiento obtenido de extracto según el tamaño de partícula se muestra en la **Tabla 11**, en donde podemos observar que el material tamizado utilizando una luz de malla de 850 μm presenta un rendimiento mayor en comparación al resto; dato que concuerda con la Farmacopea Homeopática Brasileña en Sharapin, 2000, donde se reporta que el material vegetal idóneo para una extracción por maceración abarca polvos moderadamente gruesos o semi-finos que van de 850 a 120 μm .

Tabla 11. Rendimiento del extracto en base al tamaño de partícula

N° Tamiz	Tamiz de prueba					Rendimiento (%)
	Medida	Apertura del tamiz		Diámetro nominal del alambre		
		mm	Pulgadas	mm	pulgadas	
10	2.00 mm	2.00	0.0787	0.900	0.0394	31,28
18	1.00 mm	1.00	0.0394	0.580	0.0228	18.43
20	850 μm	0.850	0.0331	0.510	0.0201	35.02
35	500 μm	0.500	0.0197	0.340	0.0134	32.1
60	250 μm	0.250	0.0098	0.180	0.0071	33.75

Fuente: USA Standard Testing Seives, 2006

Elaboración: El autor

3.2. Tamizaje Fitoquímico

Estudios desarrollados por Rivera, 2010, Malagón y Ojeda, 2012 y Ramírez et al., 2013 demuestran que químicamente la *Piper ecuadorensis* está conformada por esteroides, catequinas, amidas, lignanos, neolignanos, fenoles, terpenos, compuestos esteroides, azúcares reductores y flavonoides, siendo estos últimos los responsables de la actividad antifúngica. En los resultados del presente trabajo, que se detallan en la **Tabla 12** se puede denotar la presencia de compuestos esteroides, grasas, triterpenos, catequinas, alcaloides, saponinas fenoles y flavonoides, resultado concordante con los estudios realizados previamente.

Tabla 12. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto de *P. ecuadorensis*

Metabolito Ensayado	Tipo de Extracto		
	Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Sudan (aceites y grasas)	+		
Dragendorff (alcaloides)	+++	+++	+++
Mayer (alcaloides)	+++	+++	+++
Wagner (alcaloides)	+++	++	++
Lieberm-Buchard (trit. y ester.)	+	+	
Catequinas		+	
Resinas		-	
Fehling (az. Reduct.)		-	-
Espuma (saponinas)		-	+
Cloruro férrico (fenol. y taninos)		+	+
Ninhidrina (aminoácidos)		-	
Borntrager (quinonas)		++	
Shinoda (flavonoides)		+	+
Kedde (Cardenólidos)		-	
Antocianidinas		-	
Mucílagos			-
Principios Amargos y astringente			-
Simbología: (+) ; (++) ; (+++) = Presencia del metabolito (-) = Ausencia del metabolito Espacio vacío = Inexistencia de ensayos fitoquímicos con aquel solvente			

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

3.3. Extracto etanólico

El extracto etanólico fue obtenido por maceración de partículas de 850 µm de la droga vegetal seca en etanol al 60% por un lapso de 20 días agitando diariamente por 15 minutos (Sharapin, 2000) y finalmente se concentró a 38 ± 2 °C, 80 rpm, 140mbar, obteniendo un rendimiento del 35% (**Tabla 13**).

Tabla 13. Rendimiento del extracto

P _{inicial}	P _{final}	Rendimiento
100 g	35 g	35%

Fuente: Elaboración

Elaboración: El Autor

3.3.1. Control de calidad del extracto etanólico.

La **Tabla 14**, indica los resultados de la descripción organoléptica, así como de los ensayos fisicoquímicos y microbiológicos del extracto etanólico de *P. ecuadorensis*, el cual presenta un color marrón, olor aromático y aspecto viscoso. El pH promedio del extracto etanólico corresponde a un valor de 5.1, acidez característica de los extractos vegetales, misma que coadyuva en la desarrollo de formas semisólidas de uso tópico, según Aragadvay, 2009. El valor de densidad relativa es de 0.976, un valor elevado debido a la consistencia que tiene el extracto (Aragadvay, 2009). Los sólidos totales se presentan como las impurezas disueltas en una sustancia, en este caso el extracto posee un valor de 1.49 mg/L, un valor por debajo del rango máximo determinado por la OMS, 1998 (máximo 1 600 mg/L). Microbiológicamente el extracto cumple con las especificaciones requeridas para un extracto vegetal, presentando ausencia de crecimiento de aerobios mesófilos, *E. coli*, mohos y levaduras.

Tabla 14. Resultado de análisis organolépticos, físico-químicos y microbiológicos del extracto

ANÁLISIS	RESULTADO	ESPECIFICACIONES OMS ¹
Color	Marrón	-
Olor	Aromático	-
Aspecto	Viscoso	-
pH	4.3	-
Densidad	0.976	-
Sólidos Totales	1.49	Máx. 1 600 mg/L
Bacterias aerobias mesófilas	Ausente	Máx. 5 x 10 UFC/g o mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausencia
Mohos y levaduras	Ausente	<100 UFC/g o mL

Fuente: Organización Mundial de la Salud (OMS), 1998

Elaboración: El Autor

3.3.2. Valoración del principio activo.

Los resultados de la TLC inversa del extracto de *Piper ecuadorensis* mostraron un $R_f = 0.6$, concordante con la solución estándar, valor que además es similar al reportado previamente por Malagón y Ojeda, 2012, en donde tras el aislamiento de los compuestos de interés biológico del

extracto etanólico de *P. ecuadorensis*, el Pinocebrin mostró un $R_f = 0.6$. Además, estudios realizados por Rivera, 2010 a través de un ensayo de autograma demuestra que la bioactividad del extracto se localiza en un $R_f = 0.6$ y 0.7 , mismos que indicaban la actividad antifúngica de esta especie vegetal frente a *T. metagrophytes* y *T. rubrum*.

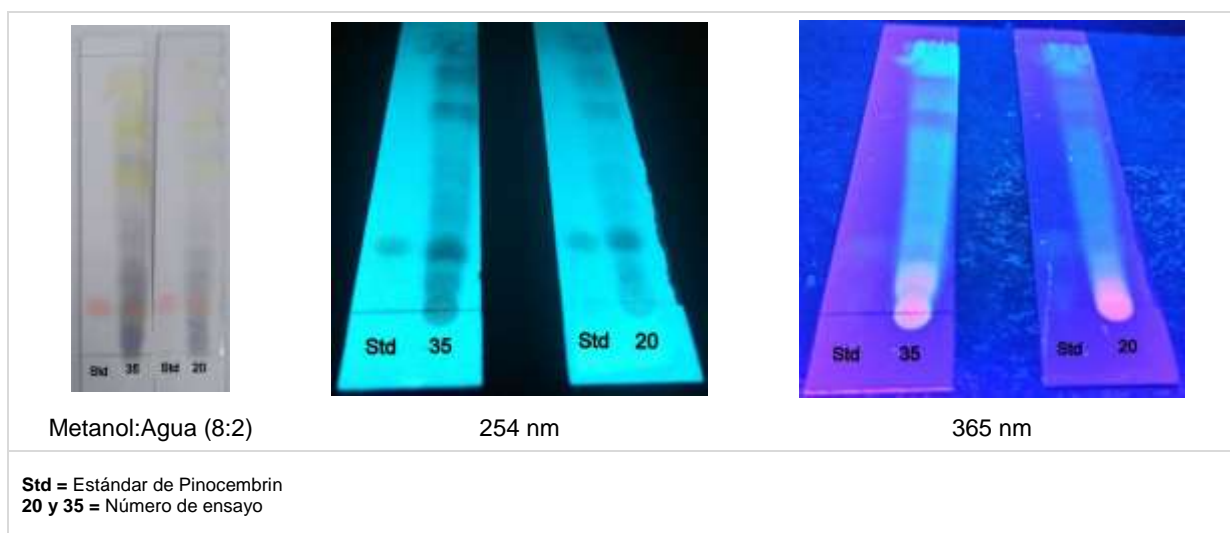


Figura 16. Cromatografía en Capa Fina (TLC) de extracto y estándar.

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

El espectro UV del Pinocebrin ($5 \mu\text{g/mL}$), se muestra en la **Gráfico 1**. Se obtuvo un máximo de absorción (λ_{max}) en 290nm , por tal motivo se escogió este valor de λ para la cuantificación del analito. La cuantificación del principio activo (Pinocebrin) presente en el extracto, fue llevada a cabo utilizando espectrofotometría UV. El **Gráfico 2** muestra el espectro UV del extracto de *Piper ecuadorensis* en metanol en donde se obtuvo un máximo de absorción (λ_{max}) en 290nm tal y como se mencionan en estudios de flavonas realizados por Medina, 2012, en donde debido a la posición de las bandas que conforman químicamente a las flavonas, éstas presentan máximos de absorción que van de 270 a 290 nm y de 300 a 330 nm a menor absorción.

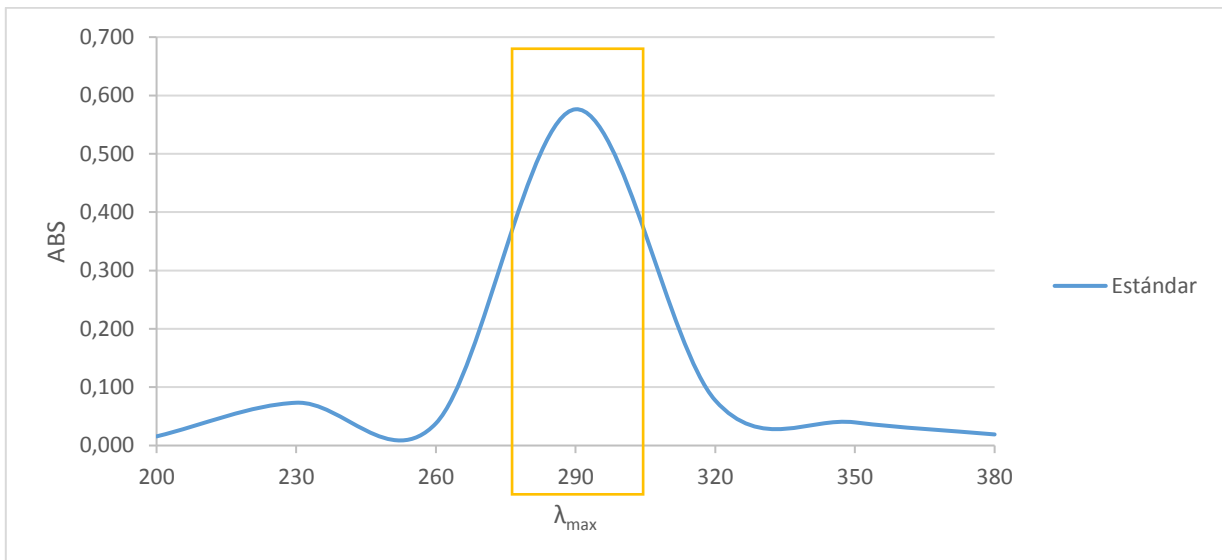


Gráfico 1. Máximo espectro de absorción del estándar de referencia (pinocembrin 5 µg/mL)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

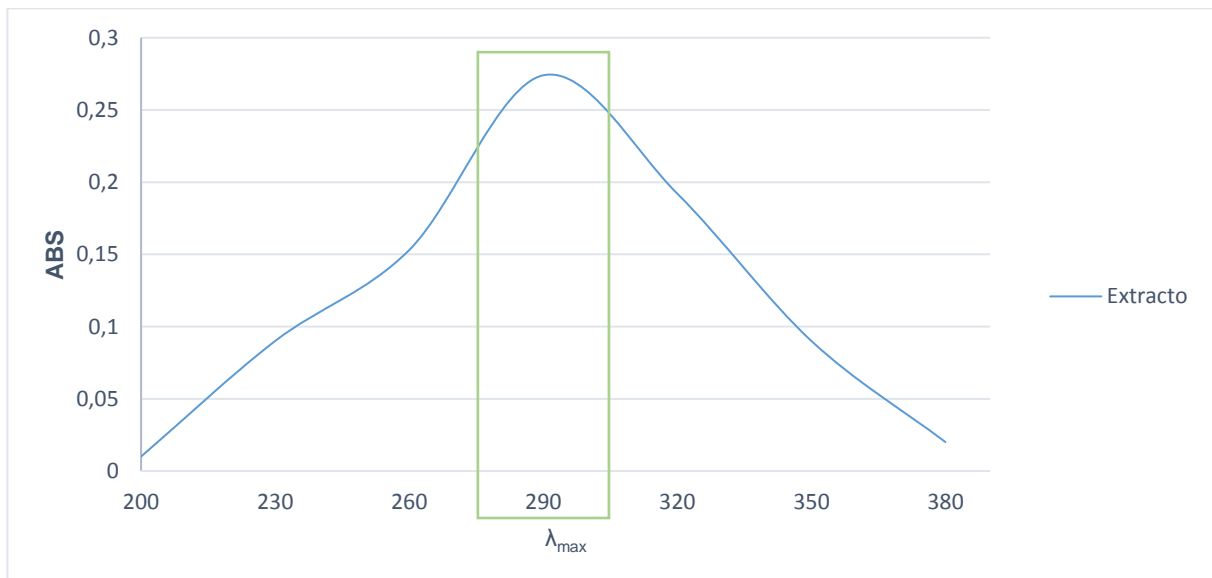


Gráfico 2. Máximo espectro de absorción de Pinocembrin en el extracto (50 µg/mL)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Con concentraciones de 0,5, 1, 5, 10 y 20 µg/mL de pinocembrin, se desarrolló la curva de calibración (**Gráfico 3**) y se determinó los siguientes criterios estadísticos:

Tabla 15. Curva de calibración de Pinocebrin

RESULTADOS	CRITERIOS
$y = 0,1085x + 0,0158$	$y = bx + a$
$r^2 = 0,998$	$r^2 \geq 0,98$
$b = 0,1085$	$b \approx 1$
$t^* = 2,77 (0,95\%)$	$t = \text{alta}$
$p^{**} = 0,37$	$p \geq 0,05^*$
GL ^{***} = 4	
*Valor de $-t$, se acepta o no la H_0 (apropiado para los grados de libertad)	
**Valor de $-p$, se acepta o no la H_0 (la media en las lecturas es igual)	
*** GL = Grados de Libertad	

Fuente: Pérez *et al.* 2014

Elaboración: El Autor

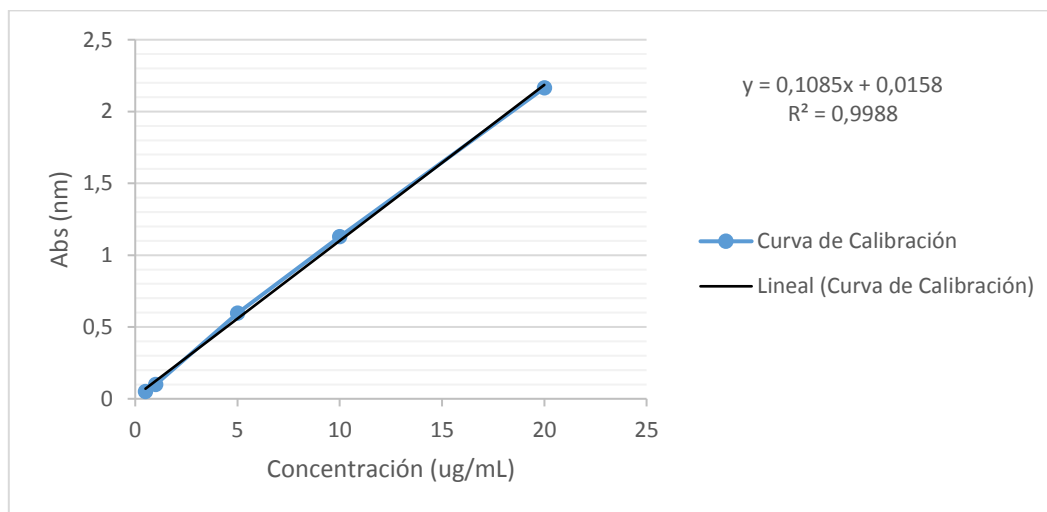


Gráfico 3. Curva de calibración. Estándar de Pinocebrin (5µg/mL)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Con un R cuadrado (r^2) = 0,9988, la proporción de la varianza en la variable dependiente es predecible a las variables independientes, en un sentido más amplio las diferentes concentraciones expresan una regresión lineal simple con respecto a las absorbancias obtenidas de cada una de ellas; asimismo con un valor de $-p = 0,37$ se acepta la media, indicando que cada

una de las repeticiones desarrolladas para la curva de calibración son similares y con un valor de 2,77 la significancia del *t-student* para medias de muestras emparejadas es de 0,95%.

Tabla 16. Porcentaje de pinocembrin en 50 µg/mL de extracto de *P. ecuadorensis*

ENSAYO	ABS	CONCENTRACIÓN PINOCEMBRIN (µg/mL)
Extracto (50µg/mL)	0,274	2,379

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Como se puede observar en la **Tabla 16**, a través de ésta técnica espectrofotométrica, el pinocembrin se encuentra en una concentración de 2,379 µg/mL en 50µg/mL de extracto, es decir, que en 1g de extracto encontraremos 47,58 mg de pinocembrin, aproximadamente.

3.3.3. Evaluación antifúngica *in vitro* del extracto etanólico.

El CMI por microdilución en caldo es el método mayormente empleado para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*, este CMI se presenta como la mínima concentración de un compuesto que puede inhibir el crecimiento de una bacteria u hongo después de 18 o 24 horas de incubación, en el caso de especies fúngicas de 72 a 96 horas (CLSI, 2002).

Empleando una concentración final de 1×10^5 esporas/mL de *Trichophyton methagrophytes* ATCC® 9533 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188; el CMI se definió como la concentración más baja del extracto que impidió el crecimiento micelial después de 96 horas de incubación, obteniendo de esta manera un CMI de 500 µg/mL para *T. methagrophytes* y 1000 µg/mL para *T. rubrum*.

Tabla 17. CMI del extracto de *P. ecuadorensis* frente a cepas dermatofíticas.

EXTRACTO	<i>Trichophyton methagrophytes</i> ATCC® 9533	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC® 28188
PE	500 µg/mL	1000 µg/mL
Control	20 µL de itraconazol (1 mg/mL)	
PE = <i>Piper ecuadorensis</i> .		

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Un estudio realizado por Ramírez *et al.* 2013 demuestran que la fuerte actividad antimicótica del extracto metanólico de una muestra de *Piper ecuadorensis* obtenida de Pituca, Zamora Chinchipe, Ecuador, se debe a la interacción existente en cada uno de sus metabolitos, consiguiendo en ese momento un CMI de 31,25 y 62,5 µg/mL para *T. methagrophytes* y *T. rubrum*, respectivamente. En nuestro ensayo, la variabilidad de resultados es notoria, obteniendo valores comprendido entre 500 y 1000 µg/mL, sin embargo y acorde a lo enunciado por Bisset en 1994 y Calvopiña en 2010, la cantidad de metabolitos existentes en una planta varía dependiendo de los factores en los que se encuentre, por lo tanto, el lugar de procedencia, clima, altitud, época de recolección de la planta, tiempo de vida, etc., son factores preponderantes y que modifican en gran parte la constitución de una especie vegetal. Por lo tanto, según lo demostrado anteriormente se podría decir que la planta proveniente de Pituca (Zamora Chinchipe), es más activa que la de Saraguro, y recalcar que los solventes que se utilizaron para la obtención de los extractos son diferentes.

3.4. Preformulación

3.4.1. Ensayos de solubilidad.

Los procesos de optimización abarcan desde la adquisición del material vegetal hasta la obtención del producto terminado, por tal motivo el proceso de preformulación es crucial para el desarrollo de un producto de calidad. Asimismo Fuentes, 2008 indica que para el desarrollo de formulaciones es indispensable evaluar la posible interferencia que puedan existir entre los excipientes y de los excipientes con el principio activo.

Durante los estudios de preformulación, la investigación debe dirigirse a la obtención de la mayor cantidad de información posible sobre las propiedades de los compuestos que integran la formulación como excipientes y principio activo, incluyendo también, los ensayos de solubilidad

ya que son de gran relevancia para la identificación de los diferentes sistemas solventes a utilizar (Jimenez, Mora, & Luegas, 1994).

En la **Tabla 18** podemos observar que la solubilidad entre los excipientes es muy variada, siendo así que el cetomacrogol (emulgente) resulta ser fácilmente soluble (1:5) en el propilenglicol a 50°C, insoluble en agua (1:10000) y demás disolventes; asimismo el propilparabeno y metilparabeno (conservantes) presentan una solubilidad (1:30) a 60°C en agua y propilenglicol, sin embargo llega a ser insoluble (1:10000) con agua.

Para la elaboración de una crema se deben preparar habitualmente dos fases por separado, la primera de tipo acuosa y la segunda oleosa, estas fases se incorporan entre sí cuando alcanzan una misma temperatura que va desde los 60 a 70°C (Mora, Elaboration of Anti-aging Cosmetic Cream based on Curcuma Longa and its Physical-Chemical Characteristics and Sensory Analysis, 2015; Rivera, 2010), por tal motivo para la solubilidad entre excipientes, se emplearon temperaturas que varían entre 22 a 65 °C, de esta manera nos aseguramos que la temperatura esté en los rangos establecidos para la elaboración de un preparado semisólido.

	Agua (mL)	T°	R	USP33	Propilenglicol (mL)	T°	R	USP33	Vaselina Líquida (mL)	T°	R	USP33
Cetomacrogol	1:10000	60°C	I	I	1:5	50°C	FS	FS	1:100	60°C	PS	PS
Alcohol Estearílico	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:10	60°C	FS	FS
Alcohol Cetílico	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:10	60°C	FS	FS
Ácido Cítrico	1:2	TA	FS	FS	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:10000	60°C	I	I
Metilparabeno	1:30	60°C	S	S	1:30	60°C	S	S	1:10000	60°C	I	I
Propilparabeno	1:30	60°C	S	S	1:30	60°C	S	S	1:10000	60°C	I	I
Citrato de Sodio	1:2	TA	FS	FS	1:2	TA	FS	FS	1:10000	60°C	I	I
Benzoato de Sodio	1:2	TA	FS	FS	1:30	60°C	S	S	1:10000	60°C	I	I
Propilenglicol	1:2	TA	FS	FS	////////////////////////////////////				1:1000	60°C	MPS	MPS
Vaselina Líquida	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:1000	60°C	MPS	MPS	////////////////////////////////////			
Vaselina Sólida	1:1000	60°C	MPS	MPS	1:1000	60°C	MPS	MPS	2	60°C	FS	FS

T° = Temperatura
 TA = Temperatura ambiente
 R = Resultado del ensayo
 FS = Fácilmente soluble
 S = Soluble
 MPS = Muy poco soluble
 PS = Poco soluble
 I = Insoluble
 ///// = No aplica

Tabla 18. Solubilidad entre excipientes candidatos

Fuente: USP33, 2010

Elaboración: El Autor

Al momento de realizar un estudio de preformulación, la investigación se orienta a la búsqueda de la mayor cantidad de información sobre las propiedades del compuesto que permitan diseñar de manera sistemática una formulación. Según Jiménez *et al.* 1994, propone que la solubilidad o proceso de disolución de un compuesto es complejo y se ve interferido por un sinnúmero de factores es por ello que sugiere que dentro de la extensa variedad de parámetros de solubilidad se tome en cuenta aquella que va en función del tiempo, y tal como lo muestra la **Gráfico 4**, el extracto de *Piper ecuadorensis* posee una mejor solubilidad en propilenglicol, ya que se solubiliza totalmente en un tiempo de 60 min a temperatura ambiente frente los 90 min en agua, además podemos denotar que el extracto es insoluble en glicerina y compuestos lipídicos como la vaselina líquida, lo que nos brinda la información necesaria para acoplar al principio activo con el propilenglicol a la hora de formular.

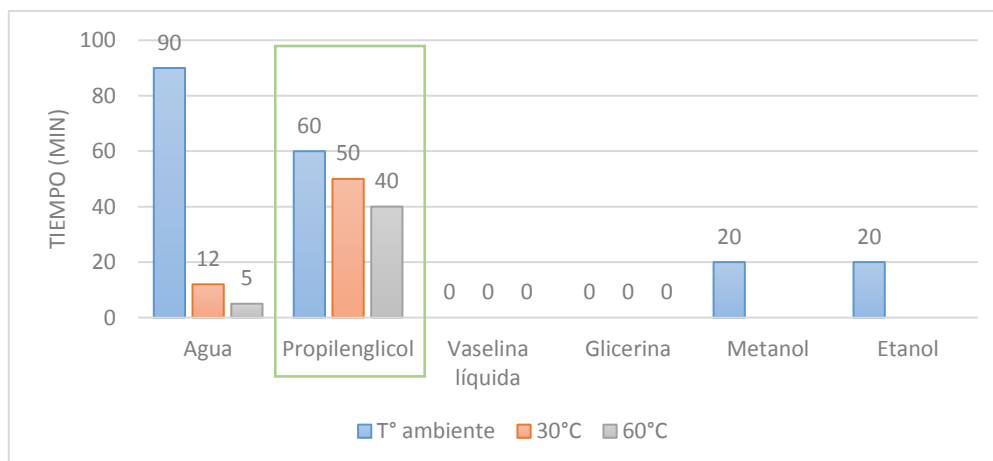


Gráfico 4. Prueba de solubilidad de excipientes/api

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

3.4.2. Estudio de compatibilidad del extracto etanólico – excipientes a través del diseño factorial 2³

Las estrategias que nos permiten tener una proyección son las técnicas experimentales, una de ellas es el diseño factorial a dos niveles que nos permite establecer la influencia sobre el resultado de las variables y sus interacciones; en la optimización este diseño de mezclas aplica la suma de las proporciones de los componentes a un 100% y la supuesta modificación de un porcentaje que afecta a otros componentes (Rojas, Tripaldi, Perez, & Quinteros, 2012). El desarrollo de un diseño experimental a la final permite estudiar el efecto que ocasiona la combinación de ciertas mezclas

sobre la concentración del principio activo, es decir la interacción existente entre todos los componentes que conforman la fórmula (Hernandez, Valdéz, Ledesma, & García, 2012).

La matriz resultante del análisis factorial 2^3 consistió en 8 mezclas con 3 repeticiones para cada una. La matriz del diseño factorial se detalla a continuación en la **Tabla 19** y las mezclas obtenidas se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 19. Matriz para el desarrollo de las mezclas

N° ENSAYO	FACTORES		
	A	B	C
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+
5	-	+	+
6	-	-	-
7	+	-	+
8	+	+	-

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Tabla 20. Mezclas obtenidas a partir diseño factorial 2^3

Materia Prima	%	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Alcohol Cetílico	8		*		*			*	*
Alcohol Estearílico	8	*		*		*	*		
Parabenos	0.2			*	*	*			*
Ácido Cítrico	0.2	*	*				*	*	
Citrato de Sodio	0.3	*			*	*		*	
Benzoato de Sodio	0.3		*	*			*		*
Cetomacrogol	8	*	*	*	*	*	*	*	*
Propilenglicol	30	*	*	*	*	*	*	*	*
Vaselina Líquida	15	*	*	*	*	*	*	*	*
Vaselina Sólida	8	*	*	*	*	*	*	*	*
Extracto <i>P. ecuadorensis</i>	1.5	*	*	*	*	*	*	*	*
Agua	c.s.p	*	*	*	*	*	*	*	*

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Las diferentes mezclas se sometieron a temperaturas como: T° ambiente (22±2 °C) y 40°C durante 20 días, transcurrido este tiempo se cuantificó el principio activo (pinocembrin) presente en cada mezcla mediante espectrofotometría UV con el objetivo de determinar la mezcla más estable para la formulación deseada. Los resultados de concentración del principio activo se detallan en la **Tabla 21**:

Tabla 21. Concentración y porcentaje de degradación de pinocembrin en crema (2mg/ml) después de almacenamiento a Temperatura ambiente y 40°C por 20 días

MUESTRA (2000 µg/ml)	Tiempo 0	20 días			
	TA*	TA		40 °C	
	Concentración µg/mL ($\bar{X}^{**} \pm DS^{***}$)	Concentración µg/mL ($\bar{X} \pm DS$)	%Degradación	Concentración µg/mL ($\bar{X} \pm DS$)	%Degradación
M1	1,9035 ± 0,047	1,5195 ± 0,014	20,2	1,3137 ± 0,047	31,0
M2	1,9005 ± 0,024	1,1631 ± 0,032	38,8	N/A	N/A
M3	1,8759 ± 0,005	1,1877 ± 0,023	36,7	1,2492 ± 0,005	33,4
M4	1,9220 ± 0,037	1,3352 ± 0,030	30,5	N/A	N/A
M5	1,9496 ± 0,028	1,1662 ± 0,028	40,2	1,1969 ± 0,023	38,6
M6	1,8820 ± 0,084	1,0955 ± 0,028	41,8	1,1539 ± 0,024	38,7
M7	1,9373 ± 0,080	1,2614 ± 0,023	34,9	N/A	N/A
M8	1,8636 ± 0,024	1,4796 ± 0,021	20,6	N/A	N/A
Ecuación de la recta	Y = 0,1085x+0,0158				
* TA = Temperatura Ambiente. ** \bar{X} = Media aritmética. *** DS = Desviación estándar. N/A = No aplica, mezclas floculadas en el proceso de almacenamiento.					

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Como se puede observar en la **Tabla 21**, después de 20 días de almacenamiento, la mezcla 1 presenta mayor concentración de pinocembrin (1,5195 ± 0,014 µg/mL) a temperatura ambiente con porcentaje de degradación del 20,2%, asimismo se puede notar que la mezcla 8 posee un valor significativo de concentración, siendo un valor de 1,4796 ± 0,021 µg/mL y porcentaje de degradación igual al 20,6%. En el caso de las muestras sometidas a 40°C, la mezcla 1 se mantiene con la mayor concentración de pinocembrin (1,3137 ± 0,047 µg/mL) y un porcentaje de degradación del 31,0%. En esta etapa de condiciones extremas no todas las mezclas lograron completar los días de evaluación de compatibilidad, siendo así que todas las mezclas que en su

formulación contenían alcohol cetílico floclaron a diferencia de las mezclas que contenían alcohol estearílico, estas últimas se mantuvieron en un porcentaje de degradación de 31,0 a 38,7%.

Minitab®18 es un software estadístico que nos permite determinar la significancia de los resultados, en este caso se trabajó con los porcentajes de degradación de cada una de las mezclas y de esta manera se determinó la significancia de cada factor y así mismo se propuso un modelo de fórmula que permita minimizar la degradación del principio activo.

El **Gráfico 5** muestra que en cuanto al aspecto reológico de las mezclas el alcohol cetílico presenta menor efecto al alcohol estearílico, asimismo entre los conservantes los parabenos poseen menor efecto ante el ácido cítrico y de igual forma el citrato de sodio frente al benzoato de sodio para el caso de reguladores de pH; indicando de esta manera que la empleabilidad de alcohol cetílico, parabenos y citrato de sodio podrían mejorar la estabilidad del producto a desarrollar.

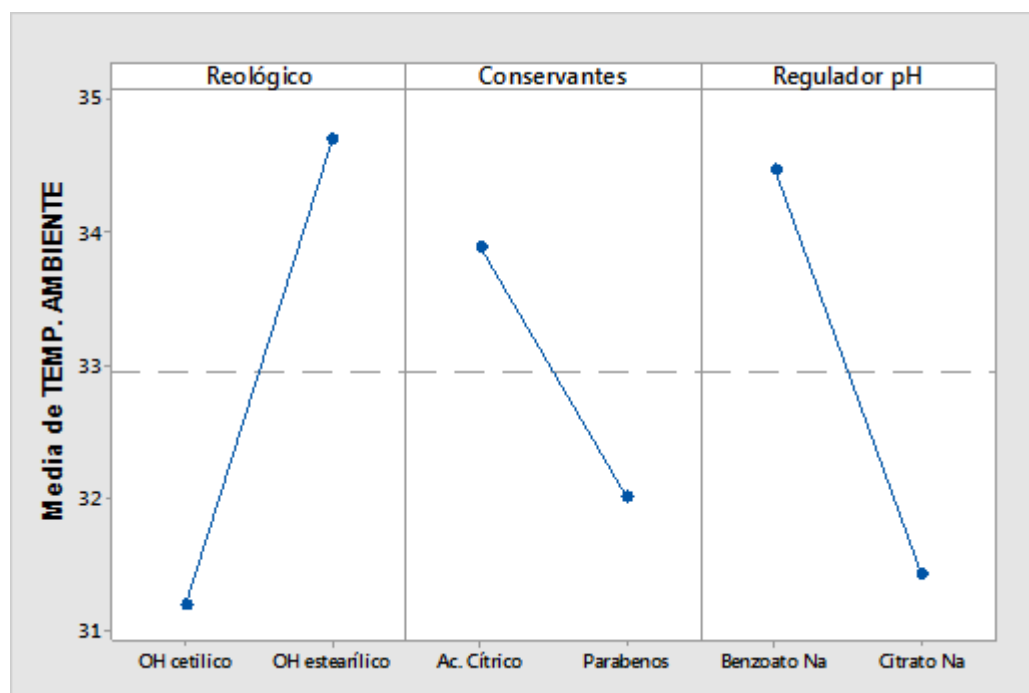


Gráfico 5. Efectos Principales (temperatura ambiente)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Además, se realizó un ANOVA (**Tabla 22**) para los efectos principales: A: Agente Reológico, B: Conservantes, C: Regulador de pH, y se determinó que no existen diferencias significativas entre estos efectos, con un valor de $p= 0,318$, $0,588$ y $0,383$, resultados que van por encima del valor normal de aceptación que es $p=0,05$.

Tabla 22. Resultado del Análisis de Varianza de los efectos principales (T°Ambiente)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	150,60	50,199	0,72	0,554
Lineal	3	150,60	50,199	0,72	0,554
A: Reológico	1	73,50	73,500	1,05	0,318
B: Conservantes	1	21,28	21,282	0,30	0,588
C: Regulador pH	1	55,82	55,815	0,80	0,383
Error	20	1402,58	70,129		
Falta de ajuste	4	1358,70	339,676	123,86	0,000
Error puro	16	43,88	2,743		
Total	23	1553,18			

Fuente: El Autor

Elaboración: El autor

Las interacciones dobles consisten en la relación existente entre los efectos principales, en este caso la efecto que produce la combinación de: Agente Reológico*Conservante; Agente Reológico*Regulador de pH y Conservantes*Regulador de pH. Para las interacciones dobles nos basamos en los resultados obtenidos de las medias ajustadas de la siguiente gráfica:

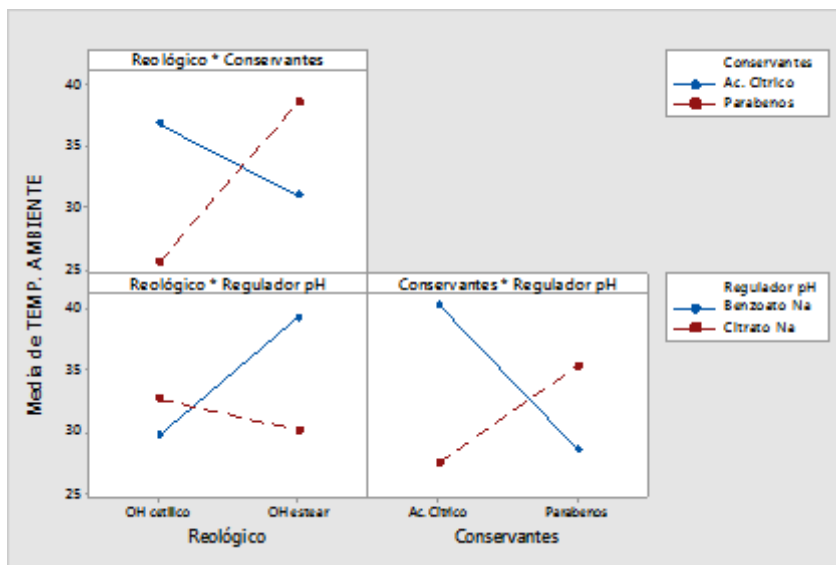


Gráfico 6. Interacciones dobles (temperatura ambiente)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

En vista a los resultados obtenidos, se realizó un ANOVA (**Tabla 23**) (valor de $p = 0,05$) para determinar si estadísticamente las interacciones eran o no significativas entre sí y poder determinar la combinación que favorezca la minimización de la degradación del API en el producto. Para cada una de las interacciones dobles se obtuvo lo siguiente:

Tabla 23. Resultados del ANOVA de las interacciones dobles Respuesta vs. Tratamiento.

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Agente Reológico / Regulador pH	TRAT	2	29,95	14,97	0,19	0,826
	Error	15	1163,20	77,55		
	Total	17	1193,14			
Conservantes / Regulador pH	TRAT	2	217,2	108,62	1,84	0,193
	Error	15	885,5	59,03		
	Total	17	1102,7			
Agente Reológico / Conservantes	TRAT	1	86,94	86,94	1,02	0,337
	Error	10	856,16	85,62		
	Total	11	943,10			

Fuente: El Autor

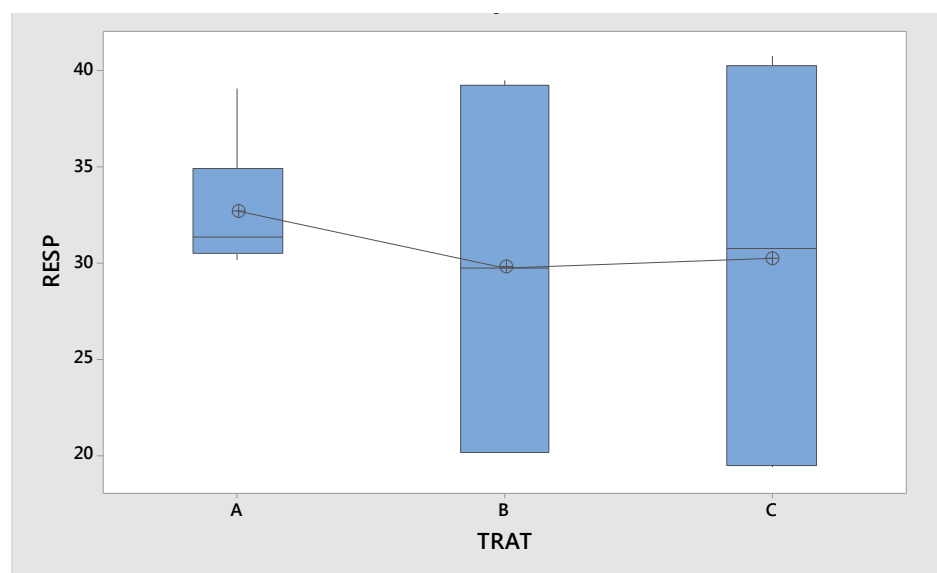
Elaboración: El Autor

Tabla 24. Comparación en parejas de Tukey de las interacciones dobles (confianza de 95%)

	TRAT	N	Media	Agrupación
Agente Reológico / Regulador pH	A	6	32,67	A
	C	6	30,18	A
	B	6	29,73	A
Conservantes / Regulador pH	C	6	35,37	A
	B	6	28,65	A
	A	6	27,48	A
Agente Reológico / Conservantes	B	6	30,97	A
	A	6	25,58	A

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor



A: Agente Reológico
 B: Conservantes
 C: Regulador de pH

Gráfico 7. Grafica de Caja. Respuesta vs. Tratamiento

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

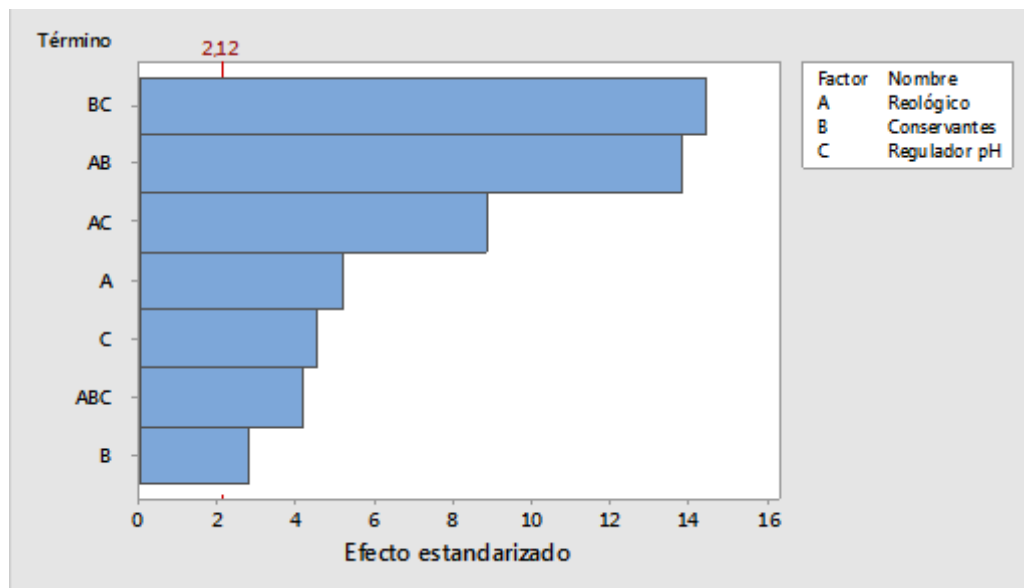


Gráfico 8. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados (T°ambiente, $\alpha=0,05$)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

El resultado de las interacciones dobles que comprenden al sistema reológico-regulador de pH, conservantes-regulador de pH y reológico-conservantes se demuestra en la tabla 23 que no existen diferencias significativas con un valor de $p= 0,826, 0,193$ y $0,337$, respectivamente. Asimismo se realizó una prueba Tukey para cada uno de los casos y contrastar la interacción entre los tratamientos y los efectos, indicando que no existen diferencias significativas entre los factores y estadísticamente todos son iguales como se puede observar en la Tabla 24. Finalmente se realizó una gráfica de caja (

Gráfico 7) y prueba de Pareto (**Gráfico 8**), demostrando así que cada factor es estadísticamente igual.

Las muestras sometidas a condiciones de $40^{\circ}\text{C} + 70\%$ humedad tal y como podemos observar en el **Gráfico 9**, la acción del alcohol estearílico es bastante significativa en relación al alcohol cetílico, sin embargo en el caso de los conservantes y reguladores de pH, no existen diferencias significativas siendo considerados como iguales.

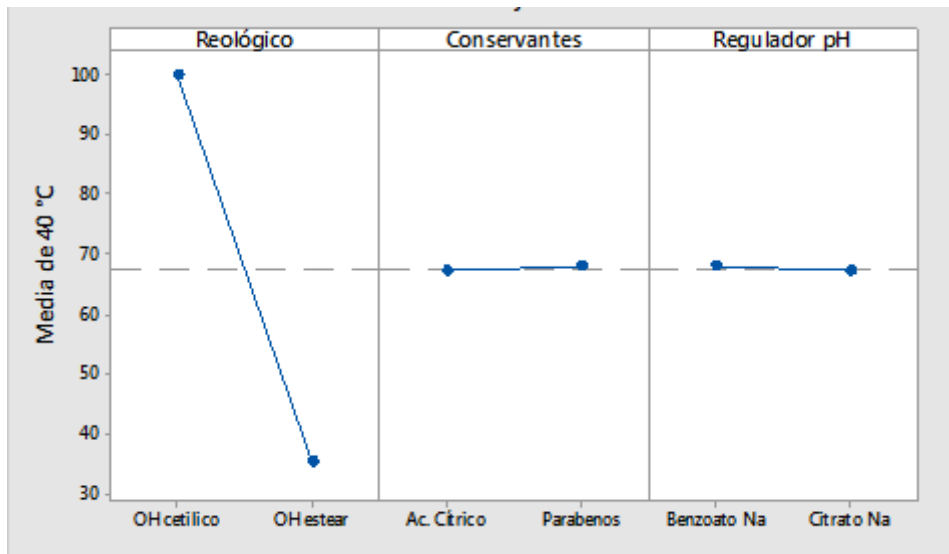


Gráfico 9. Efectos principales (40°C)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Se realizó un ANOVA (**Tabla 25**) para los efectos principales y determinar diferencias significativas, demostrando que si existen, entre los agentes reológicos con un valor de $p = 0,000$, mientras que conservantes y reguladores de pH no presentaron diferencias significativas con un valor de $p = 0,052$ y $0,046$, respectivamente.

En las interacciones dobles (40°C) a través de una prueba de ANOVA (**Tabla 25**) se consideró como significativa la relación existente entre los conservantes y reguladores de pH, mientras que el resto de interacciones se mantuvieron iguales.

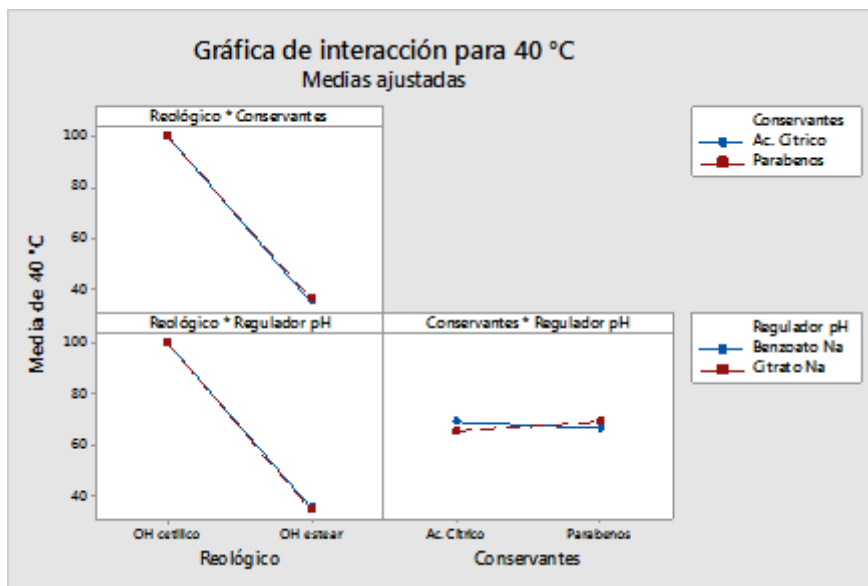


Gráfico 10. Interacciones dobles 40°C (ajuste de medias)

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Tabla 25. Regresión factorial 40°C vs. Factores, resultados de ANOVA.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	25150,5	3592,9	7544,20	0,000
Lineal	3	25023,9	8341,3	17514,54	0,000
Reológico	1	25019,6	25019,6	52534,56	0,000
Conservantes	1	2,1	2,1	4,41	0,052
Regulador pH	1	2,2	2,2	4,66	0,046
Interacciones de 2 términos	3	65,4	21,8	45,80	0,000
Reológico*Conservantes	1	2,1	2,1	4,41	0,052
Reológico*Regulador pH	1	2,2	2,2	4,66	0,046
Conservantes*Regulador pH	1	61,1	61,1	128,34	0,000
Interacciones de 3 términos	1	61,1	61,1	128,34	0,000
Reológico*Conservantes*Regulador pH	1	61,1	61,1	128,34	0,000
Error	16	7,6	0,5		
Total	23	25158,1			

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

Concluyendo que las interacciones dobles de las dos temperaturas (**Gráfico 10**) nos permiten determinar los factores idóneos para el desarrollo del producto siendo así que para temperatura

ambiente el alcohol cetílico, citrato de sodio y parabenos resultan ser los mejores candidatos; sin embargo, en base a los resultados estadísticos las mezclas que fueron sometidas a temperatura de 40°C indican que el alcohol estearílico, ácido cítrico, parabenos, benzoato de sodio y citrato de sodio pueden llegar a ser los más idóneos al momento de desarrollar el producto.

Finalmente, después de los 20 días de almacenamiento las mezclas que contenían alcohol cetílico presentaron floculación a diferencia de las realizadas con alcohol estearílico, y en base a los resultados obtenidos de los efectos individuales de las dos temperaturas en donde estadísticamente son iguales todos sus factores, se determinó que el alcohol estearílico (agente reológico), parabenos (conservantes) y citrato de sodio (regulador de pH) resultan ser los más aptos para conseguir la robustez de la fórmula y evitar de mejor manera la degradación del API.

3.5. Formulación

Tomando como base la fórmula obtenida a partir del diseño factorial, se desarrolló el prototipo utilizando el extracto de *Piper ecuadorensis* 1,5% (Tabla 26) en el laboratorio de Productos Naturales y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL.

Tabla 26. Fórmula porcentual, unitaria y de manufactura del prototipo de *Piper ecuadorensis* 1,5%

FUNCIÓN	COMPONENTES	%p/p	FÓRMULA UNITARIA (g)	FÓRMULA MANUFACTURA (g)
API	Extracto de <i>Piper ecuadorensis</i>	1,5	0,75	15
Emoliente	Propilenglicol	30	15	300
Emulgente	Cetomacrogol	8	4	80
Agente Reológico	Alcohol Estearílico	8	4	80
Conservante	Parabenos	0,2	0,1	2
Regulador de pH	Citrato de Sodio	0,3	0,15	3
Grasa Mineral	Vaselina Líquida	15	7,5	150
Grasa Mineral	Vaselina Sólida	8	4	80
	Agua	c.s	c.s	c.s
	TOTAL	100	50	1000

Fuente: El Autor

Elaboración: El Autor

3.5.1. Control de calidad de producto terminado.

3.5.1.1. Evaluación física, química y microbiológica.

Desde el punto de vista organoléptico, la crema presentó un olor levemente aromático, color TAN #C9A080 (R: 201; G: 160; B: 128)(Figura 17), homogénea sin separación de capas ni presencia de partículas, grumos o grasa, suave y lavable, acorde a los límites de aceptación de la USP33, 2010 para productos semisólidos tópicos, en la cual se acepta una tonalidad de color dependiendo del fabricante, sin embargo, se establece que el producto como tal debe ser inodora, homogénea, suave y lavable.



Figura 17. Coloración del producto terminado

Fuente: Chir.ag, 2017

Elaboración: El Autor

El prototipo desarrollado presentó un pH promedio de 5.4 ± 0.1 , extensibilidad de 1364 ± 51.742 , aspecto microscópico fue homogéneo, concentración de API de $1,9035 \pm 0,047$ y ausencia de crecimiento bacteriano y fúngico. Por lo tanto, el producto final cumple con los parámetros físicos de aceptación, según USP33 (Tabla 27).

Tabla 27. Evaluación física, química y microbiológica del producto terminado

	ENSAYO	RESULTADO	USP33
CONTROL FÍSICO	pH	5.4 ± 0.1	$5.5 \pm 0,1$
	Extensibilidad	1364 ± 51.742	1320.6 ± 103.5
	Viscosidad	8.100 ± 0.1	4.000 – 18.000 cps
	Microscopía	Homogéneo	Homogéneo
CONTROL QUÍMICO	Valoración API	$1,9035 \pm 0,047$	-
CONTROL MICROBIOLÓGICO	Aerobios mesófilos	Ausencia	Máx. 100 UFC/g
	Escherichia coli	Ausencia	Ausencia
	Staphylococcus aureus	Ausencia	Ausencia
	Pseudomona aeruginosa	Ausencia	Ausencia
	Hongos filamentosos y levaduras	Ausencia	Máx. 100 UFC/g

Fuente: USP33, 2010

Elaboración: El Autor

CONCLUSIONES

Se evidenció a través de experimentación que el fitocosmético a base del extracto etanólico de *Piper ecuadorese* posee actividad antifúngica de acuerdo a los resultados obtenidos tras las pruebas de CMI del extracto.

Piper ecuadorese tiene un mayor rendimiento cuando se trabaja con droga vegetal seca de tamaño igual a 850 μm .

Los resultados del análisis físico – químico de la droga cruda, extracto y producto final se encuentra dentro de los límites permitidos por la USP33, indicando de esta manera el cumplimiento de las especificaciones de calidad.

Los resultados microbiológicos de la droga, extracto y producto final se encuentran dentro de los límites permitidos por la USP33 y bibliografía, indicando de esta manera el cumplimiento de las especificaciones de calidad.

En el extracto etanólico existe mayor proporción de metabolitos como: flavonoides, alcaloides y quinonas, al igual que otros compuestos en menos cantidad como: triterpenos, esteroides, catequinas, fenoles y taninos, según lo obtenido tras el desarrollo de las diferentes marchas fitoquímicas.

Los ensayos de solubilidad permitieron facilitar el proceso de desarrollo de la formulación, dando una pauta en la mezcla de excipientes y solubilidad del principio activo.

A través de la técnica espectrofotométrica se conoce que en 1g de extracto existe 47,58mg de pinocembrin.

La mezcla con menos porcentaje de degradación fue la desarrollada a base de Alcohol estearílico como agente reológico, Ácido cítrico como conservante y Citrato de sodio como regulador de pH.

RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar con estudios de HPLC para conocer con mayor precisión la concentración de analito.

Realizar pruebas de toxicidad del extracto vegetal y del producto final.

Desarrollar pruebas *in vivo* del preparado antifúngico con el fin de validar el fitocosmético

Continuar con estudios de estabilidad del producto a corto y largo plazo para determinar la vida útil del preparado.

Crear nuevas fórmulas farmacéuticas u otras combinaciones, empleando el extracto vegetal de *Piper ecuadorensis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z., Merino, B., & Gutierrez, M. (2013). Principales familias de árboles, arbustos y hierbas del sur del Ecuador. Loja: Universidad Nacional de Loja.
- Allen, L. V. (2010). *Dosage Form Design: Pharmaceutical and Formulation Considerations. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems.*
- Aragadvay, S. (2009). *Elaboracion y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (Baccharis latifolia) y hierbamora (solanum nigrum).* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/216/1/56T00190.pdf>
- ARCSA. (2017). Especificaciones fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas para los productos cosméticos. Retrieved October 25, 2017, from <http://www.controlsanitario.gob.ec/certificado-de-buenas-practicas-de-manufactura-para-productos-cosmeticos-productos-de-higiene-domestica-productos-absorbentes-de-higiene-personal/>
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., & Macía, M. (2008). Enciclopedia De Plantas Útiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, 1, 1–3.
- Bisset, N. (1994). Herbal drug and phytopharmaceutical. Medpharm Scientific Publishers.
- Bucay, L. (2009). *Estudio Farmacognóstico y Actividad Antimicrobiana de la Violetilla (hybanthus parviflorus).* Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Cabrera, L. (2014). *Evaluación Del Contenido De Alcaloides, Flavonoides, Taninos Y Aceites Esenciales En Tres Estados De Maduración Y Recolección De La Moringa (Moringa Oleífera).* Universidad Técnica de Machala.
- Calvopiña, G. (2010). Determination of the antibacterial activity of the leaves of Kalanchoe pinnata (Siempreviva). Universidad Técnica Cotopaxi. Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/869/1/T-UTC-1207.pdf>
- Carrión, A., & García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica. Universidad de Cuenca.
- Castro, L., & González, L. (1995). Micosis en el Hospital Universitario del Valle, 1980-1992. *Colombia Médica*, 26, 150–153.
- Cerón, C. (2008). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 285–293. Retrieved from <c:%5CUsers%5CUusuario%5CDocuments%5CBibliografia Etnobotanica%5CCer?nMart?nez. 2006.Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos.pdf>

- CFSPH. (2005). Dermatofitosis. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/dermatofitosis.pdf>
- CLSI. (2002). Método M38-A.
- Cruz, P. (2009). *Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de Manzanilla (Matricaria chamomilla), Matico (Aristiguetia glutinosa) y Marco (Ambrosia arborescens) para Neo-Fármaco. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/1468/1/34T00246.pdf>
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L., & Salazar, J. (2008). Usos Medicinales de las Plantas. In *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* (pp. 105–114). Herbario QCA & Herbario AAU.
- Estrada, S. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de Romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris).* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Fauli, C., & Trillo, I. (1993). TRATADO DE FARMACIA GALÉNICA (Primera ed). Madrid.
- Fernández, E. (2003). Control de calidad de fórmulas dermatológicas. Retrieved from <http://www.elsevier.es>
- Flores, E., Jiménez, A., Ravelo, Á., 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.
- Flores, P. (2015). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Piper ecuatorense del cantón Saraguro.* Universidad Técnica Particular de Loja.
- Fournet, A., & Perrois, L. (1995). Des plantes contre la leishmaniose. *ORSTOM Actualités*, 2–7.
- García, E. (2001). Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Universitat de Barcelona.
- García, F. (2014). Optimization of the manufacturing process of a hand cream. Universidad Autónoma de México.
- Hernandez, Y., Valdéz, G., Ledesma, M., & García, E. (2012). PROCEDURES FOR THE CONTINUOUS IMPROVEMENT OF THE CREAM CHEESE NELA. Universidad de Sancti Spíritus.
- INSAPU. (2008). PROCEDIMIENTO DE RECuento MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS NORMA ISO7954. Retrieved from http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-031.pdf

- Jiménez, F., Mora, C., & Luengas, P. (1994). Determinación de la solubilidad en función del tiempo de equilibrio y solubilidad estándar para algunas muestras de Metronidazol. *Revista Colombia de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, (22), (22)13-21. Retrieved from <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V22P13-20.pdf>
- Larrondo, R., González, A., & Hernández, L. (2001). Micosis superficiales. Dermatofitosis. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 17(6), 559–564.
- Larypoor, M., Akhavansepahy, A., Rahimifard, N., & Rashedi, H. (2009). Antidermatophyte Activity of the Essential oil of *Hypericum perforatum* of North of Iran. *Journal of Medical Plants*, 8(31), 110–117.
- Leon, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*.
- Lieberman, H., Lachman, L., & Schwartz, J. (1989). *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. Little 2007 +Commentary. (n.d.).
- Lozano, M., Córdoba, D., & Córdoba, M. (2012). *Manual de Tecnología Farmacéutica*. España: Elsevier.
- Malagón, O., & Ojeda, S. (2012). *Estandarización del extracto etanólico de Piper ecuadoreense y validación de un método analítico para la elaboración del fitofármaco*. Loja.
- Martínez, A., Valencia, G. A., Jiménez, N., Mesa, M., & Galeano, E. (2008). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacología y Fitoquímica. In *Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacología y Fitoquímica* (pp. 1–96). Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia.
- Medina, M. (2012). Flavonoides Aislados De Propóleos Chilenos Y Bioactividad. Universidad Austral de Chile. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
- Miranda, C. (2002). *Farmacognosia y Productos Naturales*. Cuba.
- Montaño, L. (2011). *Desarrollo de un comprimido de carbamazepina con matriz hidrofílica mediante compresión directa*. ESPOCH.
- Mora, V. (2014). Elaboration of Anti-aging Cosmetic Cream based on Curcuma Longa and its Physical-Chemical Characteristics and Sensory analysis. Universidad de Guayaquil.
- Muzo, A. (2016). *Elaboración de una forma farmacéutica para disminuir niveles de colesterol en sangre a partir del extracto de hojas de la biblia, planta nativa del centro cultural Uni- Shu de la comuna chiguilpe de Santo Domingo de los Tsáchilas*. Universidad Regional Autónoma de los Andes.
- Murdock Company. (2006). U.S.A. Standard Testing Seives. USA.

- Navarro, V., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M., Zepeda, G., & Rojas, M. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 85–88. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00114-4](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00114-4)
- Oliveira, M., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *Revista de Ciencia Y Tecnología de América*, 453–459. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1373833>
- OMS. (1998). Informe sobre la salud en el mundo 1998 - La vida en el siglo XXI. Retrieved from <http://www.who.int/whr/1998/es/>
- Ortiz, S. (2015). *Elaboración de una Crema Antioxidante a partir de Productos Naturales*. Universidad Veracruzana. Retrieved from <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/40214/1/ortizriverasandra.pdf>
- Palacios, D. (2009). *Aplicación de métodos autobiográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Piper sp.(Matico), Lepechinia mutica Benth (Turuyante), Niphogeton d.* Universidad Técnica Particular de Loja.
- Pasaca, M. (2016). *Aislamiento y caracterización de hongos a partir de sedimentos marinos con fines de bioprospección*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Pérez, M., Rodríguez, Y., & Suárez, Y. (2014). Validation of the ultraviolet spectrophotometry method for the quality control of ciprofloxacin chlorhydrate in Ciprecu tablets. *Rev.Cub.Pharm*, 48(2), 199–212.
- Picazo, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España. Retrieved from http://coesant-seimc.org/documents/MétodosBásicos_SensibilidadAntibióticos.pdf
- Proaño, J. (2013). *COMPROBACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE UNA CREMA A BASE DE ROMERO (Rosmarinusofficinalis), MATICO (Piperaduncum) Y COLA DE CABALLO (Equisetum arvense) EN HERIDAS INDUCIDAS EN RATONES (Mus musculus)*. Escuela Politécnica de Chinborazo.
- Ramirez, J., Cartuche, L., Morocho, V., Aguilar, S., & Malagon, O. (2013). Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from Piper ecuadorensis from Ecuador. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(2), 370–373. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000012>
- Rivas, L. (2015). Trichophyton mentagrophytes. *Revista Chilena de Infectología*, 32(3), 319–320.
- Rivera, G. (2010). *Elaboración de un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie Piper ecuadorensis (Matico), Loja - Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja.

- Rodríguez, B. (2016). Trichophyton spp. Retrieved from <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/28/trichophyton-spp/>
- Rodas, E., López, K., & Tul, Y. (2010). *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos frutales como alternativa a los antioxidantes sintéticos en preparaciones cosméticas tipo emulsión*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2976.pdf
- Rojas, C., Tripaldi, P., Pérez, A., & Quinteros, P. (2012). Experimental design and multicriteria decision making methods for the optimization of ice cream composition. *Scientia Agropecuaria*, 51–60.
- Ruiz, A. (2014). Development of a manual for the optimization of processes of a pharmaceutical plant. México.
- Salazar, R. (2001). *Gestión de la calidad en el desarrollo y fabricación industrial de medicamentos* (Primera ed). España: Glatt Laborotecnic S.A.
- SANA. (n.d.). Norma ISO 4833. Valladolid. Retrieved from [http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Aerobios mesofilos ISO 4833.pdf](http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Aerobios%20mesofilos%20ISO%204833.pdf)
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Primera ed). CYTED.
- Sodiro, L. (1898). *Anales de la Universidad Central del Ecuador. Universidad Central del Ecuador* (Vol. 18). Retrieved from <http://www.botanicus.org/page/1218046>
- Tene, V., Malagón, O., Vita, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
- Trillo, F. (1993). *Tratado de Farmacia Galénica* (Primera ed). Madrid.
- Ulloa, C., & Moller, P. (2009). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Retrieved from http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=201
- USP33. (2010). THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL (33 edición). USA.
- Vidaurre, M., Querevalu, L., De los Rios, E., & Ruiz, S. (2007). Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Rev. Med. Vallejana*, 4(2), 121–131.
- Villalba, E. (2013). *ELABORACION Y CONTROL DE CALIDAD DE UN GEL ASTRINGENTE A BASE DE Costus spicatus, Ficus carica, Salvia officinalis*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/2926/1/56T00418.pdf>
- Yambay, P. (2013). *“Elaboración y control de calidad de una crema a base de los extractos hidroalcohólicos de Berro (Nasturtium officinale) Y LLantèn (Plantago major) y*

comprobación de su actividad cicatrizante en heridas inducidas en ratones.” ESPOCH.

Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2473/1/56T00343.pdf>

Zhang, X. (2000). Medicina Tradicional: Definiciones. Retrieved from

http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

ANEXOS



PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 1 de 12

1. OBJETIVO

Proponer una guía para el tratamiento de material vegetal así como también de los puntos importantes dentro de la caracterización de la misma; la que será empleada para la elaboración de cualesquier fórmula farmacéutica que contenga como principio activo algún extracto de planta.

2. ALCANCE

Todo el personal que empiece con un proceso de obtención de principio activo a través del extracto conseguido de cualesquier planta.

3. RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este procedimiento operativo estándar (POE) recae en todo el personal que participa en el desarrollo de investigaciones, proyectos de vinculación y elaboración de formulaciones farmacéuticas (personal propio del laboratorio, docentes, alumnos en prácticas, becarios y tesistas) del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.

4. FRECUENCIA

Tomar como referencia el presente documento cada vez que se requiera de un conocimiento escrito en cuanto a preparación y caracterización de material vegetal previo estudio.

5. DOCUMENTO DE REFERENCIA

- OSORIO, E. (2009) Aspectos Básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. Colombia.
- CARRIÓN, A. & GARCÍA, C. (2010) Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica. Universidad de Cuenca. Ecuador.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 2 de 12

6. FUNDAMENTO TEORICO

Farmacognosia (derivado de las palabras griegas: *phármakon* y *gnosis*, que significan “el conocimiento de un fármaco o medicamento”); la farmacognosia es la ciencia que se encarga de estudiar a las drogas y principios activos que provienen de la naturaleza, tales como, vegetales, hongos, bacterias y animales; asimismo se encarga del estudio de las sustancias con propiedades tóxicas y también de interés farmacéutico.

Las drogas vegetales se obtienen de plantas medicinales, estas pueden ser silvestres como cultivadas. La recolección de las plantas implica de una planificación y un control, de esta manera evitamos caer en la recolección indiscriminada de material que puede llegar a afectar la integridad de la especie vegetal de la cual partiremos para nuestros estudios.

Una vez definido el tipo planta con la que se trabajará (silvestre o cultivable), se procede a recolectar, tomando en cuenta las características que presente la especie, es decir se la puede desarrollar de manera manual o mecanizada.

Todo vegetal al ser arrancado de su medio sufre cambios a nivel metabólico, lo que da lugar a una serie de reacción y fenómenos que degradarán la droga vegetal recolectada, es por ello que el transporte oportuno del material vegetal una vez obtenido es un paso importante a la hora de realizar cualquier estudio con plantas. Las causas de alteración pueden ser internas y externas, en las internas encontramos las reacciones enzimáticas, autooxidaciones y reacciones entre diferentes componentes de la droga, en las causas externas están el calor, humedad, radiaciones, microorganismos, insectos, etc.

La inhibición enzimática se traduce como un proceso reversible y consiste en la eliminación del agua de la droga vegetal hasta llegar a valores inferiores al 10%. Disminuyendo la cantidad de agua las enzimas detienen su actividad, de esta manera se conserva el material vegetal. La desecación se realiza de manera lenta cuando se requiere estimular la acción enzimática, o puede ser rápida cuando se quiere evitar la misma. El proceso de desecación lo podemos dividir en:

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 3 de 12

- *Desecación natural:* es un proceso lento, se pueden emplear cobertizos, bandejas, telas metálicas galvanizadas, papeles extendidos sobre un armazón de madera, etc.
- *Desecación artificial:* generalmente es el más adecuado, se realiza en poco tiempo; permite un control de temperatura, humedad y tiempo. Para este tipo de desecación se pueden emplear túneles o torres de secado, estufas al vacío, etc. Como regla general, las hojas, sumidades y flores deben secarse entre 20 y 40 ° C y las cortezas y raíces de 30 a 65 ° C.

Para el almacenamiento de las drogas vegetales se requiere de un lugar fresco y seco. Se debe de tener en cuenta la humedad de la droga y la humedad ambiental, para controlar esto se recomienda colocar las drogas en recipientes o envases herméticos con un agente deshidratante. Las drogas deben de ser rotuladas para su fácil identificación.

7. DESCRIPCIÓN

1. Identificación del lugar de recolección de la planta.
2. Reconocer la parte de la planta a emplear al estudio (flores, fruto, hojas, tallos, raíces, etc)
3. Recolección de material vegetal (hojas).
4. Traslado del material vegetal al laboratorio.
5. Selección de las hojas (identificar las que se encuentre en buenas condiciones y las que no, desecharlas).
6. Lavar el material vegetal con abundante agua.
7. Sumergir las hojas en un tanque de agua con una solución de NaClO al 10% por 10 min.
8. Lavar el material vegetal con abundante agua nuevamente.
9. Escurrir las hojas aproximadamente 60 min.
10. Trasladar las hojas al cuarto de secado (Condiciones: 40 ± 3 °C por 8 días)
11. Esparcir las hojas uniformemente sobre las bandejas ubicadas en el cuarto de secado.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 4 de 12

7.1. Determinación de Humedad

- a) Dejar los pesa filtros en una estufa a 100 °C por 3 horas, dejar enfriar en desecador y pesar.
- b) Pesar 2 g de planta fresca o seca y colocarla en el pesa filtros.
- c) Transportar los pesa filtros a una estufa a 100 °C por 60 min.
- d) Retirar los pesa filtros, dejar enfriar en un desecador y pesar.
- e) Repetir el procedo c) y d) hasta obtener valores constantes.
- f) Aplicar la siguiente fórmula para conocer el valor de humedad:

FÓRMULA DE PORCENTAJE DE HUMEDAD

$$\%humedad = (m_1 - m_2) \frac{100}{m_1 - m_0}$$

m_0 = peso crisol vacío
 m_1 = peso muestra antes del secado
 m_2 = peso muestra después de secado

7.2. Determinación de Cenizas Totales

- a) Pesar 2 g de planta tamizada y colocar en un crisol previamente preparado y tarado.
- b) Calentar en una cocina hasta carbonizar la muestra, e incinerar en un horno mufla a 750 °C por 2 horas.
- c) Enfriar los crisoles en un desecador a temperatura ambiente y se pesar.
- d) Incinerar las muestras por 30 min, enfriar y pesar.
- e) Repetir el proceso anterior hasta obtener masa constante.
- f) Aplicar la fórmula para conocer el valor de cenizas totales.

El residuo presenta trazas de carbón, es por ello que se le añade unas gotas de ácido nítrico 10 mg/100 mL y calentar hasta que se evapore el solvente, al enfriar el crisol se aprecia un residuo de color blanquecino.

FÓRMULA DE PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES

$$\%Cenizas = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

m_0 = peso crisol vacío
 m_1 = peso cápsula + muestra antes del secado
 m_2 = peso muestra después de secado

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 5 de 12

7.3. Determinación de Cenizas Solubles en agua

- a) De las cenizas totales obtenidas anteriormente se añade 15 mL de agua destilada, se tapa el crisol y se hierve por 5 minutos.
- b) Filtrar la solución a través de papel filtro, el residuo del papel filtro colocarlo en el crisol inicial y carbonizar en un quemador e incinerar a 750 °C por 2 horas, dejar enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
- c) Aplicar la fórmula para conocer el valor de cenizas solubles en agua

FÓRMULA DE PORCENTAJE DE CENIZAS SOLUBLES

$$\%Cenizas = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 = peso crisol vacío
 m_1 = peso cápsula + muestra
 m_2 = peso cápsula + cenizas
 m_3 = peso cápsula + cenizas solubles

7.4. Determinación de Cenizas Insolubles en HCl

- a) De las cenizas totales obtenidas, se añade 15 mL de HCl al 10%, se tapa el crisol y hervir por 5 min.
- b) Filtrar la solución a través de papel filtro, lavar el residuo del crisol con agua caliente.
- c) A esta solución añadir 2 gotas de AgNO₃ 0.1 mol/L, y se repitió este procedimiento hasta que no se presentaron cloruros.
- d) El papel filtro que contenía el residuo se coloca al crisol inicial, se carboniza empleando un quemador y se incinera en un horno mufla a 750 °C por 2 horas.
- d) Colocar en un desecador hasta que el crisol llegue a temperatura ambiente, y pesar.
- e) Aplicar la fórmula para conocer el valor de cenizas solubles en agua

FÓRMULA DE PORCENTAJE DE CENIZAS INSOLUBLES

$$\%Cenizas = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

m_0 = peso crisol vacío
 m_1 = peso cápsula + muestra
 m_2 = peso cápsula + cenizas en HCl

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 6 de 12

7.5. Determinación de Sustancias Solubles

- a) Pesar 5 g de planta tamizada y colocar en un Erlenmeyer de 250 mL, añadir 100 mL de agua, agitar durante 6 horas, reposar por 24 horas.
- b) Agitar durante 30 minutos, reposar 30 minutos, filtrar.
- c) Tomar una alícuota de 20 mL y transferir a una cápsula previamente preparada y tarada.
- d) Evaporar el líquido a través de baño María.
- e) Trasladar la cápsula a una estufa a 105 °C por 3 horas.
- f) Enfriar hasta que la capsula llegue a temperatura ambiente en un desecador, pesar.
- g) Aplicar la fórmula para conocer el valor de cenizas solubles en agua

FÓRMULA DE PORCENTAJE DE SUSTANCIAS SOLUBLES

$$\%Ss = \frac{R \times 500 \times 100}{M(100 - h)} \times 100$$

%Ss = % Sustancias Solubles

h = % humedad

R = Residuo de la muestra

M = Peso de la muestra

100 y 500 = Factores matemáticos

7.6. Análisis microbiológico

Este apartado se detalla en el POE: Análisis microbiológico de preparados semisólidos

8. RECOMENDACIONES

1. La recolección de la parte de la planta a estudiar debe de ser minuciosa, de esta manera evitamos comprometer la vida de la especie en caso de ser esta de tipo silvestre.
2. El material vegetal recolectado, debe ser trasladado lo más pronto posible para evitar los posibles cambios físicos, químicos, metabólicos, entre otros, de la planta.
3. El lavado debe de ser lo más rápido posible para evitar que el agua pueda ocasionar alguna reacción de la planta.
4. Evitar que la cámara de secado se apague, debido a que existen plantas que ganan humedad rápidamente lo que ocasiona que se vea alterada la composición de estas.

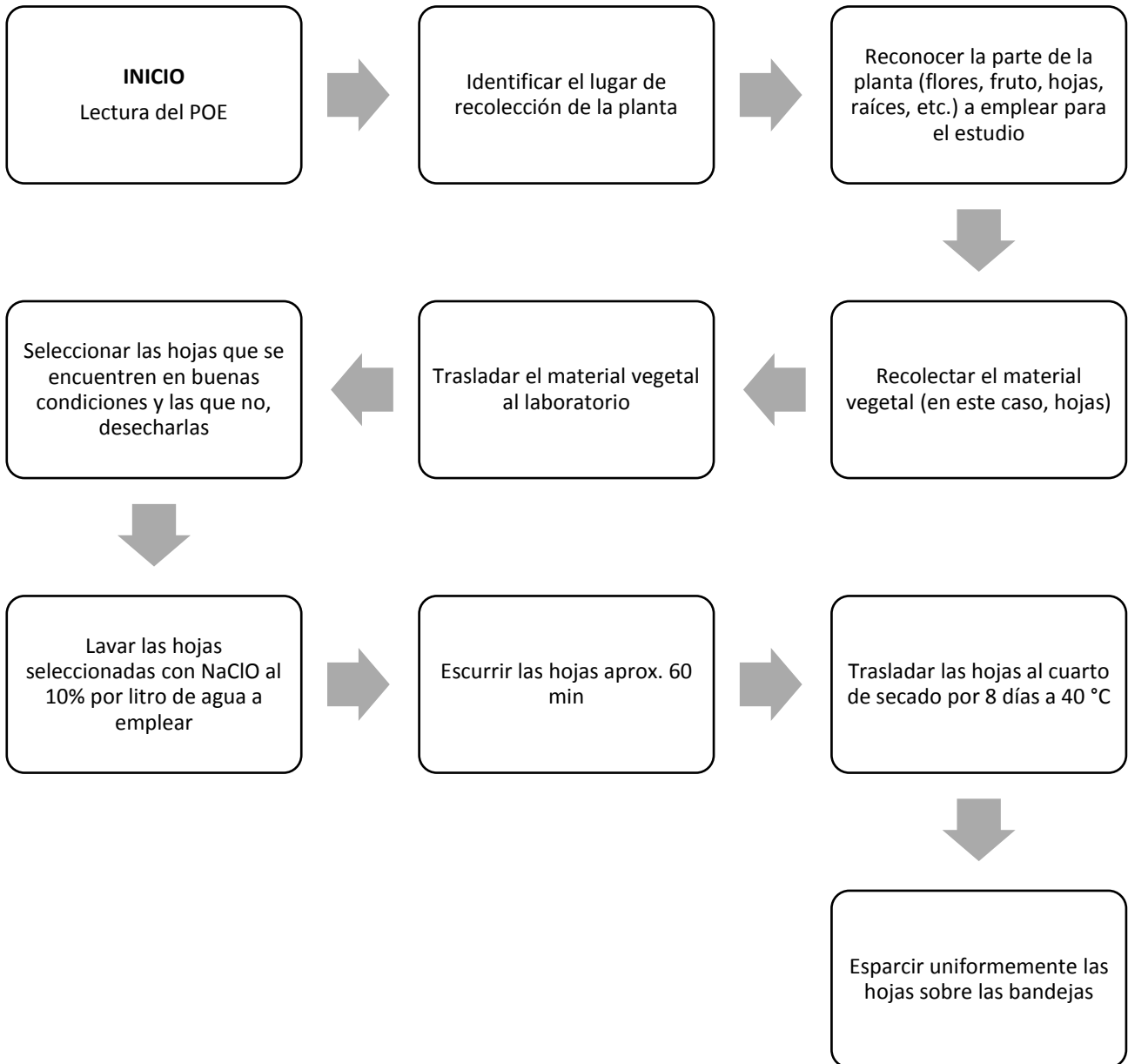
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 7 de 12

**DIAGRAMA DE FLUJO
PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL**



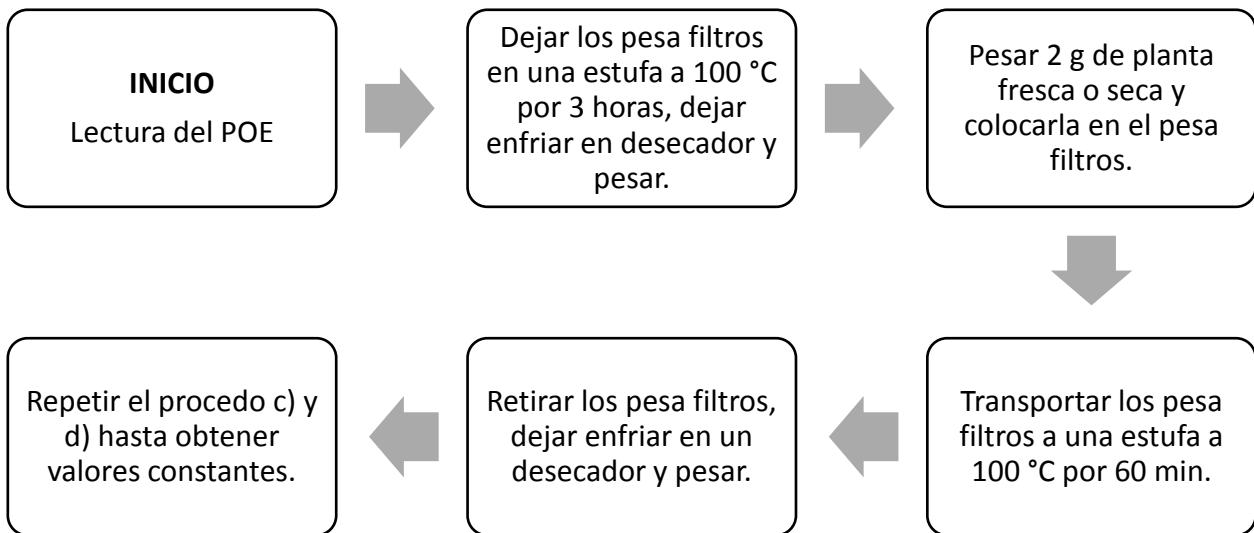
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 8 de 12

DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD



EJEMPLO 1:

TABLA DE ANÁLISIS DE HUMEDAD Y HUMEDAD RESIDUAL
PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Planta:	<i>Piper ecuadorensis</i> (Matico silvestre)	Fecha inicial:	DD/MM/AAAA
Descripción:	Hojas	Fecha final:	DD/MM/AAAA

N°	CRISOL VACÍO	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
1						
2						
3						
TOTAL						

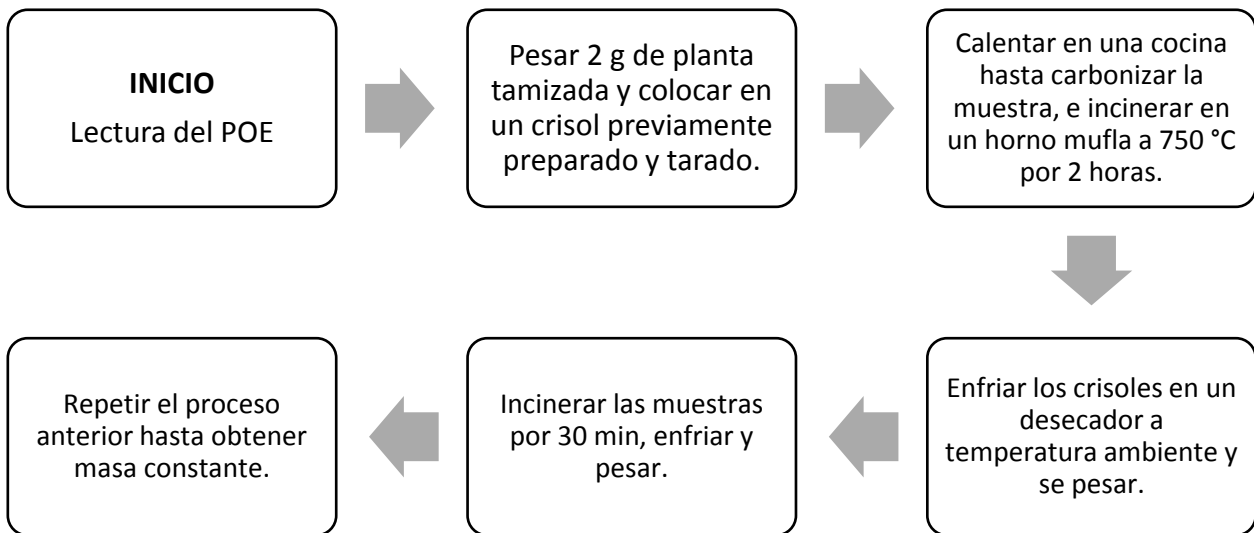
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 9 de 12

**DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES**



EJEMPLO 2:

**TABLA DE ANÁLISIS DE CENIZAS TOTALES
CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL**

Planta:	<i>Piper ecuadorensis</i> (Matico silvestre)	Fecha inicial:	DD/MM/AAAA
Descripción:	Hojas	Fecha final:	DD/MM/AAAA

N°	CRISOL VACÍO	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
1						
2						
3						
4						
5						
6						
TOTAL						

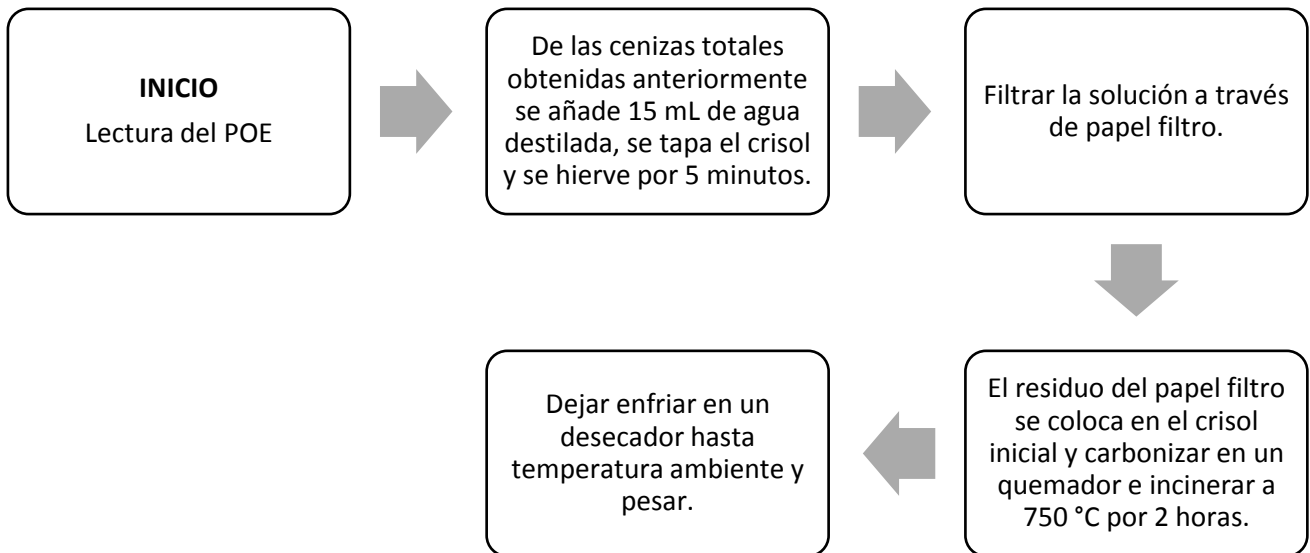
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 10 de 12

DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA



EJEMPLO 3:

TABLA DE ANÁLISIS DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA
CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Planta:	<i>Piper ecuadorensis</i> (Matico silvestre)	Fecha inicial:	DD/MM/AAAA
Descripción:	Hojas	Fecha final:	DD/MM/AAAA

N°	CRISOL VACÍO	M ₁	M ₂	M ₃
1				
2				
3				
TOTAL				

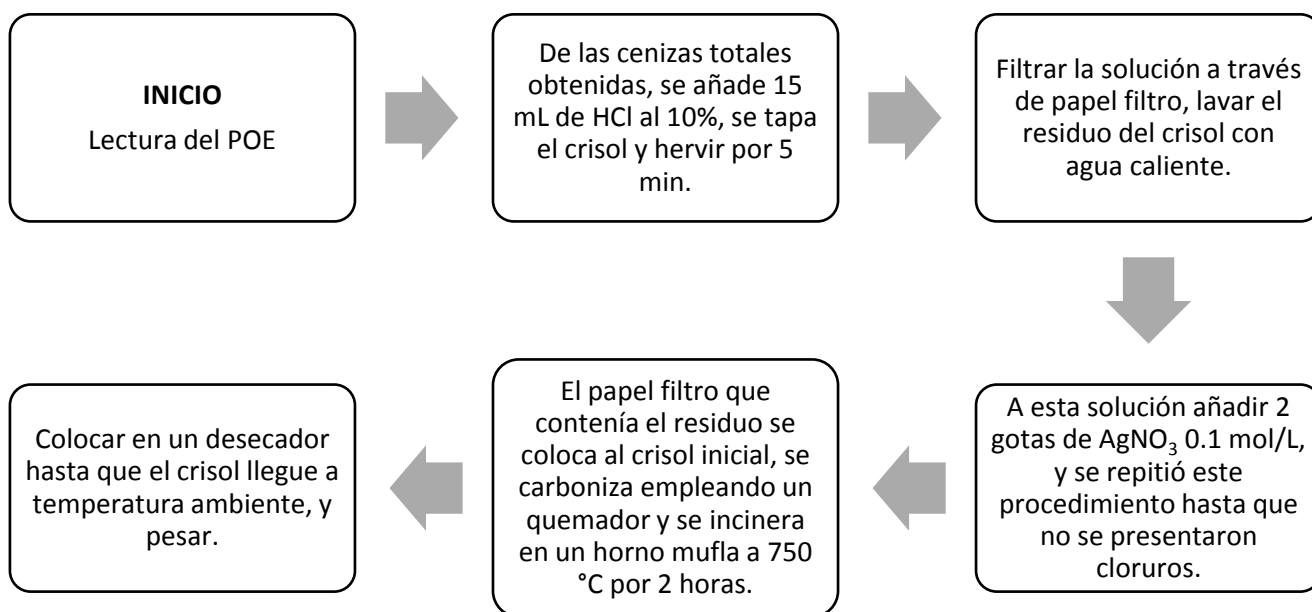
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 11 de 12

DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA



EJEMPLO 4:

TABLA DE ANÁLISIS DE CENIZAS INSOLUBLES EN HCl
CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Planta:	<i>Piper ecuadorensis</i> (Matico silvestre)	Fecha inicial:	DD/MM/AAAA
Descripción:	Hojas	Fecha final:	DD/MM/AAAA

N°	CRISOL VACÍO	M ₁	M ₂
1			
2			
3			
TOTAL			

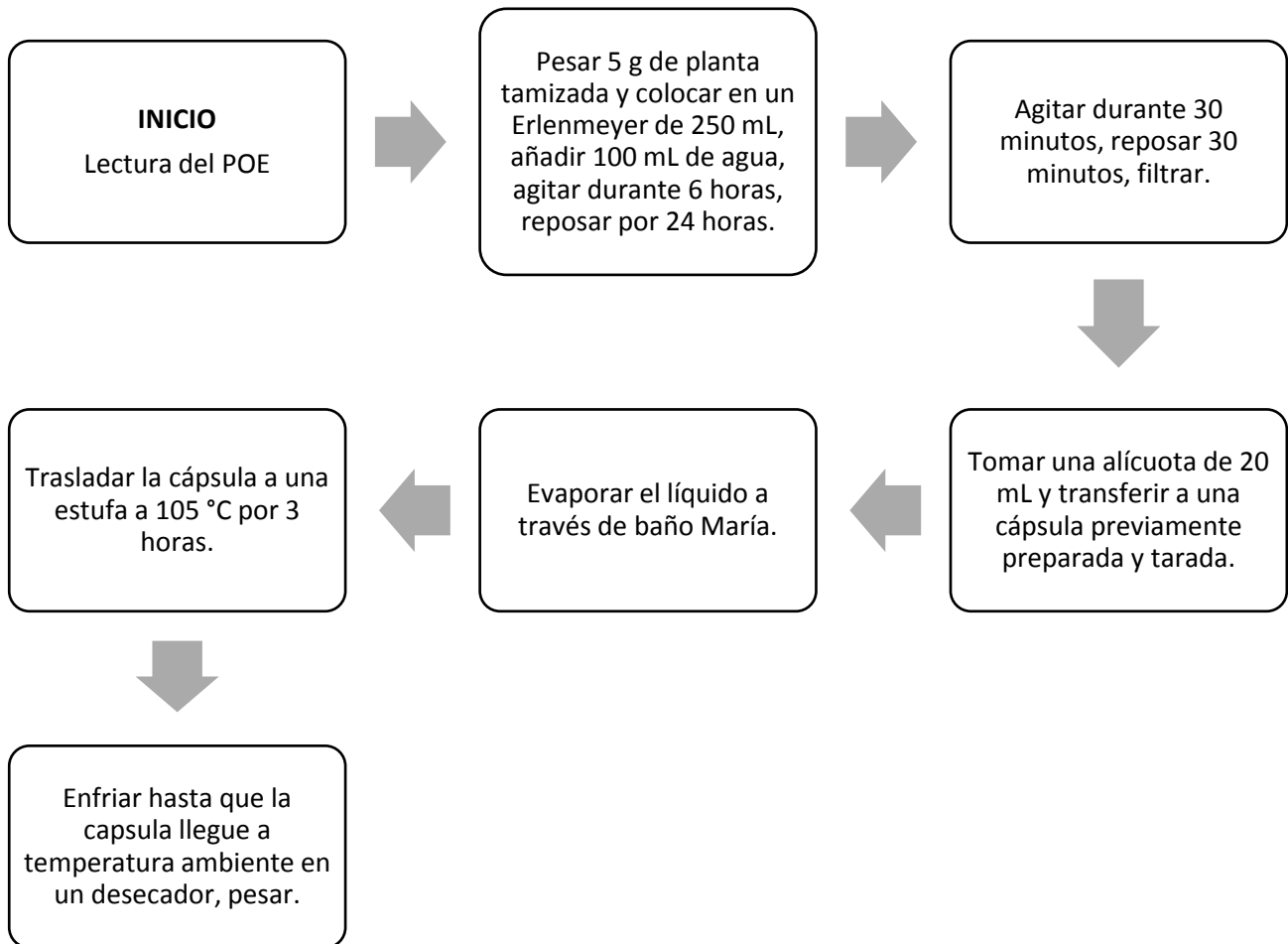
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

PREPARACIÓN Y PROCESOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 12 de 12

DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SUSTANCIAS SOLUBLES



Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 1 de 12

1. OBJETIVO

Proponer una guía para obtener el tamaño idóneo de droga molida, la extracción de sus principios y su posterior análisis cualitativos de los mismos a través de tamizaje fitoquímico, que será empleada para la elaboración de cualesquier fórmula farmacéutica que contenga como principio activo algún extracto de planta.

9. ALCANCE

Todo el personal que empiece con un proceso de obtención de principio activo a través del extracto conseguido de cualesquier planta.

10. RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este procedimiento operativo estándar (POE) recae en todo el personal que participa en el desarrollo de investigaciones, proyectos de vinculación y elaboración de formulaciones farmacéuticas (personal propio del laboratorio, docentes, alumnos en prácticas, becarios y tesistas) del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.

11. FRECUENCIA

Tomar como referencia el presente documento cada vez que se requiera de un conocimiento escrito en cuanto a considerar el tamaño idóneo de droga molida.

12. DOCUMENTO DE REFERENCIA

- SHARAPIN, N. (2000) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. CAB & CYTED. Santafé de Bogotá - Colombia.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1995) Parte I – Métodos Gerais. Atheneu Editora São Paulo Ltda. São Paulo – Brasil.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 2 de 12

- FARNSWORTH, N. (1966) Biological and Phytochemical Screening of Plants. Journal of pharmaceutical sciences. Volumen (55). pp. 225 – 269.

13. FUNDAMENTO TEORICO

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción.

La droga molida se clasifica de acuerdo al tamaño de partícula, ésta última debe de ser adecuada para el proceso de extracción. La molienda del material vegetal independientemente de su naturaleza y del tipo de molino usado da como resultado la producción de una cierta cantidad de partículas muy finas las mismas que deben ser separadas, por lo cual la operación de molienda debe ser seguida por el tamizaje del material obtenido. Las partículas que exceden el tamaño adecuado deben retomar al molino para ser reducidas aún más, descartándose también el polvo muy fino o cuando las condiciones lo permitan, éste polvo debe ser almacenado y extraído aparte y reunirse el material proveniente de varios lotes, en condiciones diferentes de procedimiento.

La farmacopea brasileña clasifica los polvos en:

- | | |
|-------------------------------|---|
| • Polvo grueso: | Pasa en su totalidad por el tamiz #10 y en el máximo un 40% por el #44. |
| • Polvo moderadamente grueso: | Pasa en su totalidad en #22, y en lo máximo, un 40% por el #60. |
| • Polvo semi-fino: | Pasa en su totalidad en #44, y en lo máximo un 40% por el #85. |
| • Polvo fino: | Pasa en su totalidad por el #85. |
| • Polvo finísimo: | Pasa en su totalidad por el #120. |

La selección del equipo para la molienda está en función de la naturaleza de la droga vegetal y del tamaño de partícula del polvo que se pretende obtener. La reducción del tamaño de las partículas se consigue básicamente, utilizando dos mecanismos: el corte y la trituración. Los molinos de cuchillas que se utilizan para el corte son los más

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 3 de 12

indicados para la mayoría de las drogas vegetales: hojas, tallos, cortezas y raíces. En este caso de los molinos de cuchillas, el tamaño de partícula de la droga molida está en función de la abertura de la malla.

Antes de empezar un proceso de extracción, se debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso; dependiendo del propósito, se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso, se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad (etanol o metanol).

Los solventes más usados para productos fitoterapéuticos son: el agua, etanol, glicerina, propilenglicol y mezclas entre estos líquidos. Para el aislamiento de productos naturales puros, los solventes más utilizados son los hidrocarburos, hidrocarburos clorados, alcoholes, ésteres, éteres, cetonas y aceites. En el proceso de escoger un solvente es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, aunque el punto más importante a considerar es el grado de toxicidad del solvente; es por ello que los productos fitoterapéuticos son elaborados principalmente con mezclas hidro – alcohólicas.

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente, y depende de factores que están unidos a la droga como su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido y cantidad de humedad y factores relacionados con el solvente. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación droga/solvente aumenta. El proceso clásico de maceración consiste en dejar la droga en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional.

Una vez molido el vegetal seco hasta obtener un polvo moderadamente grueso o semi-fino. Después se debe adicionar 85% del solvente de extracción, para obtener finalmente una tintura en la proporción 1:10 en relación al residuo seco. La maceración se deja por un espacio de tiempo de 20 días agitando diariamente.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 4 de 12

Un paso importante denominado “*screening fitoquímico*” se basa en pruebas fáciles y rápidas que permiten establecer cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta mediante formación de precipitados, reacciones de coloración, entre otras. Este método cualitativo tiene un orden de extracción a través de una polaridad ascendente, esto debido a que las células constituyen sistemas hidrofílicos y lipofílicos; usualmente cuando se pulveriza la droga, las paredes y membranas celulares se rompen, como consecuencia de esto, se dejan libres vesículas que en su mayoría almacena los metabolitos.

14. DESCRIPCIÓN

14.1. Molienda y obtención de tamaño de partícula

- a) Definir el tipo de molino a usar (en ese caso usaremos “molino manual”).
- b) Tomamos poco a poco cantidades de hojas de material seco y las introducimos en la tolva del molino.
- c) Movemos el manubrio del molino.
- d) Obtenemos un tamaño de hoja reducido.
- e) Tamizamos las hojas trituradas a través del U.S. Standard tamiz n° 20 (710 μ m).

14.2. Tamizaje fitoquímico

- a) Tomar una cantidad de 50g de planta tamizada.
- b) Colocar la droga molida y tamizada en un matraz, agregar 300 mL de éter etílico anhidro; agitar 1min, dejar en maceración por 48 horas.
- c) Filtrar el macerado con ayuda de un embudo Buchner y aire al vacío.
- d) Medir el volumen obtenido y secar por 24h el residuo resultante.
- e) Concentrar el extracto etéreo.
- f) Pesar el residuo resultante y agregar 300mL de etanol, agitar 1min, dejar en maceración por 48 horas.
- g) Proceder como en los pasos c) y d).
- h) Concentrar el extracto etanólico.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 5 de 12

- i) Pesar el residuo resultante y agregar 400mL de agua destilada, agitar 1min, macerar por 72horas.
- j) Proceder como en los casos anteriores.
- k) Concentrar el extracto acuoso

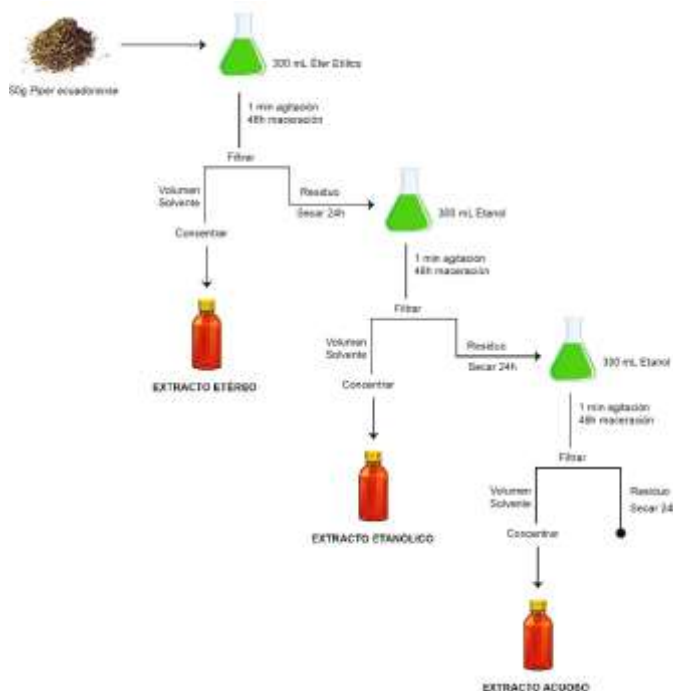


Figura 1. Tamizaje fitoquímico

Elaboración: El autor

14.3. Marchas fitoquímicas

- **Extracto Etéreo**

- *Ensayo Sudán* (Compuestos Grasos): Tomar 5mL de extracto, añadir 1mL de alcohol etílico 0,15% en agua de colorante sudan III ó sudan IV, calentar en baño María hasta evaporar el solvente.

RESULTADO: POSITIVO: Presencia de gotas de color rojo en el líquido o paredes del tubo.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 6 de 12

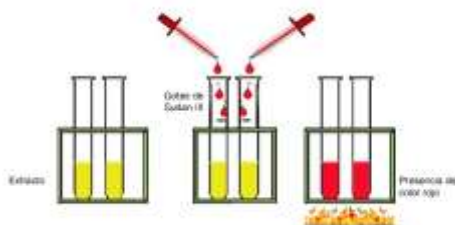


Figura 2. Ensayo Sudán

Elaboración: El Autor

- *Ensayo Dragendorff* (Alcaloides): Tomar 5mL del extracto, evaporar en baño María y redissolver con 1mL de HCl 1% en agua, añadir 3 gotas de reactivo de Dragendorff.

RESULTADO: Aspecto Opalescente (+), Turbidez (++) y Precipitado (+++)

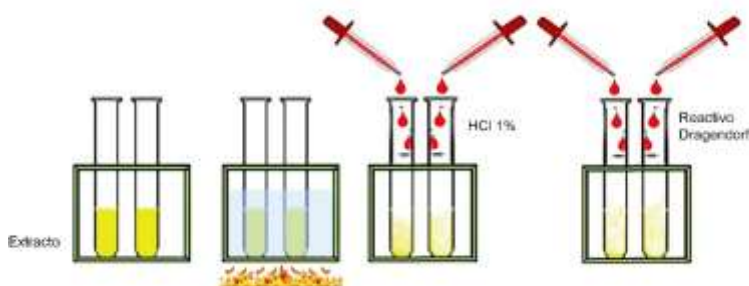


Figura 3. Ensayo Dragendorff

Elaboración: El Autor

- *Ensayo Mayer* (Alcaloides): Tomar 5mL del extracto, evaporar en baño María y redissolver con 1mL de HCl 1% en agua, añadir una pizca de NaCl. Agitar y filtrar la solución y, añadir 3 gotas de reactivo de Mayer.

RESULTADO: Aspecto Opalescente (+), Turbidez (++) y Precipitado (+++)

- *Ensayo Wagner* (Alcaloides): Tomar 5mL del extracto, evaporar en baño María y redissolver con 1mL de HCl 1% en agua, añadir 3 gotas de reactivo de Mayer.

RESULTADO: Aspecto Opalescente (+), Turbidez (++) y Precipitado (+++)

- *Ensayo Baljet* (Lactonas y Coumarinas): Tomar 5mL del extracto, añadir 1 gota de reactivo de Baljet.

RESULTADO: POSITIVO: Presencia de color rojo (++) o precipitado rojo (+++)

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 7 de 12

- *Ensayo Liebermann - Burchard* (Triterpenos - Esteroides): Tomar 5mL del extracto, añadir 1mL de $C_4H_6O_3$, mezclar, por las paredes del tubo, incorporar 3 gotas de H_2SO_4 concentrado, no agitar.

RESULTADO: POSITIVO: Pasa por los cambios, rosado-azul, verde intenso, verde oscuro-negro

- **Extracto Etanólico**

- *Ensayo Catequinas*: Con un capilar tomar cantidad suficiente de extracto y aplicar sobre papel filtro, sobre la mancha aplicar Na_2CO_3 20%.

RESULTADO: POSITIVO: Mancha verde carmelita en luz UV.

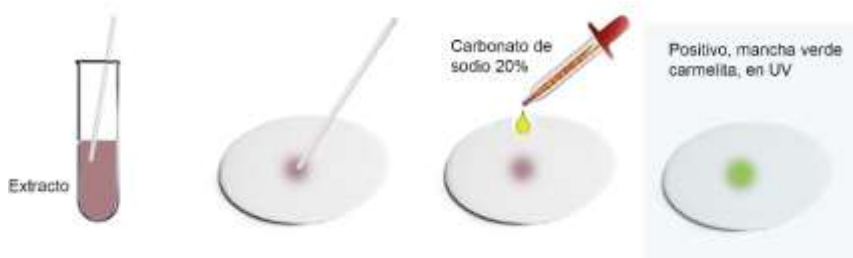


Figura 4. Ensayo Catequinas

Elaboración: El Autor

- *Ensayo Resinas*: Tomar 2mL del extracto en 10mL de agua destilada.
RESULTADO: POSITIVO: Presencia de precipitado.
- *Ensayo Fehling* (Azúcares reductores): Tomar 2mL de extracto y adicionar 2mL de reactivo de Fehling, calentar 8min.
RESULTADO: POSITIVO: Presencia de color rojo o precipitado rojo.
- *Ensayo Espuma* (Saponinas): Tomar 2mL de extracto y diluir con 10mL de agua destilada, agitar enérgicamente 10 min.
RESULTADO: POSITIVO: Presencia de espuma >2mm de altura por 2min.
- *Ensayo Cl_3Fe* (Fenoles y Taninos): Tomar 2mL de extracto y añadir 3 gotas de una solución de $ClFe_3$ 5% en $ClNa$ 0.9%.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 8 de 12

RESULTADO: POSITIVO: Coloración Rojo-vino → fenólicos (+); Coloración verde intenso → Taninos pirocatecólicos (++); Coloración azul → Taninos pirogalotánicos (+++)

- *Ensayo Ninhidrina (Aminoácidos): Tomar 2mL de extracto, añadir 2mL de solución de ninhidrina 2% en agua; calentar 10min en baño María.*

RESULTADO: POSITIVO: Coloración azul violáceo.

- *Ensayo Borntrager (Quinonas): Tomar 1mL de extracto, añadir 1mL de NaOH 5% en agua; mezclar y dejar en reposo.*

RESULTADO: POSITIVO: Coloración rosada (++) , Coloración roja (++)

- *Ensayo Shinoda (Flavonoides): Tomar 2mL de extracto, diluir en 1mL de HCl concentrado, colocar un pedacito de cinta de Mg metálico, esperar 5min, añadir 1mL de alcohol amílico, mezclar y reposar.*

RESULTADO: POSITIVO: Coloración amarillo, naranja, carmelita o rojo.

- *Ensayo Kedde (Cardenólicos): Tomar 2mL de extracto, añadir 1mL de reactivo de Kedde, reposar por 10min.*

RESULTADO: POSITIVO: Coloración violácea por 2 horas.

- *Ensayo Antocianidinas: Tomar 2mL de extracto, calentar 10min con 1mL de HCL concentrado, enfriar y adicionar 1mL de agua y 2mL de alcohol amílico, agitar y reposar.*

RESULTADO: POSITIVO: Coloración roja o marrón en fase amilica.

- *Ensayo Baljet, Ensayo Libermann – Burchard, Ensayo Dragendorff, Ensayo Mayer y Ensayo Wagner.*

● **Extracto Acuoso**

- *Ensayo Mucílagos: Tomar 10mL de extracto acuoso, enfriar 0-5 °C.*

RESULTADO: POSITIVO: Consistencia gelatinosa de la solución

- *Ensayo Principios Amargos: Saborear una gota de extracto acuoso.*

RESULTADO: POSITIVO: Sabor relativo.

- *Ensayo Shinoda, Ensayo Cl₃Fe, Ensayo Dragendorff, Ensayo Mayer, Ensayo Wagner, Ensayo de Fehling, Ensayo de Espuma.*

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 9 de 12

14.4. Preparación de reactivos

- *Reactivo Dragendorff*
Solución A: Disolver 4g de Bi (NO₃)₃ en 10mL de HCl concentrado.
Solución B: Disolver 13,6g de KI en 25 mL de agua.
Mezclar A y B, y aforar a 50mL.

- *Reactivo Mayer*
Disolver 0,67g de HgCl₂ y 2,5g de KI en 50mL de agua.

- *Reactivo Wagner*
Disolver 0,63g de yodo sublimado y 1g de KI en 50mL de agua.

- *Reactivo Baljet*
Reactivo A: Solución de ácido pícrico al 1% en etanol
Reactivo B: Solución NaOH al 10% en agua.
Mezclar A y B.

- *Reactivo Baljet*
Solución A: Disolver 1,75g CuSO₄ hidratado cristalizado en 50mL de agua.
Solución B: Disolver 7,5g Tartrato de sodio y potasio y 2g de NaOH en 50mL de agua.
Mezclar A y B.

- *Reactivo Kedde*
Solución A: 25mL de Ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol.
Solución B: 25 mL de KOH al 5,7% en agua.
Mezclar A y B.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

DIAGRAMA DE FLUJO
MOLIENDA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE MATERIAL VEGETAL

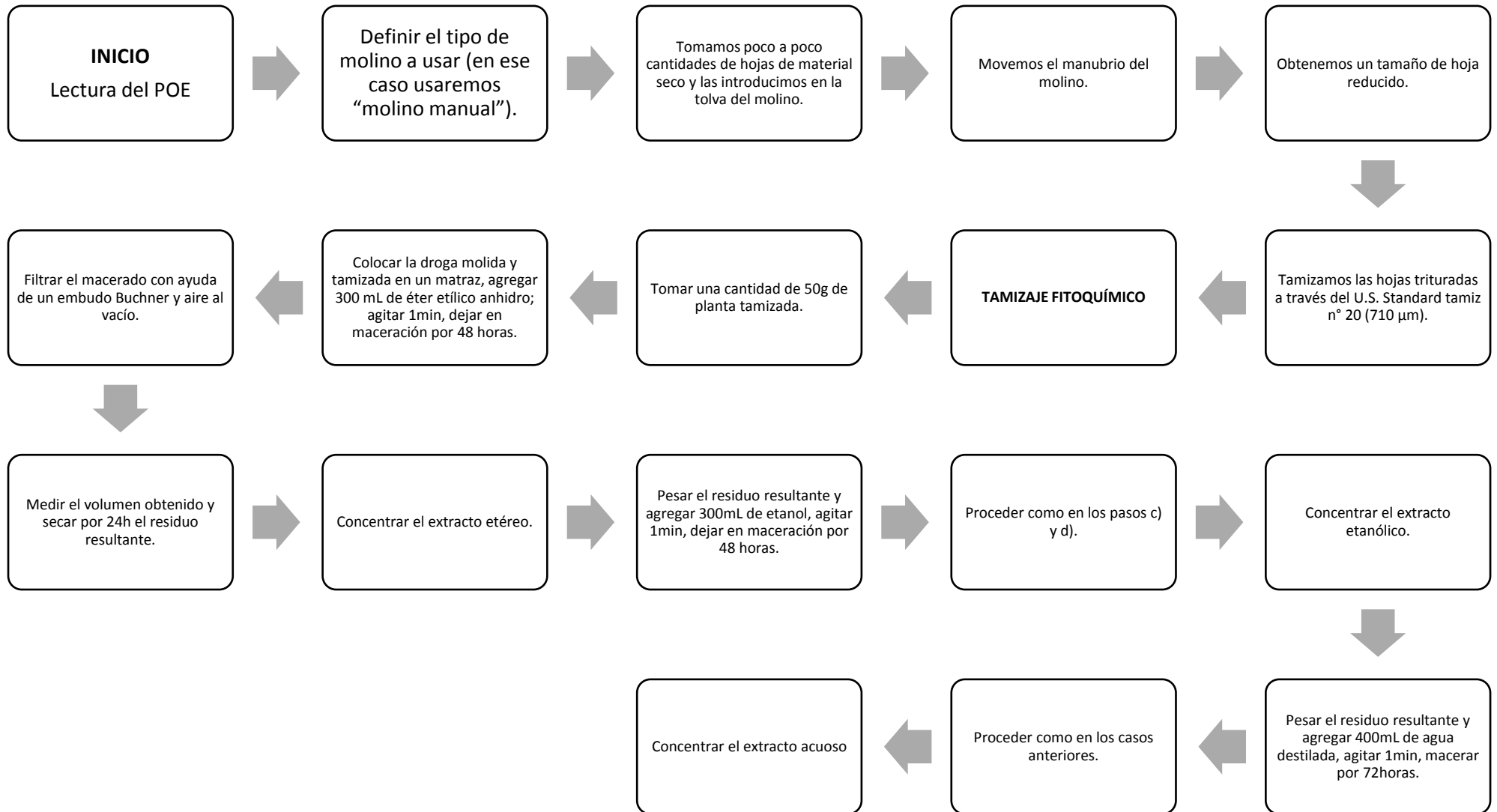
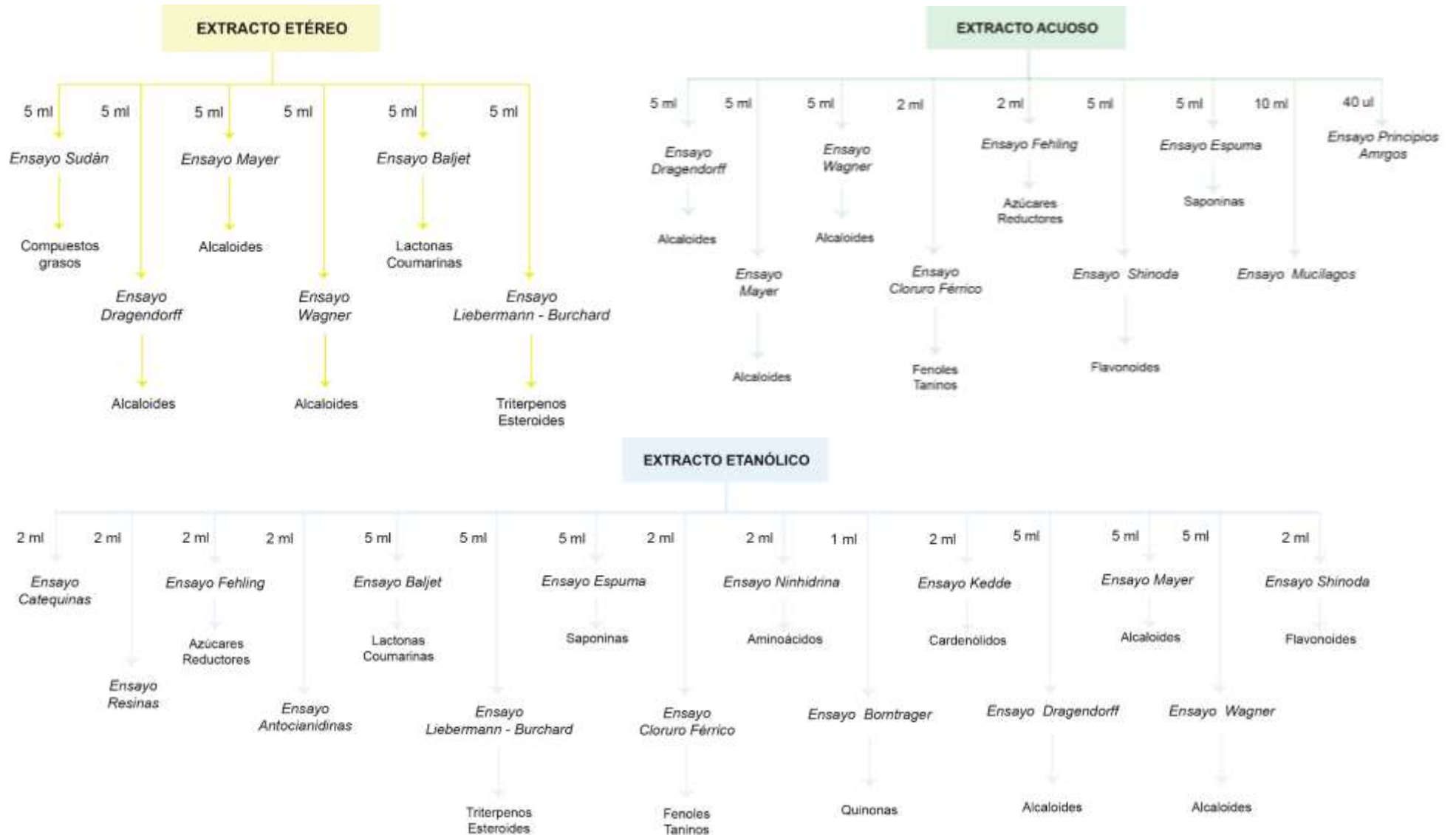


DIAGRAMA MARCHAS FITOQUÍMICAS





MOLIENDA, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Octubre 2017

PÁGINAS: Página 12 de 12

EJEMPLO 5:

TABLA DE ANÁLISIS DE MARCHAS FITOQUÍMICAS

Planta:	<i>Piper ecuadorensis</i> (Matico silvestre)	Fecha inicial:	DD/MM/AAAA
Descripción:	Hojas	Fecha final:	DD/MM/AAAA

ENSAYO	METABOLITO	TIPO DE EXTRACTO		
		Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Sudán	<i>Compuestos grasos</i>			
Dragendorff	<i>Alcaloides</i>			
Mayer	<i>Alcaloides</i>			
Wagner	<i>Alcaloides</i>			
Baljet	<i>Lactonas y Coumarinas</i>			
Liebermann - Burchard	<i>Triterpenos y Esteroides</i>			
Fehling	<i>Azúcares reductores</i>			
Espuma	<i>Saponinas</i>			
Cloruro Férrico	<i>Fenoles y Taninos</i>			
Ninhidrina	<i>Aminoácidos</i>			
Boritrager	<i>Quinonas</i>			
Shinoda	<i>Flavonoides</i>			
Kedde	<i>Cardenólicos</i>			
Catequinas				
Resinas				
Antocianidinas				
Mucílagos				
Principios Amargos y astringentes				

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 1 de 6

1. OBJETIVO

Proponer una guía de control microbiológico exclusivo para material vegetal que será empleada para la elaboración de cualesquier fórmula farmacéutica que contenga como principio activo algún extracto de planta.

2. ALCANCE

Todo el personal que empiece con un proceso de obtención de principio activo a través del extracto conseguido de cualesquier planta.

3. RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este procedimiento operativo estándar (POE) recae en todo el personal que participa en el desarrollo de investigaciones, proyectos de vinculación y elaboración de formulaciones farmacéuticas (personal propio del laboratorio, docentes, alumnos en prácticas, becarios y tesistas) del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.


4. FRECUENCIA

Tomar como referencia el presente documento cada vez que se requiera de un conocimiento escrito en cuanto a considerar el tamaño idóneo de droga molida.

5. DOCUMENTO DE REFERENCIA

- ARAGADVAY, S. (2009) Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Hierbamora (*Solanum nigrum*). ESPOCH. Riobamba – Ecuador.
- PROAÑO, J. (2013) Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Matico (*Piper aduncum*) y Cola de caballo (*Equisetum arvense*) en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*)

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

	DEPARTAMENTO DE QUÍMICA LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	ANEXO 003
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAL VEGETAL		
VIGENTE DESDE: Noviembre 2017	PÁGINAS: Página 2 de 6	

6. FUNDAMENTO TEORICO

El control de calidad para el desarrollo de un fitocosmético inicia desde el tratamiento y evaluación de la materia prima, materiales de acondicionamiento, control en proceso y control de producto terminado.

Los ensayos que contemplan límites microbianos son atributos de buenas prácticas de manufactura, como fortalecimiento de la calidad.

Todos los productos que se desarrollan a partir de productos naturales o de origen vegetal deben emitir análisis microbiológicos, sobretodo en la identificación de microorganismos aerobios, Enterobacterias (por lo menos *Escherichia coli*), mohos y levaduras.

7. DESCRIPCIÓN

7.1. Determinación de aerobios mesófilos

- a) Pesar 25g de planta tamizada y transferir a un Erlenmeyer esteril de 500mL
- b) Agregar 250mL de agua peptonada y homogenizar (dilución 10^{-1}).
- c) Dejar reposar por 60 minutos.
- d) Tomar 1mL de la dilución y mezclar con 9mL de agua peptonada (dilución 10^{-2}).
- e) De ésta última dilución, tomar 1 mL y mezclar con 9mL de agua peptonada (dilución 10^{-3}) y posteriormente una dilución 10^{-4} .
- f) Preparar tubos con tapa con 15 mL de Agar Plate Count (PCA).
- g) A cada tubo colocar 1mL de cada dilución, homogenizar.
- h) Verter sobre cajas Petri.
- i) Incubar por 48horas a 35 ± 2 °C.

7.2. Identificación cualitativa de *E. coli*

- a) De las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} realizar una siembra en agar McConkey.
- b) Incubar por 24 horas a 37 °C.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesisista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 3 de 6

- c) De las colonias existentes en la placa, realizar una siembra en baterías bioquímicas (SIM, TSI, LIA, Urea, Citrato).
- d) Incubar por 24 h a 37 °C.
- e) Determinar cualitativamente la presencia o no de *E. coli*, de acuerdo a las reacciones que presenten las baterías bioquímicas.

7.3. Recuento de hongos y levaduras

- a) De las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , tomar 100 μ L de cada dilución y colocar sobre cajas Petri con medio de cultivo Saboraud.
- b) Incubar a temperatura ambiente por 7 días,
- c) Realizar el conteo de las colonias formadas.

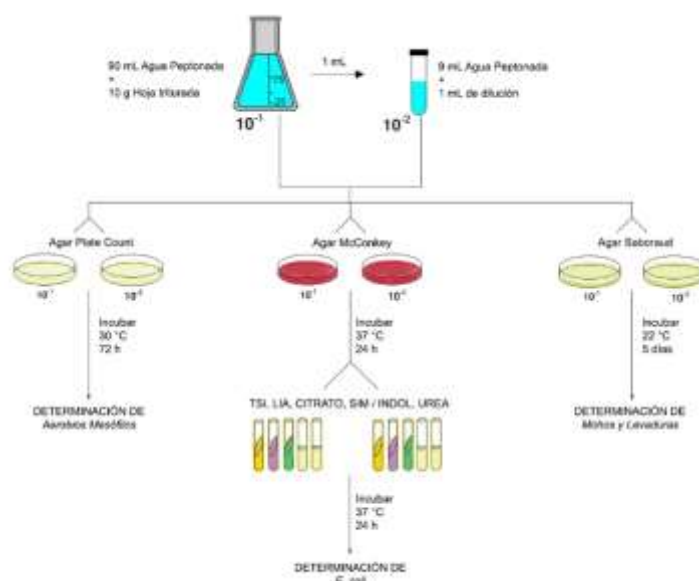


Figura 1. Protocolo de recuento e identificación microbiana

Fuente: Rivera, 2010

Elaboración: El Autor

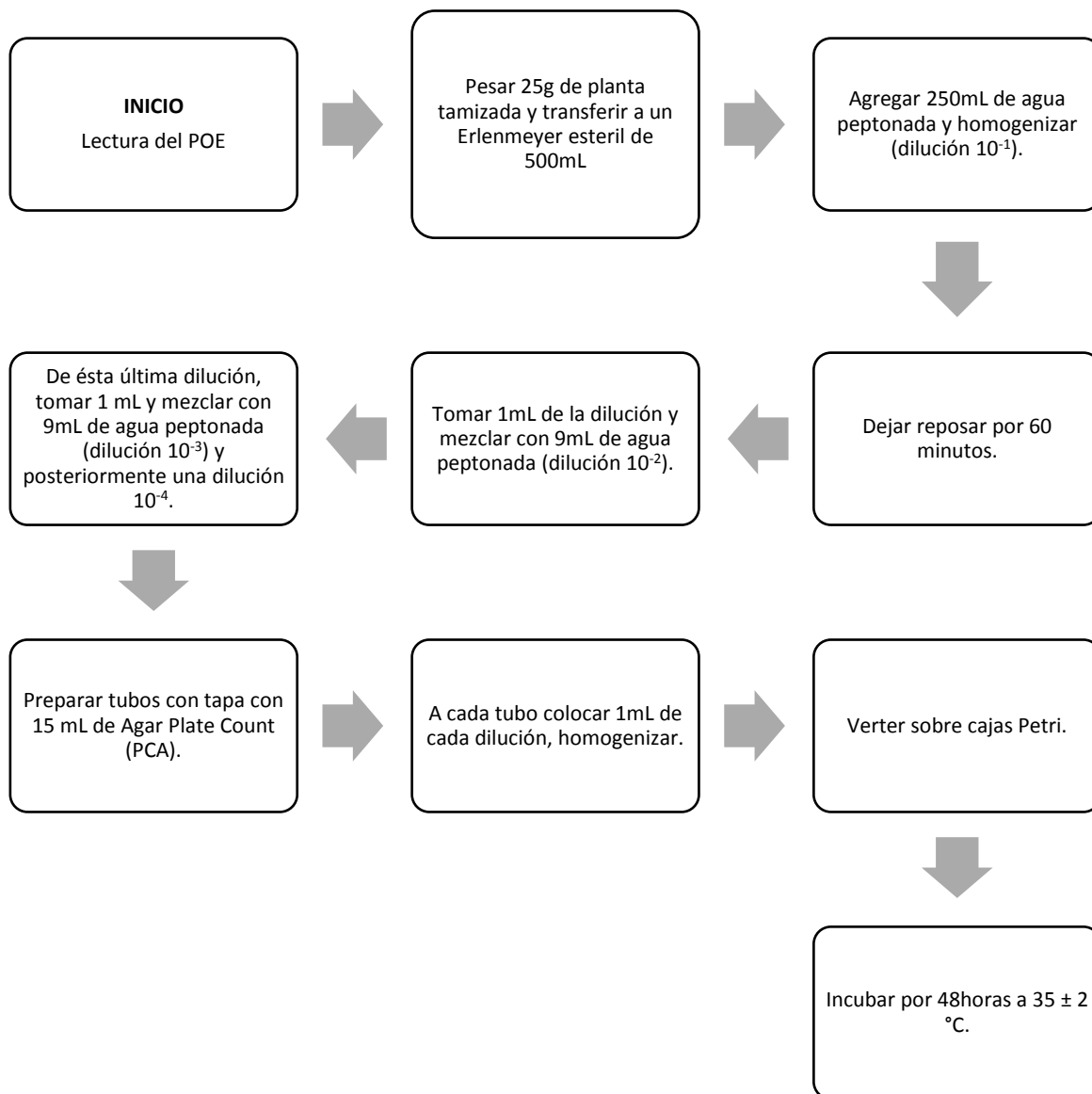
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 4 de 6

**DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DE AEROBIOS MESÓFILOS**



RESULTADO REFERENCIA:

>15 y <300 UFC/mL

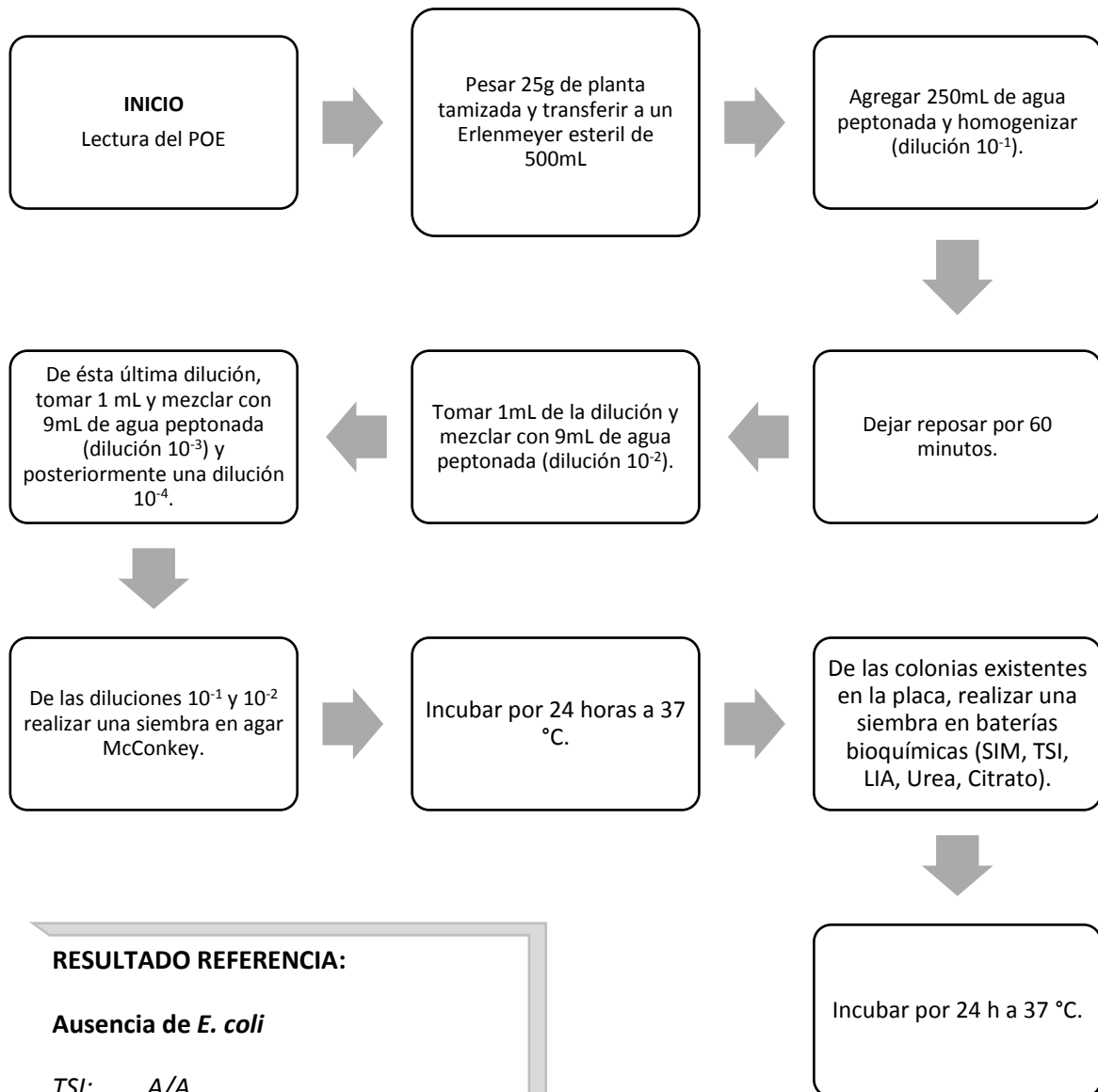
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 5 de 6

DIAGRAMA DE FLUJO
IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE *E. coli*



RESULTADO REFERENCIA:

Ausencia de *E. coli*

TSI: A/A
 LIA: -
 CIT: +
 SIM: -
 INDOL: -
 ÚREA: -

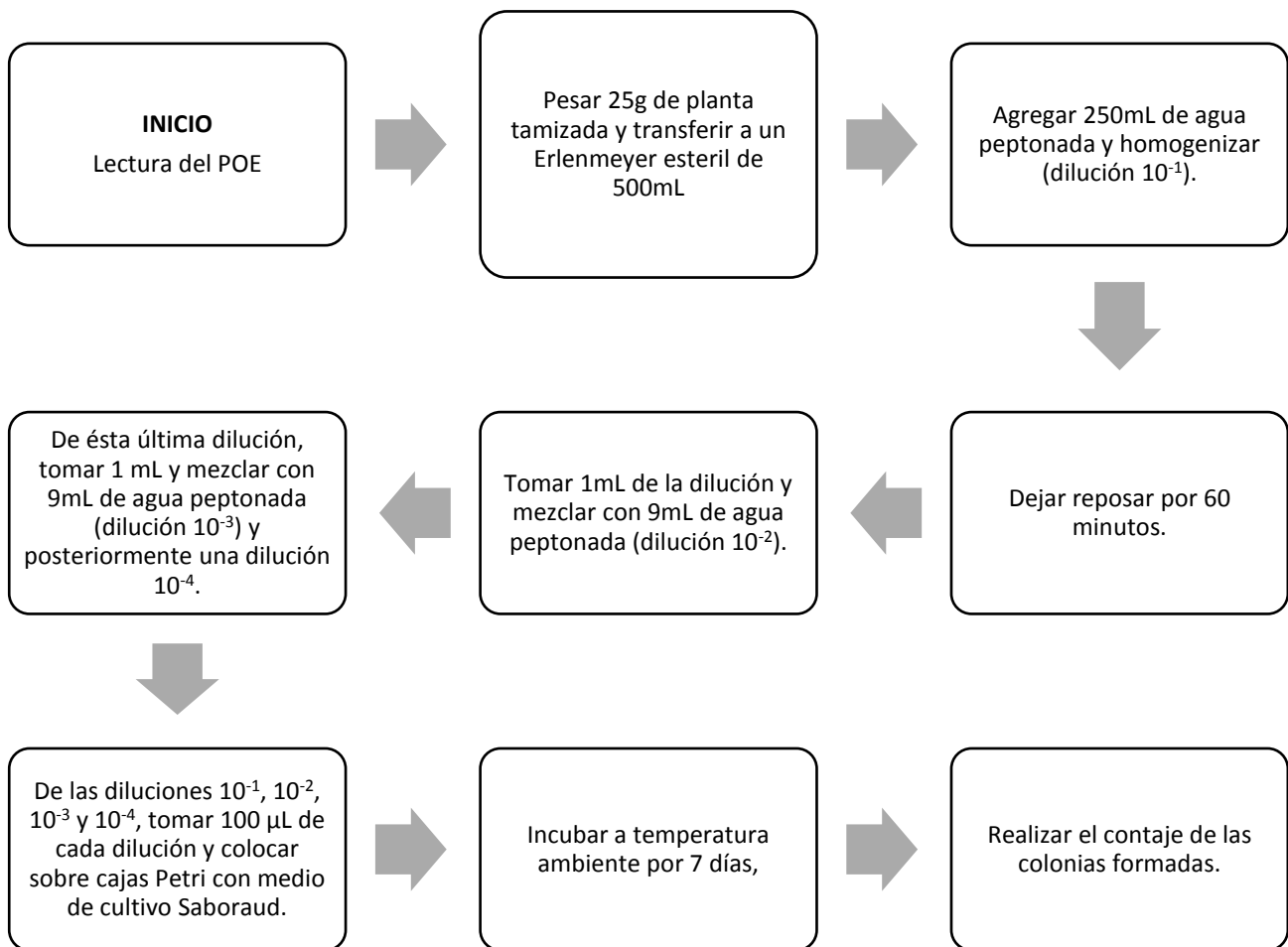
Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAL VEGETAL

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 6 de 6

**DIAGRAMA DE FLUJO
DETERMINACIÓN DE AEROBIOS MESÓFILOS**



RESULTADO REFERENCIA:

>15 y <100 UFC/mL

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ACTIVACIÓN, ESPORULACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 1 de 4

1. OBJETIVO

Proponer una guía de activación, esporulación y criopreservación de cepas fúngicas que serán empleadas para evaluaciones de concentración mínima inhibitoria (CMI).

2. ALCANCE

Todo el personal que requiera realizar CMI con cepas fúngicas.

3. RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este procedimiento operativo estándar (POE) recae en todo el personal que participa en el desarrollo de investigaciones, proyectos de vinculación y evaluaciones de actividad biológica (personal propio del laboratorio, docentes, alumnos en prácticas, becarios y tesistas) del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.

4. FRECUENCIA

Tomar como referencia el presente documento cada vez que se requiera de un conocimiento escrito en activación, esporulación y criopreservación de cepas fúngicas.

5. DOCUMENTO DE REFERENCIA

- Nava, D. & Hernández, H. (2003) Activación de tres cepas fúngicas para la producción de tanasa. Instituto Politécnico Nacional. pp: 1 – 10.
- Dilia, A. (2006) Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. pp: 1-152

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

ACTIVACIÓN, ESPORULACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 2 de 4

6. FUNDAMENTO TEORICO

El auge de la micología ha producido grandes resultados en los campos agroindustrial, biotecnológico y ambiental, la facilidad del estudio permite crear colecciones y conservarlas. Para conservar y mantener la viabilidad y características de los hongos se requiere de técnicas que garanticen la conservación de las particularidades morfológicas y fisiológicas de cada aislamiento de estos hongos.

La preservación de la cepa fúngica en el punto clave en los métodos de conservación, el preservar una cepa involucra en primera instancia el propósito de utilidad, cantidad de cepas a mantener, espacio disponible, materiales y equipos con los que se cuenta para realizar el método.

Para evitar la degeneración y envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas cuanto sea posible, muchos factores intervienen en la declinación de cepas, entre ellas tenemos: carencia de nutrientes, acumulación de toxinas propias del hongo, alteración de pH, disminución de oxígeno, entre otras.

Los métodos para preservar las diversas cepas van enfocadas a: utilización de cuñas de agar, diluciones en aceites minerales, conservación de esporas en tierra, arena o sílica gel, cepas liofilizadas, congelación en nitrógeno líquido y en agua destilada.

7. DESCRIPCIÓN

7.4. ACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

♦ *Trichophyton methagrophytes*:

- Trozar el disco y diluir con el buffer inserto en el Stich del producto.
- De la dilución, en cajas de Petri se realiza una siembra por agotamiento en: Agar Papa (PDA), Agar Extracto Malta (MEA) y Agar Sabouraud.
- Al resto de la dilución la vertemos sobre 50mL de caldo Sabouraud, previamente ingresado en un matraz de 250mL.
- Incubar por 4 días a 28°C; incluyéndole al caldo que agitación.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ACTIVACIÓN, ESPORULACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 3 de 4

◆ ***Trichophyton rubrum:***

- Trozar el disco e incorporar en 50mL de caldo Sabouraud, previamente ingresado en un matraz de 250mL.
- Incubar por 4 días a 28°C con agitación.
- Del crecimiento existente se realiza una siembra por agotamiento en: Agar Papa (PDA), Agar Extracto Malta (MEA) y Agar Sabouraud.
- Incubar por 4 días a 28°C.

7.5. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

- Con 8cm de cinta adhesiva transparente tomamos cantidad suficiente de la superficie de hongo de las cajas de PDA.
- Colocamos una gota de colorante Floxin sobre un portaobjetos y sobreponemos la cinta adhesiva.
- Observamos al microscopio, 40x

7.6. ESPORULACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

- Se prepara 50mL de medio PDA en un matraz de 250mL.
- Se transfiere asadas suficientes del hongo contenido en la caja de Sabouraud al matraz cuando el agar está a una temperatura de 35°C.
- Incubar 7 días a 38°C.

7.7. CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

- Se prepara el buffer de criopreservación:

170 mL agua destilada 30 mL glicerol 1 pastilla de PBS	1. Disolver los componentes 2. Ajustar pH 7.4 3. Autoclavar 121°C; 15min
--	--

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ACTIVACIÓN, ESPORULACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 4 de 4

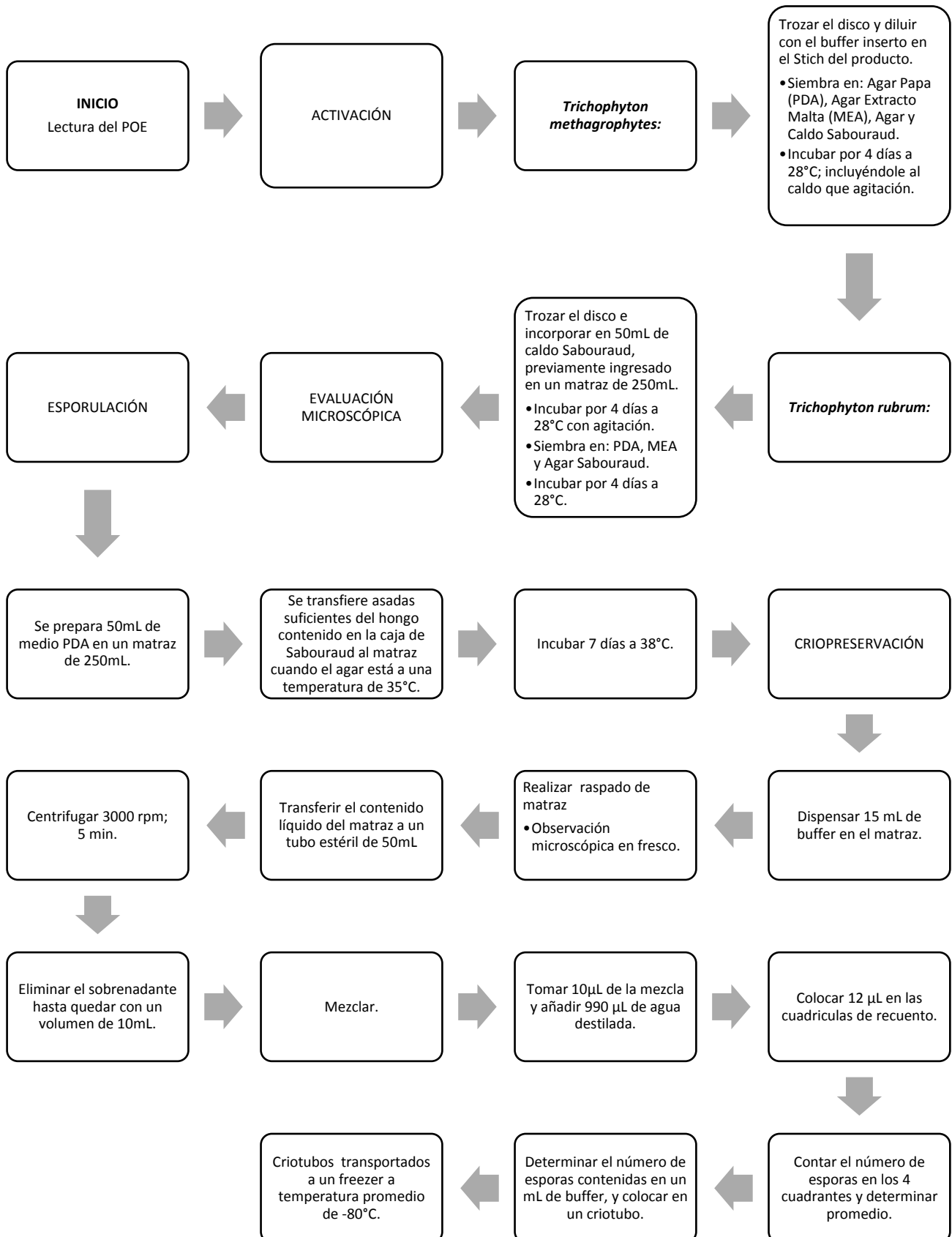
- Dispensar 15 mL de buffer en el matraz.
- Realizar un raspado de la superficie del medio, desprendiendo el crecimiento fúngico.
 - Realizar observación microscópica en fresco.
- Transferir el contenido líquido del matraz a un tubo estéril de 50mL
- Centrifugar a 3000 rpm por 5 min.
- Eliminar el sobrenadante hasta quedar con un volumen de 10mL.
- Mezclar.
- Tomar 10µL de la mezcla y añadir 990 µL de agua destilada.
- Colocar 12 µL en las cuadrículas de recuento.
- Contar el número de esporas en los 4 cuadrantes leucocitarios y determinar el promedio.
- Con los datos obtenidos, realizar los cálculos respectivos de determinación del número de esporas contenidas en un mL de buffer, y colocar en un criotubo.
- El/los criotubos son transportados a un freezer a temperatura promedio de -80°C.

8. RECOMENDACIONES

- Los ensayos se deben realizar en una cabina de flujo laminar previamente esterilizada.
- El material con el cual se trabaja debe estar autoclavado, secado y esterilizado en UV por 15 min.
- En caso de contaminación bacteriana, se pueden aplicar tratamientos con gentamicina 80mg/mL, polimicina 1mg/mL, clorafenicol 2mg/mL.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

DIAGRAMA DE FLUJO ACTIVACIÓN, ESPORULACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS





ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 1 de 4

1. OBJETIVO

Proponer una guía para desarrollar evaluaciones de concentración mínima inhibitoria (CMI) con cepas fúngicas.

2. ALCANCE

Todo el personal que requiera realizar CMI con cepas fúngicas.

3. RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este procedimiento operativo estándar (POE) recae en todo el personal que participa en el desarrollo de investigaciones, proyectos de vinculación y evaluaciones de actividad biológica (personal propio del laboratorio, docentes, alumnos en prácticas, becarios y tesistas) del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.

4. FRECUENCIA

Tomar como referencia el presente documento cada vez que se requiera de un conocimiento escrito para desarrollo de CMI.

5. DOCUMENTO DE REFERENCIA

- Nava, D. & Hernández, H. (2003) Activación de tres cepas fúngicas para la producción de tanasa. Instituto Politécnico Nacional. pp: 1 – 10.
- Dilia, A. (2006) Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. pp: 1-152
- CLSI, C. a. (2002). Método M38-A. Wayne Ed., 22:1-27.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 2 de 4

6. FUNDAMENTO TEORICO

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se traduce como la medida de la sensibilidad que presenta un hongo o bacteria frente a una sustancia.

La mínima cantidad que tiene, en este caso, un antifúngico que es capaz de impedir el crecimiento de un hongo en las condiciones normales. Para poder realizar este ensayo es necesario contar con cepas control, esto debido a que los resultados deben de ser reproducibles y comparables.

Existen diversas técnicas de CMI que nos permiten identificar el grado de sensibilidad de un compuesto frente a una bacteria u hongo, entre ellas tenemos: Difusión en agar, microdilución en agar o caldo, entre otros.

7. DESCRIPCIÓN

7.1. MICRODILUCIÓN EN CALDO

- Trabajar con una placa de 96 pocillos.
- Pesar 20mg de extracto y diluir en 500 μ L de DMSO y 500 μ L de Suero Fisiológico.
- En los pocillos que corresponden a A-H y 1-6 colocar 100 μ L de caldo Sabouraud.
- En los pocillos que corresponden a la columna 7 se agregan 200 μ L de caldo Sabouraud (Control de esterilidad)
- En cada pocillo de A 1-4 colocar 20 μ L de extracto.
- En el pocillo A5 colocar 10 μ L de DMSO y 10 μ L de Suero Fisiológico (Control negativo)
- Realizar una dilución de 100 μ L itraconazol + 900 μ L DMSO, de ésta tomamos 20 μ L y colocamos en el pocillo A6 (Control positivo).

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON CEPAS FÚNGICAS

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 3 de 4

- Realizar diluciones seriadas empezando por A1-6, homogenizar y tomar 100 μ L y transferir a B1-6, homogenizar, tomar 100 μ L y seguir secuencialmente hasta llegar a H1-6, en donde se toman 100 μ L y se desechan.

7.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- Ajustamos la población a 1×10^5 esporas/mL.
- Diluir en 10 mL de caldo Sabouraud.
- Tomar 100 μ L del inóculo y colocar en los pocillos comprendidos entre: A1-4 – H1-4 ; A6 – H6.

Incubar la placa a 38°C por 96 horas.

7.3. MICRODILUCIÓN EN AGAR (FORMULADOS SEMISÓLIDOS)

- Realizar ensayo en placa de 24 pocillos.
- Pesar y colocar 100mg del producto en A1-3; 50mg en los pocillos comprendidos de B1-3; 25mg en C1-3; 12,5g en A4-6 y 6,25mg en B4-6.
- Pesar y colocar 100mg de producto en D1-3 (control de esterilidad)
- Colocar 20 μ L de itraconazol (1mg/mL) en C4-6 (Control positivo)
- Colocar 100mg de placebo en D4-6.
- Añadir 1ml de agar Sabouraud a todos los pocillos e inocular con 100 μ L de cepas fúngicas.
- Incubar la placa a 38°C por 96 horas.

8. RECOMENDACIONES

- Los ensayos se deben realizar en una cabina de flujo laminar previamente esterilizada.
- El material con el cual se trabaja debe estar autoclavado, secado y esterilizado en UV por 15 min.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

DIAGRAMA DE FLUJO
ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON CEPAS FÚNGICAS
MICRODILUCIÓN EN CALDO

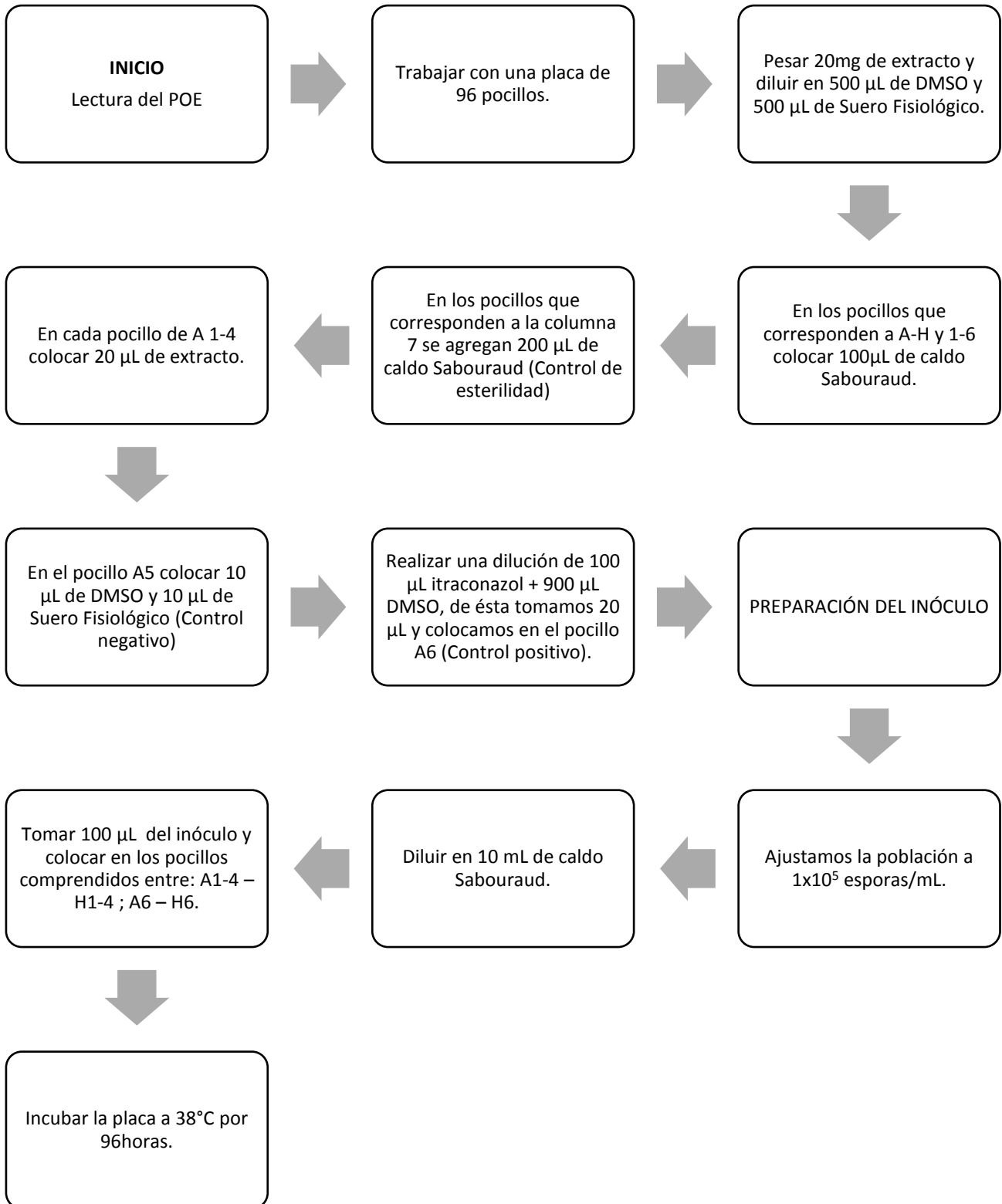
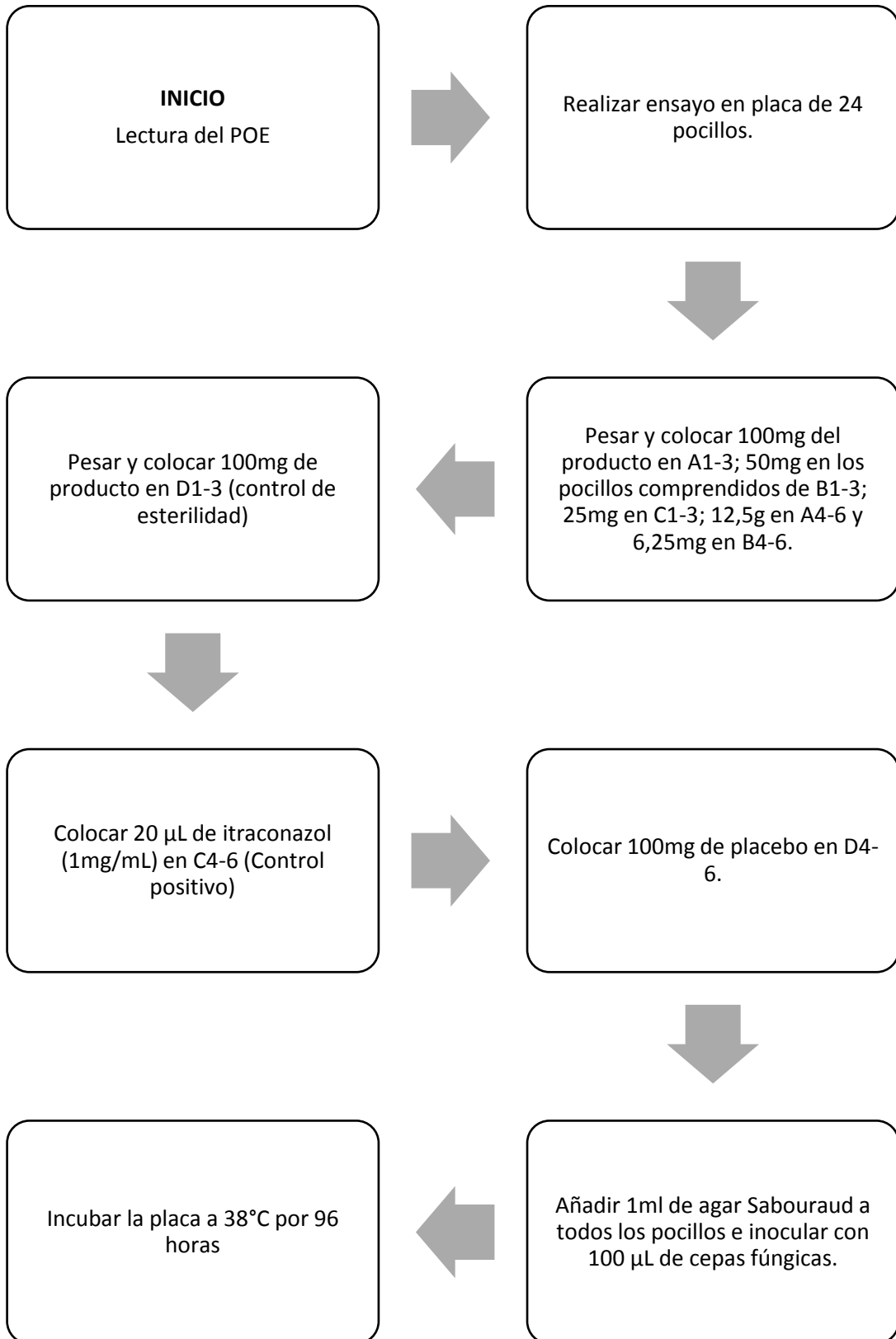



DIAGRAMA DE FLUJO
ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON CEPAS FÚNGICAS
MICRODILUCIÓN EN CALDO



	DEPARTAMENTO DE QUÍMICA LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	ANEXO 006
ELABORACIÓN DE CREMA ANTIFÚNGICA 1,5%		
VIGENTE DESDE: Noviembre 2017	PÁGINAS: Página 1 de 4	

1. OBJETIVO

Proponer una guía para la elaboración de una crema antifúngica 1,5% a base del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* (Matico de monte).

2. ALCANCE

Todo el personal que requiera elaborar una crema antifúngica 1,5% a base del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis*.

3. RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este procedimiento operativo estándar (POE) recae en todo el personal que participa en el desarrollo de investigaciones, proyectos de vinculación y evaluaciones de actividad biológica (personal propio del laboratorio, docentes, alumnos en prácticas, becarios y tesisistas) del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.


4. FRECUENCIA

Tomar como referencia el presente documento cada vez que se requiera de un conocimiento escrito en activación, esporulación y criopreservación de cepas fúngicas.

5. DOCUMENTO DE REFERENCIA

- Aragadvy, S. P. (2009). Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Hierbamora (*Solanum nigrum*). Riobamba: ESPOCH.
- Mora, V. (2015). *Elaboration of Anti-aging Cosmetic Cream based on Curcuma Longa and its Physical-Chemical Characteristics and Sensory Analysis*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesisista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

	DEPARTAMENTO DE QUÍMICA LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	ANEXO 006
ELABORACIÓN DE CREMA ANTIFÚNGICA 1,5%		
VIGENTE DESDE: Noviembre 2017	PÁGINAS: Página 2 de 4	

6. FUNDAMENTO TEORICO

Las cremas son consideradas pomadas en forma de emulsiones conformadas por dos fases, una hidrofílica y una lipofílica, en muchos casos de tipo aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O), su aspecto es líquido viscoso a veces semisólido, de consistencia blanda, un poco más fluida que las pomadas

Las cremas son desarrolladas para aplicación tópica o sobre mucosas, cuyo fin es ejecutar una acción local o permitir la penetración cutánea del medicamento; se componen de fase acuosa, oleosa, sistema emulgente, humectante y medios espesantes.

Cremas Hidrófilas (O/W): La fase externa es fundamentalmente acuosa debido al emulgente, desaparece fácilmente en la piel, es lavable, sirve como vehículo para todas las sustancias hidrosolubles y cosméticamente es aceptable. En piel normal o ligeramente reseca es recomendable la aplicación de una emulsión aceite en agua (O/W), esto debido a que la fase oleosa de la preparación se ubica inmerso a la fase acuosa, la absorción que ejerce la piel es rápida, la fase acuosa produce un efecto refrescante mientras que la constitución oleosa no deja rastro a pesar de dejar engrasada la piel.

Cremas Hidrófobas (W/O): Debido a la presencia de tensoactivos de tipo W/O, la fase externa es de tipo lipofílica. Estas cremas o emulsiones de tipo agua en aceite, habitualmente se emplean para pieles secas o que presenten dermatosis crónica, la fase interna está conformada por la parte acuosa mientras que la fase externa está compuesta de una parte oleosa. Presenta problemas de absorción en la piel, siendo ésta más lenta que en las cremas hidrofílicas, sin embargo su ventaja está encaminada en la liberación de los API's, debido a que este tipo de crema no puede ser lavada con facilidad lo que permite una difusión de todo el API a través de la piel.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesisista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ELABORACIÓN DE CREMA ANTIFÚNGICA 1,5%

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 3 de 4

7. DESCRIPCIÓN

- Fórmula:

FUNCIÓN	COMPONENTES	%p/p	FÓRMULA UNITARIA (g)	FÓRMULA MANUFACTURA (g)
API	Extracto de <i>Piper ecuadorese</i>	1,5	0,75	15
Emoliente	Propilenglicol	30	15	300
Emulgente	Cetomacrogol	8	4	80
Agente Reológico	Alcohol Estearílico	8	4	80
Conservante	Parabenos	0,2	0,1	2
Regulador de pH	Citrato de Sodio	0,3	0,15	3
Grasa Mineral	Vaselina Líquida	15	7,5	150
Grasa Mineral	Vaselina Sólida	8	4	80
	Agua	c.s	c.s	c.s
	TOTAL	100	50	1000

• En la fase acuosa:

- Calentar a 50°C el propilenglicol y añadir el cetomacrogol (Mezcla A)
- Calentar agua destilada a 80°C y disolver los parabenos, dejar enfriar y disolver el citrato de sodio (Mezcla B)
- Incorporar B sobre A, y calentar hasta 65 °C.

• En la fase oleosa:

- Calentar la vaselina sólida e incorporar la vaselina líquida y el alcohol cetílico, mantener la temperatura a 65°C.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017



ELABORACIÓN DE CREMA ANTIFÚNGICA 1,5%

VIGENTE DESDE: Noviembre 2017

PÁGINAS: Página 4 de 4

- Una vez que las dos fases se encuentran a 65°C se incorporó la fase oleosa sobre la acuosa (O/W).
- Agitar manualmente por 90s.
- Agitar mecánicamente a 800 r.p.m por 3min o hasta conseguir una temperatura de 40°C.
- Incorporar el extracto que previamente se diluyó en 5g de propilenglicol y se mantuvo a una temperatura de 40°C,
- Agitar mecánicamente a 1000 r.p.m por 18 min.
- Envasar el producto.

8. RECOMENDACIONES

- a) Pesar debidamente cada uno de los excipientes.
- b) No sobrepasar los 80°C al momento de diluir los excipientes.
- c) Verificar que las temperaturas de las dos fases tanto oleosa como acuosa se encuentren en un mismo nivel.

Elaboró	Paulo Cesar Sarango Granda	Revisión y Aprobación	Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos
Cargo	Tesista del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica	Cargo	Director del Trabajo de Fin de Titulación Responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica
Firma y Fecha 25/10/2017	Firma y Fecha 20/11/2017

DIAGRAMA DE FLUJO ELABORACIÓN DE CREMA ANTIFÚNGICA 1,5%

