

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Desarrollo de una formulación de crema a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2014.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Presentado por el:
Bach. MARTÍNEZ TINEO, Walter Kike

AYACUCHO-PERÚ
2016

A mis padres, hermanos

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica que hicieron posible mi formación profesional.

A mi asesor, el Mg. Q.F. ARONES JARA, Marco Rolando; asesor del presente trabajo de investigación, por el apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación.

Al Mg Q.F. AGUILAR FELICES, Enrique Javier, por el apoyo y paciencia en la conducción del presente trabajo de investigación.

A todas las personas que me brindaron su apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Calceolaria engleriana Kraenzl “wawillay”	5
2.3. Flavonoides	7
2.4. Compuestos fenólicos	7
2.5. Taninos	7
2.6. Cumarinas	8
2.7. Proceso de atomización	8
2.8. Estudios de formulación de formas farmacéuticas semisólidas	9
2.8.1. Clasificación	9
2.8.2. Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos	10
2.9. Estudios de Pre-formulación	11
2.10. Estabilidad	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación	15
3.2. Población y muestra	15
3.3. Procedimiento para la recolección de datos	15
3.4. Tipo y diseño de investigación	22
3.5. Análisis de datos.	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Elaboración de la crema base.	19
Tabla 2. Características fisicoquímicas del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	26
Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Romaní, 2012.	27
Tabla 4. Parámetros de evaluación de las cremas elaboradas a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	28
Tabla 5. Parámetros de evaluación por día de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	30
Tabla 6. Estabilidad térmica por día de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	31
Tabla 7. Pérdida por evaporación por día de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	32
Tabla 8. Control microbiológico de la crema 2, elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" al inicio y final del estudio. Ayacucho, 2014.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Núcleo básico de un flavonoide, 2-fenilbenzopirona.	7
Figura 2. Extensibilidad de las cremas elaboradas a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	29
Figura 3. Extensibilidad de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" frente al peso aplicado, en función al tiempo inicial y final. Ayacucho, 2014.	34
Figura 4. Cuantificación de fenoles en la crema 2, elaborado a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" en un estudio de estabilidad de un mes. Ayacucho, 2014.	35

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación de la <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" Ayacucho - 2014	48
Anexo 2. Fotografía de las hojas y flores de la <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" Ayacucho - 2014.	49
Anexo 3. Flujograma de obtención del extracto atomizado de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" realizado en el Laboratorio de control de calidad de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho -2014.	50
Anexo 4. Concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2014.	51
Anexo 5. Programando el equipo atomizador Spray Driver B290 del Centro de Desarrollo Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos. Ayacucho – 2014	52
Anexo 6. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".Romaní, 2012	53
Anexo 7. Flujograma de cuantificación del estándar ácido caféico a diferentes concentraciones. Ayacucho-2014.	54
Anexo 8. Preparación del estándar ácido caféico a diferentes concentraciones. Ayacucho-2014.	55
Anexo 9. Lectura de la solución estándar de ácido caféico a diferentes concentraciones más la muestra del atomizado de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" en el espectrofotómetro UV vis. En el laboratorio de cinética y estabilidad de medicamentos de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho - 2014.	56
Anexo 10. Curva de calibración del ácido caféico. Ayacucho - 2014.	57
Anexo 11. Producto terminado de las formulas 1, 2 y 3; realizado en el laboratorio de farmacias MASPHERMA. Ayacucho - 2014.	58
Anexo 12. Producto terminado elegido (crema 2) elaborada en el laboratorio de farmacias MASPHERMA. Ayacucho - 2014.	59

Anexo 13.	Evaluación de pH a la crema 2 elaborada en el laboratorio de farmacias MASPHERMA Ayacucho -2014.	60
Anexo 14.	Cuantificación de fenoles presentes en la crema 2, elaborada en el Laboratorio de farmacias MASPHERMA Ayacucho – 2014.	61
Anexo 15.	Preparación de inóculo con caldo lauril sulfato de sodio. Ayacucho -2014.	62
Anexo 16.	Determinación del número más probable de microorganismos coliformes totales. Ayacucho -2014.	63
Anexo 17.	Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 mL de muestra. Ayacucho -2014.	64
Anexo 18.	Lectura de resultados positivos y negativos por el método NMP de la crema de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl “wawillay”. Ayacucho-2014.	65
Anexo 19.	Matriz de consistencia	66

RESUMEN

El uso de plantas medicinales se remontan a épocas antiguas, por ello se han utilizado las plantas para tratar dolencias. Con base en este conocimiento cultural, investigadores realizan estudios en el laboratorio a fin de comprobar los efectos de ciertas plantas sobre las diferentes enfermedades que afectan al ser humano. El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de desarrollar una formulación de crema a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", que fueron recolectadas en el centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) a 2700 m.s.n.m del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Se llevó a cabo en los Laboratorios del Área de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) y en el Laboratorio de la Oficina Farmacéutica MasPharma. El extracto atomizado tuvo un olor característico, sabor amargo, color marrón claro y tiene un aspecto de polvo fino homogéneo. Es muy soluble en agua, con pH igual a $5,34 \pm 0,06$; humedad de 6,75%; cenizas 5,24%; un rendimiento de 9,37% y un porcentaje de fenoles de $84,84 \pm 0,06\%$. Se desarrolló tres formulaciones de la crema a base de extracto atomizado, eligiéndose la crema 2 por presentar mejores parámetros fisicoquímicos. Se le realizó estudios de pre-estabilidad durante un mes, durante el cual se evaluó sus características fisicoquímicas, así mismo se determinó el porcentaje de fenoles por el método de Folin Ciocalteau. Para el estudio de estabilidad presentó un aspecto homogéneo, de color beige claro, textura suave, olor *Sui generis*, consistencia moderada y pH de 6,0. Del estudio de pre-estabilidad, después de su exposición a temperatura ambiente y 30°C por un mes no presentó variación de sus características organolépticas. El pH no varió. No hubo variación significativa en el porcentaje de fenoles. ($p > 0,05$). Del estudio de estabilidad acelerada, a temperatura de 50°C, se desnaturalizó. Del control de calidad microbiológico, la crema es conforme. Se concluye que la fórmula elegida tiene buenos atributos de estabilidad.

Palabras clave: *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", crema, estudios de pre-estabilidad, estabilidad, formulación.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha postulado que los productos fitoterapéuticos, debido a su naturaleza, merecen consideraciones y cuidados adicionales.¹ El principal problema para el uso y preparación de las formas farmacéuticas con extractos líquidos obtenidos a partir de plantas medicinales, es la estabilidad, ya que los mismos tienen una composición muy compleja y son, generalmente, sensibles a los cambios de temperatura, sufren reacciones fotolíticas y se oxidan con facilidad,¹ de ahí que la estabilidad se convierte en una característica de los medicamentos que debe garantizarse y que, por tanto, es un requisito fundamental que deben demostrar los fabricantes de un producto farmacéutico ante las autoridades sanitarias para la inscripción y comercialización del producto en el país.² Para el éxito terapéutico en el desarrollo de nuevas formulaciones en la Industria Farmacéutica, la forma farmacéutica debe ser estable, lo que hace que la evaluación de la estabilidad sea un factor fundamental. Esta puede medirse a través de un estudio de estabilidad acelerada, que tiene por objeto verificar, en condiciones específicas y controladas, la capacidad de un producto para mantener las mismas características y propiedades durante su vida útil.³

Los extractos son materias primas que contienen cantidades variables, pero siempre pequeñas, de principios activos y grandes cantidades de material secundario (sales orgánicas e inorgánicas, ácidos y bases orgánicas, saponinas, polifenoles, taninos, azúcares, polisacáridos, etc.); este material secundario puede afectar significativamente la tecnología de fabricación y la estabilidad de la forma farmacéutica.¹

Tomando en cuenta el estudio realizado *in vitro* de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" y como parte del desarrollo de esta forma farmacéutica semisólida con actividad antimicrobiana tópica,¹⁴ es necesario evaluar los parámetros físico - químicos y microbiológicos y su estabilidad acelerada en dos condiciones térmicas de

almacenamiento lo que se constituye como el objetivo principal de este trabajo. La fecha de expiración asignada a un producto farmacéutico es una aplicación e interpretación directa del conocimiento obtenido con el estudio sobre estabilidad. Bajo esta consideración, este trabajo buscará esclarecer o definir el tiempo de vida útil del producto a través del estudio de su perfil cinético, que finalmente garantice su éxito terapéutico.⁴

En este sentido, el tema de la estabilidad de los medicamentos se ha convertido en un tema trascendental para el farmacéutico, tanto para su desempeño en el área de la Tecnología Farmacéutica Industrial, en el desarrollo de productos farmacéuticos, como para el farmacéutico que se encarga de la distribución y de la dispensación de los medicamentos tanto en las farmacias institucionales, como en las farmacias de la comunidad.⁵

Es así que se decidió llevar a cabo su estudio en los Laboratorios de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga cuyos resultados quedan plasmados en este informe, como resultado de un estudio a nivel experimental para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo General

Desarrollar una formulación de crema a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

Objetivos Específicos

- Evaluar los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”
- Formular la crema a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.
- Evaluar los parámetros físico - químicos y microbiológicos de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.
- Evaluar la estabilidad acelerada de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

A continuación, se reportan estudios e investigaciones realizadas con el género *Calceolaria*:

Casanova,⁶ realizó un estudio sobre el extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformis* Subsp. *cuneiformis* “ayapa zapatum”, en el cual se determinó una buena actividad antioxidante y anti ulcerosa, debido a la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides y taninos, obteniéndose mejores resultados a la dosis de 125 µg/mL.

Del Solar,⁷ estudió la actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, en la que encontró que la crema al 0,5% con concentración de 100 µg/mL presentó mayor porcentaje de inhibición de radicales libres (99,46.±.0,11); respecto a las cremas al 1,0% y 2,0% que presentaron porcentajes de 99,10.±.0,46% y 96,45.±.0,53% respectivamente.

Romero y col,⁸ realizaron el tamizaje fitoquímico de la especie *Calceolaria engleriana* donde se demostró la presencia de compuestos fenólicos como: taninos, flavonoides y catequinas; los terpenoides como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y/o esteroides y las quinonas. Así mismo, reportan la actividad antibacteriana del extracto de las especies del género *Calceolaria*, frente a dos cepas gran positivas, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, tres cepas gran negativas *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy* y *Pseudomonas aeuriginosa* y finalmente una levadura *Candida albicans*, donde se observa que la especie *Calceolaria engleriana* y *Calceolaria cuneiformis*, son las que tiene mayor actividad antimicrobiana.

Harty y col,⁹ en un estudio sobre *Calceolaria chelidonioides* Humb, planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae, se aislaron flavonoides, apigenina,

quercetina y rutina, utilizando diferentes técnicas espectroscópicas. La evaluación de la actividad antioxidante, mediante el radical libre DPPH, mostró el siguiente orden con respecto a la energía para estas tres moléculas en la reducción de la molécula de DPPH: apigenina, rutina y quercetina (CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$ = $30,3 \pm 1,9$; $23,7 \pm 2,4$ y $18,8 \pm 2,1$), los flavonoides son bien conocidos antioxidantes y usando el DPPH.

De la Cruz,¹⁰ realizó un estudio donde la actividad antioxidante de *Calceolaria rupestris* Molau “romero” se determinó por el método de captación del radical libre DPPH, evaluándose a las concentraciones de 300 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$ y 900 $\mu\text{g/mL}$, a diluciones de 1, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de ellos respectivamente, expresándose los resultados como porcentaje de inhibición. Los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron a las diluciones de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ de la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ del extracto con un $98,8 \pm 0,65$; $99,0 \pm 0,46$ y $86,5 \pm 6,46$ y a la concentración de 600 $\mu\text{g/mL}$ a las diluciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ con un $98,0 \pm 0,37$ y $97,0 \pm 0,28$ de porcentaje de inhibición respectivamente.

Boza,¹¹ realizó la pre formulación de crema y ungüento a partir de un extracto seco de la corteza de *Mangifera indica* L. obteniendo el extracto por decocción y el secado por atomización, el polvo fino se caracterizó evaluando propiedades fisicoquímicas además de estudios de pre estabilidad en función del tiempo y del pH. Con el polvo se preparó un lote pequeño de crema y ungüento evaluándolos mediante procesos tecnológicos (pH, extensibilidad, propiedades organolépticas) y por la cuantificación del contenido químico de polifenoles totales. Obteniéndose que la crema contiene una cantidad adecuada de polifenoles totales para ser usada como antioxidante tópico o con fines antiinflamatorios.

Goyti,¹² realizó un estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, buddlejaceae “matico” y el diseño de la metodología analítica donde utilizó la estandarización química que permita la cuantificación de metabolitos activos por el método de Folin Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar donde obtiene una lectura de ETMAT otoño (extracto etanólico de hojas secas y molidas recolectadas en otoño) de $12,55 \pm 0,00$, ETMAT verano (extracto etanólico de hojas secas y molidas recolectadas en verano) de $17,19 \pm 0,57$, y EMG (extracto metanólico global de hojas secas y molidas recolectadas en verano) de $14,48 \pm 0,00$ donde refiere que este método de cuantificación solo da a conocer la concentración de fenoles totales hidrosolubles sin valorar

particularmente a aquellos metabolitos activos de interés farmacológico.

Mesa y col.¹³ realizaron un estudio sobre la estabilidad sobre acetato de hidrocortisona en formulaciones en forma de crema al 1% donde se sometieron a condiciones degradativas: medio ácido (HCl 1 M), medio alcalino (NaOH 0,1M) y condiciones oxidantes (H₂O₂ 3%) por periodos variables de tiempo y temperatura. Los productos de degradación se detectaron mediante técnicas de HPLC (Cromatografía Líquida de alta Resolución). Los resultados obtenidos permitieron valorar la estabilidad del acetato de hidrocortisona y su crema al 1%. Se propone un mecanismo de degradación de este principio activo en sus formulaciones.

Romaní,¹⁴ realizó un estudio *in vitro* sobre la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", en la que demostró que esta especie, bajo la forma de crema al 2%, posee un importante poder antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

2.2. *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"

2.2.1 Clasificación taxonómica de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Asteridae
Orden	:	Scrophulariales
Familia	:	Scrophulariaceae
Género	:	<i>Calceolaria</i>
Especie	:	<i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl.
Nombre vulgar:	:	"wawillay"

Fuente: Constancia emitida por el *Herbarium Huamangensis* (Anexo 1)

2.2.2 Características botánica de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"

Sub arbusto erecto que alcanza de 0,2 a 1,2 m de altura, ramas rojizo marrones poco ramificado, con inflorescencia en cimas terminales multiflorales y parte distales de las ramas finamente tomentosa, pelos ascendentes, hojas herbáceas o sub coriáceas, lanceoladas (raramente ovado estrechamente elíptica), aguda cuneada o redondeada en la base, márgenes enteros deflexos de 2,8 – 8,2 por 0,9 – 2,6 cm, de color verde olivo en ambos lados, haz tomentoso algo deslucido, envés pinnado venoso, las venas tomentosas, inter espacios glabros, glándulas sésiles inflorescencia compuesta de 1 - 2 pares de cimas de 8 flores, pedúnculos primarios de 2,3 - 10 cm, pedicelos 1 - 3 - 4 cm, la cima presenta

brácteas. Sépalo elíptico u ovado, de color amarillo limón, con pocos pelos glandulares en la cara externa, internamente con pelos cortos, corola profundamente amarilla con puntos amarillos en el interior de la garganta, labio superior 3 - 5 x 5 - 7 mm labio inferior porción incurvada 17 - 25 x 12 - 20 mm, estambres con anteras de color amarillo con tecas opuestas, con filamento estaminal corto, fruto cápsula ovoide acuminada y glandular.^{15, 16}

2.2.3 Estudio etnobotánico y etnofarmacológico

En la medicina popular la utilizan como tónico del estómago, agentes bactericidas y edulcorantes, se recomienda el agua del cocimiento de ramas y hojas.¹⁵

En cólicos menstruales ingerir infusiones de las hojas y flores, en problemas del riñón, circulación y várices, se recomienda masticar las hojas, también es útil como purificante de la sangre, en infecciones, reumatismo.¹⁶

2.2.4 Composición química

A partir de los extractos apolares se han aislado una serie de 55 nuevos diterpenos pertenecientes a seis tipos estructurales, naftoquinonas y flavonoides. Entre los diferentes diterpenos aislados cabe mencionar la presencia de ésteres de ácido malónico y bis-diterpenos. Cuatro nuevos compuestos de diterpenos se han aislado de las partes aéreas de *Calceolaria latifolia*, y sus estructuras fueron elucidadas por métodos espectroscópicos. Dos de ellos presentan un esqueleto de tipo pimaradieno y los otros dos, un esqueleto stemarano.¹⁷

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana*, reveló la presencia de azúcares reductores, catequinas, flavonoides, fenoles y taninos, quinonas y triterpenos y esteroides. En este mismo trabajo, además se menciona que se han aislado diterpenos de las partes aéreas de *Calceolaria petiolaris*, identificados como:

18-maloniloxi-9-epi-eti-7,15-pimaradieno, 18-hidroxi-9-epi-ent-7,15-pimaradieno, 18-acetoxi-9-epi-ent-7,15-pimaradieno y el Petiolato (un bis-diterpeno). De igual forma, naftoquinonas de las partes aéreas de *Calceolaria recta* y *Calceolaria paposana*. Se ha reportado, además, dos naftoquinonas de *Calceolaria andina*, identificadas como 2-(1,1-dimetilpro-2-enil)-3-hidroxi-1,4-naftoquinona y su correspondiente acetato, el 2-acetoxi-3-(1,1-dimetilpro-2-enil)-3-hidroxi-1,4-naftoquinona. Del estudio de 22 especies de la familia Scrophulariaceae se demostró la presencia de flavonas y flavonoles metoxilados.¹⁴

2.3. Flavonoides

Los flavonoides son fenoles de tipo diaril-propano ($\text{Ar-C}_3\text{-Ar}$) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar: están constituidos por un anillo bencénico condensado a una γ -pirona (o sus derivados) sustituida en posición 2 por un radical fenilo.¹⁸

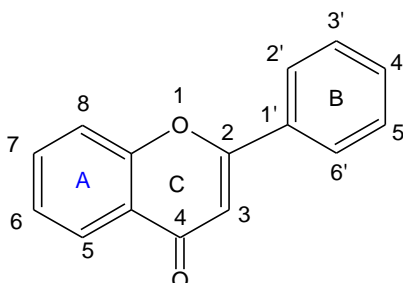


Figura 1. Núcleo básico de un flavonoide, 2-fenilbenzopirona.¹⁸

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, aún de las diferentes clases siendo esto último más común. Se hallan presentes en todas partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y las auronas. La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética. Destacaremos asimismo la actividad antibacteriana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas.¹⁹

2.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo considerable de compuestos que pueden definirse, de una forma concisa y desde el punto de vista químico como compuestos orgánicos presentes en la naturaleza que poseen, al menos, un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (esos grupos funcionales pueden ser sustituidos por ésteres, metil-éster, glicósidos, etc.), aunque una definición más precisa se basa en su origen metabólico como aquellas sustancias derivadas del metabolismo de la ruta del shikímico y de los fenilpropanoide.²⁰

2.5 Taninos

Taninos, bajo esta denominación se incluyen un grupo de derivados fenólicos poliméricos de distinto peso molecular. Se les ha asignado distinto efecto como estimulación de células fagocitarias, actividad antitumoral y un amplio espectro antibacteriano. Así pues, su acción antimicrobiana puede estar relacionada con

su capacidad para inactivar las adhesinas de microorganismos, enzimas, proteínas de transporte de la cubierta celular. Los estudios publicados¹² reflejan que los taninos también pueden ser tóxicos frente a hongos filamentosos y levaduras. Los taninos condensados son capaces de unirse a la pared celular de las bacterias presentes en el rumen de los herbívoros, impidiendo su crecimiento y actividad proteasa.²⁰

2.6 Cumarinas

Son compuestos fenólicos resultante de la fusión del anillo de benceno y una alfa pirona. Como grupo las cumarinas tienen propiedades antimicrobianas por su capacidad estimuladora de macrófagos que incide de forma directa en el proceso infeccioso. Algunas de ellas se han empleado por sus efectos antivíricos (warfarina), mientras que otras, como los ácidos hidroxinámicos, son inhibitorios de microorganismos gran positivos y las fitoalexinas, derivado hidroxilados de las cumarinas tienen actividad anti fúngica.²⁰

2.7 Proceso de atomización

En la industria la obtención de productos en polvo a partir de materiales líquidos se lleva a cabo por medio de un proceso de secado por atomización. El proceso de secado por atomización es capaz de transformar una disolución, una emulsión, una suspensión o una dispersión líquida en un producto totalmente seco y estable. Inicialmente, el líquido se introduce en el equipo por medio de una bomba y se atomiza, a continuación, se elimina el disolvente por medio de una corriente de aire caliente, y como paso final los equipos utilizados en la industria presentan compartimentos de deposición de estas partículas para que al final sean recogidos en un vaso o recipiente cerrado. Los bajos tiempos de residencia que se emplean y el efecto refrigerador debido a la evaporación, posibilita trabajar eficazmente con productos sensibles a la temperatura. Las ventajas frente a la liofilización son un rendimiento mayor, unos tiempos de procesamientos más cortos y su menor costo.²¹ El secado por atomización presenta tanto ventajas como inconvenientes:

Las principales ventajas del secado por atomización son:²¹

- Control de los parámetros de calidad del producto, así como especificaciones concretas.
- Los alimentos sensibles al calor, los productos biológicos, y los productos farmacéuticos se pueden secar a presión atmosférica y a bajas temperaturas. A veces, se emplea la atmósfera inerte.

- El secado por atomización permite la producción de grandes cantidades en la operación continua y con un equipo relativamente simple.
- El producto entra en contacto con las superficies del equipo en condiciones anhidras, simplificando así los problemas de la corrosión y de selección de materiales costoso en la construcción del equipo.
- Produce partículas relativamente uniformes, esféricas y con casi la misma proporción de compuestos que en la alimentación líquida.
- Puesto que la temperatura de funcionamiento del gas puede extenderse de 150 a 600 °C, la eficacia es comparable a la de otros tipos de secadores directos.

Las desventajas del secado por atomización son: ²¹

- Deficiente si se requiere un producto a granel de alta densidad.
- Una unidad diseñada para la atomización fina puede no poder producir un producto grueso, y viceversa.
- Para una capacidad dada, se necesita generalmente una evaporación mayor que con otros tipos de secadores.
- Hay una alta inversión inicial comparada a otros tipos de secadores continuos.

2.8 Estudios de formulación de formas farmacéuticas semisólidas

Los sistemas semisólidos satisfacen una exigencia de las preparaciones de aplicación tópica, ya que, en general, poseen buena adherencia, lo que hace que permanezcan sobre la superficie de aplicación por un tiempo razonable hasta que se elimine por lavado.²²

2.8.1 Clasificación

Todos los preparados de consistencia semisólida están, de hecho, englobados en la definición genérica de “pomadas”, pero a menudo se utilizan otras denominaciones más específicas, relacionadas con sus características fisicoquímicas y su consistencia más o menos blanda. Así, en la Farmacopea Europea se distinguen varias categorías de pomada.²²

a) Pomadas (propriadamente dichas);²² constan de un excipiente de una sola fase en el que se pueden dispersar sólidos o líquidos.

- Hidrófobas (lipófilas).
- Absorbentes de agua.
- Hidrófilas.

b) Cremas;²² son formas farmacéuticas multifásicas constituidas por dos fases,

una lipofílica y otra acuosa se clasifican en dos grandes grupos:

- Hidrófobas (Emulsiones w/o). La fase continua o externa es la fase lipófila debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo W/O.
 - Hidrófilas (Emulsiones o/w). La fase externa es de naturaleza acuosa debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo O/W, tales como jabones sódicos o trietanolamina, alcoholes grasos sulfatados y polisorbatos, a veces combinados en proporciones convenientes con tensoactivos tipo W/O.
- c) Pastas;** contienen elevadas proporciones de sólidos finamente dispersos en el excipiente por lo que, generalmente, su consistencia es bastante elevada y de bajo flujo, contienen polvos insolubles como óxido de zinc, almidón, caolín, talco (silicato de magnesio con trazas de aluminio). Son pomadas duras que contienen hasta un 50% de polvo.²²

2.8.2 Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos¹

Los conocimientos y las técnicas de fabricación de medicamentos, preparados a partir de sustancias activas obtenidas por vía sintética, son aplicables en un todo a los productos naturales puros. Los productos fitoterapéuticos, debido a su naturaleza, merecen consideraciones y cuidados adicionales. La formulación de extractos y tinturas en formas farmacéuticas no puede ser considerada como problema únicamente de la tecnología farmacéutica. En la formulación de productos fitoterapéuticos deben ser consideradas no solamente la solubilidad y la estabilidad de los principios activos, sino también las características de los componentes secundarios del extracto, como, por ejemplo, la higroscopicidad en las formas farmacéuticas sólidas o la baja solubilidad en las formas farmacéuticas líquidas. Prácticamente todas las formas farmacéuticas pueden ser preparadas a partir de extractos. En la selección de la forma farmacéutica de un producto fitoterapéutico, los aspectos principales que deben tenerse en cuenta son los siguientes:

- La forma debe ser aceptable para el paciente.
- La fórmula debe ser química y físicamente estable.
- El producto debe ser correctamente envasado.
- El producto debe estar exento de contaminación microbiana.
- El producto debe ser capaz de proporcionar una dosis correcta de la droga.
- El producto debe ser terapéuticamente eficaz.
- El proceso debe ser económico para la fabricación en gran escala.

- El producto debe tener una estabilidad adecuada.

La fabricación de formas farmacéuticas de productos fitoterapéuticos debe obedecer a las Buenas Prácticas de Manufactura. El fabricante debe elaborar los productos fitoterapéuticos garantizando que estos estén bajo la legislación vigente y debe asumir la responsabilidad por la calidad de cualquier producto por él elaborado.

2.9 Estudios de pre-formulación

El trabajo que abarca el conocimiento de las características básicas, tanto biofarmacéuticas como fisicoquímicas que van a influir en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento se conoce como estudios de pre-formulación.²²

Se define como la investigación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de un principio activo sólo o cuando se combina con excipientes, con el objetivo de generar información útil para la formulación en el desarrollo de una forma de dosificación estable y biodisponible. Es decir, ensayos realizados sobre un principio activo, concepción y desarrollo de una nueva preparación farmacéutica, primer paso en el desarrollo racional de una forma farmacéutica para un principio.²²

Por todo ello no es de extrañar que los estudios de formulación de un medicamento puedan durar varios años.²²

Comprenderá los siguientes pasos:²²

- Características del principio activo
- Características de la forma de dosificación
- Ensayos de estabilidad
- Parámetros de formulación y directrices para la producción
- Datos Biofarmacéuticos y Farmacocinéticos
- Condiciones de conservación y acondicionamiento
- Salud y prevención de accidentes.

2.10 Estabilidad

La estabilidad es la aptitud de un principio activo o de un producto para mantener sus propiedades originales dentro de las especificaciones relativas a su identidad, concentración o potencia, calidad, pureza y apariencia física.²³

a) Estudios de estabilidad preliminar

Es conocida también como prueba de selección o de corto plazo, tiene como objetivo auxiliar y orientar en la elección de las formulaciones. “El estudio de

estabilidad preliminar consiste en la realización de la prueba en la fase inicial del desarrollo del producto, utilizándose diferentes formulaciones de laboratorio y con duración reducida”. Se emplea condiciones extremas de temperatura con el fin de acelerar posibles reacciones entre sus componentes y el surgimiento de señales que deben ser observadas y analizadas conforme las características específicas de cada tipo de producto. Este estudio no estima la vida útil del producto, sino auxilia en la selección de las formulaciones.²⁴

b) Estudios de estabilidad

Conjunto de pruebas y ensayos a que se somete un producto en condiciones preestablecidas y que permitirá establecer su periodo de eficacia.²³

c) Estudios de estabilidad acelerada

El estudio de estabilidad acelerada es conocido también como estabilidad normal o exploratoria. La norma mexicana de estabilidad de fármacos y medicamentos NOM-073-SSA1 (2005), define a la estabilidad acelerada como “estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o de un medicamento”. Estos estudios son necesarios para asegurar la estabilidad de la formulación, determinar la forma de acondicionamiento más adecuada y estimar la caducidad del producto. Esta prueba es empleada también en la fase de desarrollo del producto utilizando lotes producidos en escala laboratorial y piloto de fabricación. Además, puede ser realizado cuando existan cambios significativos en ingredientes del producto y/o del proceso de fabricación, en el material de acondicionamiento que entra en contacto con el producto o, para validar nuevos equipamientos o fabricación por terceros. Antes de iniciar los estudios de estabilidad, se recomienda someter al producto a la prueba de centrifugación. Se sugiere centrifugar una muestra a 3.000 rpm durante 30 minutos. El producto debe permanecer estable y cualquier señal de inestabilidad indica la necesidad de reformulación. Si es aprobado en este ensayo, el producto puede ser sometido a las pruebas de estabilidad.²⁴

d) Estudios de estabilidad a largo plazo

Son estudios diseñados de las características físicas, químicas y microbiológicas, bajo condiciones de almacenamiento controladas durante el periodo de vida útil propuestas del producto, en el envase que se propone circular en el mercado.²³

e). Estudios de Pre-estabilidad

Estos estudios denominados también “estudios de predicción de la estabilidad”, se realizan primeramente con la materia prima o principio activo y en una segunda etapa con la forma terminada. Su objetivo fundamental es predecir el posible comportamiento del o los componentes de interés y son de vital importancia para el tecnólogo, pues le ayuda a definir los posibles pasos de la tecnología de elaboración de la forma terminada. Generalmente estos estudios se realizan durante el periodo de pre-formulación y tiene la ventaja que son estudios que se realizan en un corto tiempo y dan una abundante información.²³

Durante estos estudios se deben estudiar los siguientes parámetros:

Cuantificación de los principios activos: Se debe tener establecido antes de comenzar el estudio. Como método de análisis utilizar la cromatografía de placa fina, empleándose un sistema de fase móvil de cloroformo acetona (6:1), como fase estacionaria placas de Silicagel G F₂₅₄ y como revelador solución de p-dimetilaminobenzaldehído.²³

Influencia de la temperatura

Para conocer cómo influye este parámetro, se somete la muestra de interés a condiciones de temperatura elevada (entre 70 y 100 °C) durante un período de tiempo que puede oscilar entre los 7 y los 10 días.

Influencia de la humedad

Para la realización de esta experiencia se coloca la muestra en estudio en una cámara húmeda que posea un 100% de humedad relativa, durante un tiempo que puede estar entre los 7 y 15 días. Antes de comenzar el estudio se debe pesar la muestra y al finalizar la misma se debe realizar nuevamente la pesada.²³

Influencia de la humedad y el calor

Conocido como estudio “OMS”, el mismo consiste en realizar la experiencia anterior, con la diferencia de que la cámara húmeda debe ser colocada en una estufa con temperatura entre los 60 y 70 °C durante 7 días. Al igual que el caso anterior la muestra debe ser pesada antes y después de realizada la experiencia.

Influencia de la luz

Se coloca la muestra en un frasco transparente, cerrado herméticamente y se coloca a la luz solar durante 7 días.

Influencia del medio con y sin calor

En este estudio se realizan dos experiencias, con el objetivo de conocer cómo puede influir sobre el producto el pH del medio.

Influencia del pH

Para realizar esta experiencia la muestra debe ser colocada en condiciones extremas de pH. Para ello se toman cuatro tubos para ensayo con tapa de rosca y se coloca dentro de ellos la muestra de interés. Posteriormente a dos de ellos se le adicionan solución de ácido clorhídrico o sulfúrico 1 mol/L ($\text{pH} < 2$) y a los otros dos tubos se le adicionan solución de hidróxido de sodio 1 mol/L ($\text{pH} > 10$). Se colocan un tubo de cada uno de los medios en una estufa a 70 °C durante 72 horas y el otro tubo se deja a temperatura ambiente durante igual tiempo.

Influencia del medio oxidante y reductor

Se realiza la misma experiencia anterior con la diferencia de que se añade solución de peróxido de hidrogeno al 1% (medio oxidante) y de tiosulfato de sodio al 1% (medio reductor).

Una vez finalizada cada una de las experiencias anteriormente expuestas, se procede a realizar el análisis químico para conocer si hubo afectación o no sobre el principio activo de interés. Para ello se deben realizar las siguientes determinaciones:

Análisis de las características organolépticas: Nos permite conocer si hubo afectación física de la muestra.

Identificación de los principios activos y los productos de degradación: Se deben realizar dos o más métodos de identificación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El presente trabajo de investigación se ejecutó en la oficina farmacéutica MASPHERMA, en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2 Población y muestra

3.2.1. Población

El extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

3.2.2. Muestra

25 g del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

3.2.3. Unidad de análisis

01 frasco de crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

3.2.4. Sistema de muestreo

Libre por conveniencia

3.3 Procedimiento para la recolección de datos

3.3.1. Recolección y desecación de las hojas

Las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, fueron recolectadas al azar, en el Centro Poblado Waracca anexo Anchac–Huasi, en el distrito de Vinchos, luego fueron lavadas con hipoclorito de sodio, secadas a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte cada 24 horas y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, por un periodo de una semana, luego se procedió a deshojar para su posterior molienda.²⁵

3.3.2. Obtención del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

Las hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, fueron molidas utilizando un molino de martillo. Una cantidad de 965 g de muestra se sometieron a maceración con 1200 mL de etanol a 70° durante una semana. El percolado se hizo a razón de 20 gotas por minuto, luego se filtró repitiendo el proceso cinco veces. Las fracciones recolectadas se concentraron en baño maría a 40°C y se secó por atomización utilizando el Atomizador Mini Spray Dryer B-290 y el producto obtenido se envasó en un recipiente herméticamente cerrado, pues el extracto atomizado es muy higroscópico.²⁶

3.3.3. Identificación de compuestos químicos del extracto atomizado

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto atomizado de las hojas *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” fueron realizadas siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuéllar.²⁶

3.3.4. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del atomizado

Una vez obtenido el extracto atomizado, se evaluaron los siguientes parámetros físico – químicos:

a) Determinación de las características organolépticas²⁶

Color: Se colocó la muestra en un tubo de ensayo hasta las tres cuartas partes y se obtuvo el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

Olor: Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo e introdujo en un extremo de la muestra del ensayo. Determinando si corresponde con las características del producto.

Los términos para describir los olores de la droga son: aromático, aliáceo, alcanforado, nauseabundo, desagradable, a especia, etc.

Sabor: Se tomó una cantidad suficiente y se colocó en una luna reloj, luego hacer contacto con la lengua y determinar el tipo de sabor (dulce, amargo, ácido, salino, astringente, punzante, nauseabundo, aromático, etc.).

Aspecto: Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj, se observó y se determinó el aspecto de la muestra.²⁰

b) Determinación de la solubilidad

Para determinar la solubilidad de extracto seco se pesó un gramo de muestra y se vació en un tubo de ensayo, el cual se le adicionó 1 mL de disolvente (agua, alcohol o cloroformo), agitar y observar, en caso de no disolverse aumentar el disolvente a 10 mL, así sucesivamente para 30 mL, 100 mL, 1L y más de 10 L.²⁶

c) Determinación de pH

La medición del pH se llevó a cabo mediante el pH-metro Hanna Checker 1 (HI 98103), para ello se preparó una solución reguladora de pH, para rango de 0-7. Una vez preparada la solución reguladora, se ajustó el equipo al rango en que se realizó la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra.²⁷

d) Determinación del contenido de humedad

Se pesó 2 g de la muestra de ensayo con desviación permisible de 0,5 mg y se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada, seguidamente se desecó a 105 °C durante tres horas. La cápsula se colocó en la desecadora donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante una hora, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.²⁶

Cálculo:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Dónde:

Hg = Pérdida en peso por desecación (%)

M = Masa de la cápsula vacía (g)

M₁ = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M₂ = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

100 = Factor matemático.

e) Determinación del contenido de cenizas totales

Se pesó no menos de 2 g ni más de 3 g de la muestra de ensayo, con una desviación permisible de 0,5 mg en un crisol de porcelana o platino previamente tarado. Se calentó suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en una mufla a una temperatura de 700 a 750°C, durante dos horas. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 5 mg por gramo, para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.²⁶

Cálculo:

$$C = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Dónde:

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático.

3.3.5. Cuantificación de fenoles²⁸

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Singleton y Rossi. Con algunas modificaciones.

Procedimiento:

- Se transfirió 1 mL del extracto acuoso atomizado obtenido de la muestra, en una fiola de 25 mL.
- Seguidamente se agregó 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico Merck).
- Se agitó y luego se dejó en reposo por 5 minutos.
- Seguidamente se adicionó 10 mL de carbonato de sodio al 7%, y aforó con agua destilada a 25 mL.
- Después de 90 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente se procedió a realizar la lectura a una longitud de onda de 550 nm.
- Para realizar la curva de calibración se utilizó soluciones estándar de ácido caféico a concentraciones entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$, preparadas a las mismas condiciones antes mencionadas.(Anexo 10)
- Se preparó el blanco a las mismas condiciones que la muestra.

3.3.6. Formulación de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”

Para la elaboración de la crema a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, se tomaron tres formulaciones de diferentes composiciones de los excipientes para evaluar sus características que estas presentan y la óptima incorporación del atomizado como principio activo al 2%, de las cuales se eligió la segunda formulación por presentar mejores características organolépticas y fisicoquímicas. A continuación, se detallan las fórmulas utilizadas en el proceso de elaboración de la crema.²⁹

Tabla 1. Elaboración de la crema base.

Componentes	BASE (Cantidad g)		
	A	B	C
Lanett SX	15,0	-	-
Lanett N	-	15,0	-
Alcohol cetílico	-	-	15,0
Vaselina liquida	10,0	10,0	10,0
Parabenos	1,0	1,0	1,0
Propilenglicol	5,0	5,0	5,0
Butilhidroxitolueno BHT	0,025	0,025	0,025
Lauril sulfato de sodio	-	-	2,0
Agua c.s.p	100,0	100,0	100,0

Formulación de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”

a) Fórmula 1

Ingrediente Farmacéutico Activo y/o excipientes	Cantidad (%)
Extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl “wawillay”	2,0
Propilenglicol	2,0
Agua purificada	10,0
Crema base A c.s.p	30,0

b) Fórmula 2

Ingrediente Farmacéutico Activo y/o excipientes	Cantidad (%)
Extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl “wawillay”	2,0
Propilenglicol	2,0
Agua purificada	10,0
Crema base B c.s.p	30,0

c) Fórmula 3

Ingrediente Farmacéutico Activo y/o excipientes	Cantidad (%)
Extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl “wawillay”	2,0
Propilenglicol	2,0
Agua purificada	10,0
Crema base C c.s.p	30,0

Las cremas bases se elaboraron acorde las técnicas conocidas.²⁹

3.3.7. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de la crema

a) Determinación de las características organolépticas

Olor: Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj se

percibió el olor y determino el tipo de olor. Los términos para describir los olores de la crema fueron: aromáticos, aliáceo, alcanforado, nauseabundo, desagradable, a especia, etc.³⁰

Color: Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en un tubo de ensayo, este se colocó en un fondo blanco, se observó el color y determinó el tipo de color.³⁰

Aspecto: Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj, se observó y se determinó el aspecto de la muestra.³⁰

b) Determinación de las características físicas

Determinación del tipo de emulsión o signo de emulsión

Método de dilución: En dos tubos de ensayo se colocó 1 a 5 mL de emulsión, a uno de ellos se agregó 5 mL de agua y al otro 5mL de alcohol, se mezcló y se observó.

El tubo que presenta un aspecto homogéneo indica la fase externa de la emulsión, es decir, si presenta una dispersión homogénea en agua la fase externa es acuosa (O/W) y si es homogénea en vaselina o alcohol la fase externa es oleosa (W/O).³¹

Influencia de la temperatura

Para conocer cómo influye este parámetro, sometimos la crema de interés acondicionado en un frasco de plástico a temperatura ambiente (entre 20 - 25 °C) durante un período de tiempo de 1 y 30 días. Pasado este tiempo se valoró la crema formulada por el método de Singleton y Rossi.²⁸, pesando 1 g de la crema en estudio en un vaso de precipitado y agregamos 25 mL de metanol, filtramos y con el filtrado preparamos diluciones para llegar a las concentraciones deseadas, luego tomamos 1 mL del filtrado y se realizó la valoración para su cuantificación.³³

Determinación del índice de extensibilidad: Para realizar este ensayo se utilizaron dos placas de cristal (10 x 10 cm.) entre las cuales se colocó una cantidad pesada del preparado (por ejemplo = 1 g), trabajar a una variación de temperatura de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Se colocó la placa inferior de cristal sobre una hoja de papel milimetrado. Se recuadra la placa y se trazan las diagonales, se colocó la muestra del preparado sobre el punto de intersección. Se pesó la placa superior y se sitúa sobre la inferior. Pasado un determinado tiempo (1 minuto), y por efecto de la presión, la preparación se habrá extendido de forma aproximadamente circular. Se anotó los valores de los dos diámetros y se

calculó el diámetro medio y a partir de éste, se calculó la superficie del círculo formado. Se repitió esta operación con sucesivos pesos de 50, 100, 200 y 500 g, colocados en el centro de la placa.

Se representó la extensibilidad en mm^2 ($\text{Área} = \pi(d/2)^2$) frente a los pesos empleados.³¹

Determinación del pH: Se pesa 1 g de muestra, se coloca en un tubo de ensayo y se adiciona 2 mL de agua destilada, se diluye y se mide el pH sumergiendo la tira reactiva marca MACHEREY-NAGEL con escala de 0 al 6 pH ácido, 7 pH neutro, y de 8 al 14 pH básico en la muestra a evaluar, después de 2 minutos cuando el color de la tira haya cambiado, se comparó con el patrón de coloración impreso en la caja y se le asignó un valor de pH.²⁴

Cuantificación de fenoles

Se valoró la crema formulada por el método de Singleton y Rossi.²⁸, pesando 1 g de la crema en estudio en un vaso de precipitado y agregamos 25 mL de metanol, filtramos y con el filtrado preparamos diluciones para llegar a las concentraciones deseadas, luego tomamos 1 mL del filtrado y se realizó la valoración para su cuantificación para cada periodo de evaluación.³³

3.3.8. Control de calidad microbiológico de la crema

Para la determinación de bacterias coliformes y *Escherichia coli* se usó la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable ó NMP).³²

a) Determinación de *Escherichia coli*

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del número más probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas, utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utilizó es el caldo Lauril Sulfato de Sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentran presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante.

La determinación del número más probable de microorganismos coliformes

totales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 horas.³²

Prueba presuntiva³²

- Se agitó la muestra y transfirió volúmenes de acuerdo con el Anexo 15, a cada uno de los tubos con caldo lauril sulfato de sodio que se seleccionaron. Se agitó los tubos para homogenizar la muestra.
- Se Incubó los tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Luego se examinó los tubos a las 24 horas y observó si hubo formación de gas (desplazamiento del medio en la campana de Durham); al no observar producción de gas, se incubó 24 horas más.

Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales³²

- Se transfirió de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva, en este caso no hubo tubos positivos, pero se siguió el procedimiento para descartar la presencia de microorganismos en la formulación, a otro tubo que contiene caldo de bilis verde brillante (brilla), con campana de Durham.
- Se agitó los tubos para su homogenización.
- Se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. durante 24 a 48 horas.
- Se registró como positivos aquellos tubos en donde se observó turbidez (crecimiento) y producción de gas después de un periodo de incubación de 24 a 48 horas.
- Al no observarse turbidez ni producción de gas después del periodo de incubación se decidió realizar el plaqueado en placas activadas de agar levine para un descarte más determinante de bacterias coliformes totales que puedan estar presentes en la formulación de la crema.
- Se consultó con el anexo 17, de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes totales/100 MI.

3.4 Tipo y diseño de investigación

3.4.1. Tipo de Investigación

Pre – experimental³⁴

3.4.2. Diseño de Investigación³⁴

Diseño de prueba con tres grupos.

G₁	O₁	X	O₁
G₂	O₂	X	O₂
G₃	O₃	X	O₃

G: Grupos de sujetos (G_1 , grupo₁; G_2 grupo₂; etc.)

X: Tratamiento, estímulo o condición experimental.

O: Medición experimental.

3.5 Análisis de datos.

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa Microsoft Excel. Los datos cualitativos como las características organolépticas, se reportó en cuadros. Para los datos de pH, extensibilidad y cuantificación de fenoles se calculó la media y el error estándar de la media. Los resultados de control microbiológico como unidades formadoras de colonias (UFC) se reportó en cuadros. Se realizó la prueba de student para los valores de pH, extensibilidad y porcentaje de fenoles con un nivel de significancia estadística de 0,05 para comparar los valores al inicio y al final del estudio de la evaluación de la estabilidad.

IV. RESULTADOS

Tabla 2. Características fisicoquímicas del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.

Parámetros	Ensayos	Resultados
Organoléptico	Color	Marrón claro
	Olor	Sui generis
	Sabor	Amargo
	Aspecto	Polvo fino homogéneo
Solubilidad	Agua	Bastante soluble
	Etanol	Soluble
pH	Extracto hidroalcohólico	5,34
Humedad	Pérdida por desecación	6,75%
Sustancias solubles	Sustancias extraíbles	20,97%
Cenizas	Cenizas totales	5,24%
Rendimiento	Sólidos totales	9,37%

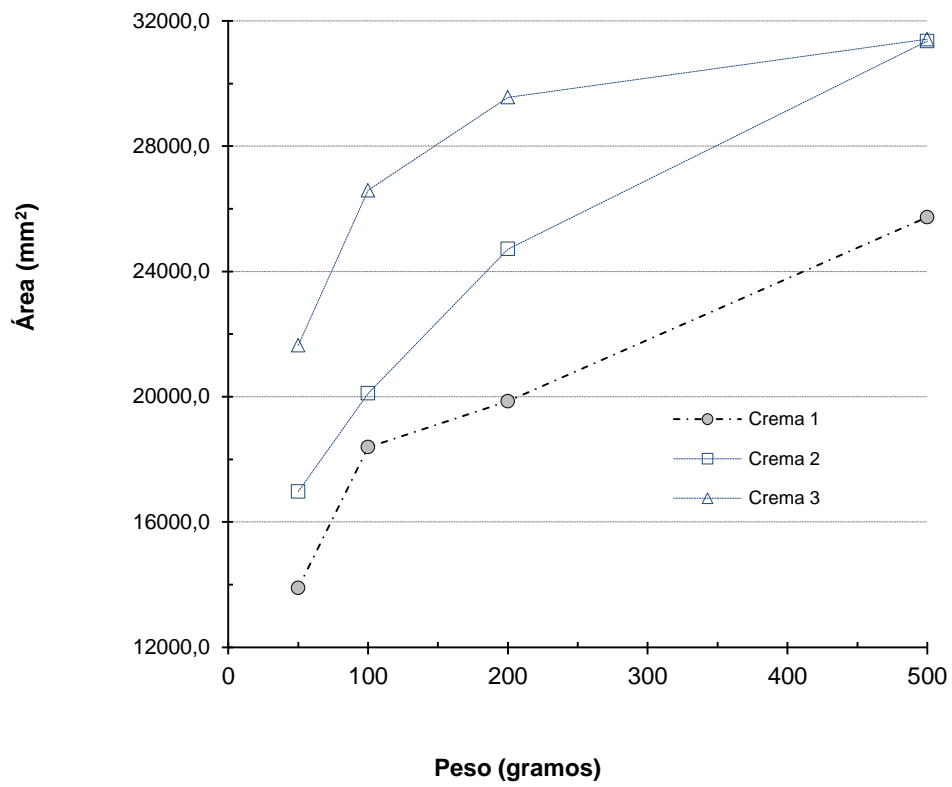
Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Romaní, 2012.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Azúcares reductores	Fehling	+++	Precipitado rojo
Catequinas	Catequinas	++	Mancha verde carmelita a luz UV
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Saponinas	Espuma	+++	Si hay presencia de espuma
Resinas	Resinas	++	Presencia de precipitado
Flavonoides	Shinoda	++	Fase amílica de color amarillo intenso
	NaOH 20%	++	Color naranja
	H ₂ SO ₄ (c)	++	Color amarillo
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde (no son hidrosolubles)
Quinonas	Borntrager	++	Presencia de un color rosado
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann - Burchard	+++	Interfase color rojizo

(-) : Ausente(+): Escasa (++) : Buena (+++) : Excelente

Tabla 4. Parámetros de evaluación de las cremas elaboradas a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”. Ayacucho, 2014.

Parámetros de evaluación	Cremas elaboradas		
	Crema 1	Crema 2	Crema 3
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Color	Beige claro	Beige claro	Beige claro
Olor	Sui generis	Sui generis	Sui generis
Consistencia	Moderada	Moderada	Moderada
pH	6,04	6,13	5,93
Extensibilidad	19466,1 mm ²	23287,0 mm ²	27302,0 mm ²
Centrifugado	Cumple	Cumple	Cumple



($p > 0,05$) no significativo

Figura 2. Extensibilidad de las cremas elaboradas a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.

Tabla 5. Parámetros de evaluación por día de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”. Ayacucho, 2014.

Parámetro	Día 1	Día 7	Día 15	Día 21	Día 30
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Color	Beige Claro	Beige Claro	Beige Claro	Beige Claro	Beige Claro
Textura	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave
Olor	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>
Consistencia	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
pH	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Extensibilidad	14919,5 mm ²	-	-	-	14402,7 mm ²
Centrifugado	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple

Tabla 6. Estabilidad térmica por día de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.

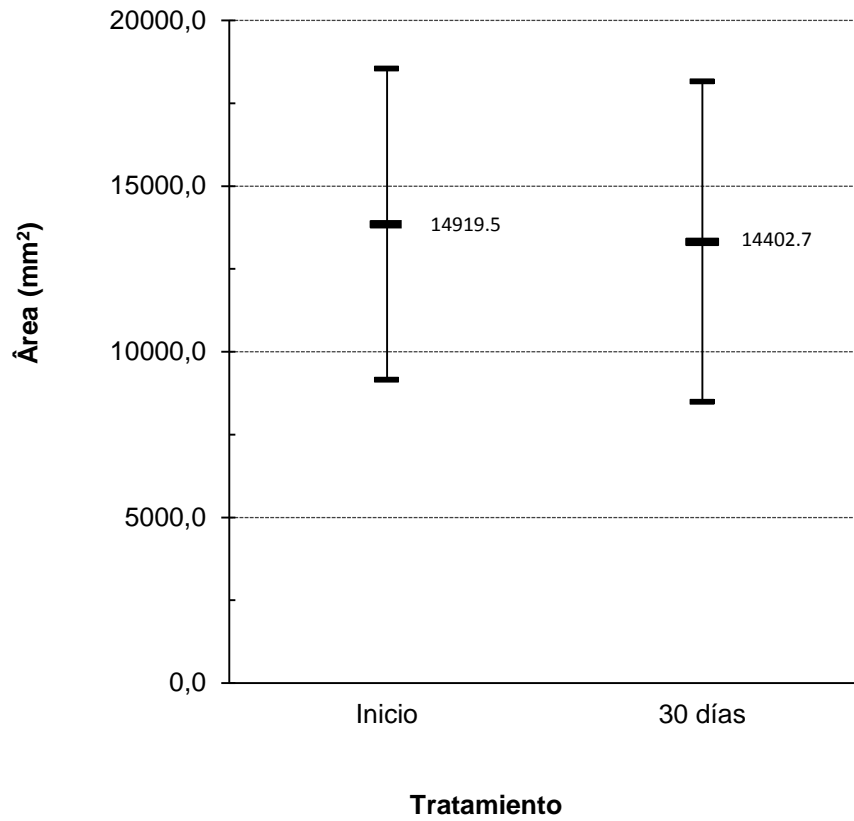
Temperatura	Día 1	Día 7	Día 15	Día 21	Día 30
Ambiente 20-25°C	Estable	Estable	Estable	Estable	Estable
30°C	Estable	Estable	Estable	Estable	Estable
50°C	Estable	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable

Tabla 7. Pérdida por evaporación por día de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”. Ayacucho, 2014.

Días	Día 1	Día 7	Día 15	Día 21	Día 30
Muestra (g)	19,3055 g	19,2949 g	19,2844 g	19,2738 g	19,2634 g
Pérdida por evaporación.	-	0,0106 g	0,0105 g	0,0106 g	0,0104 g

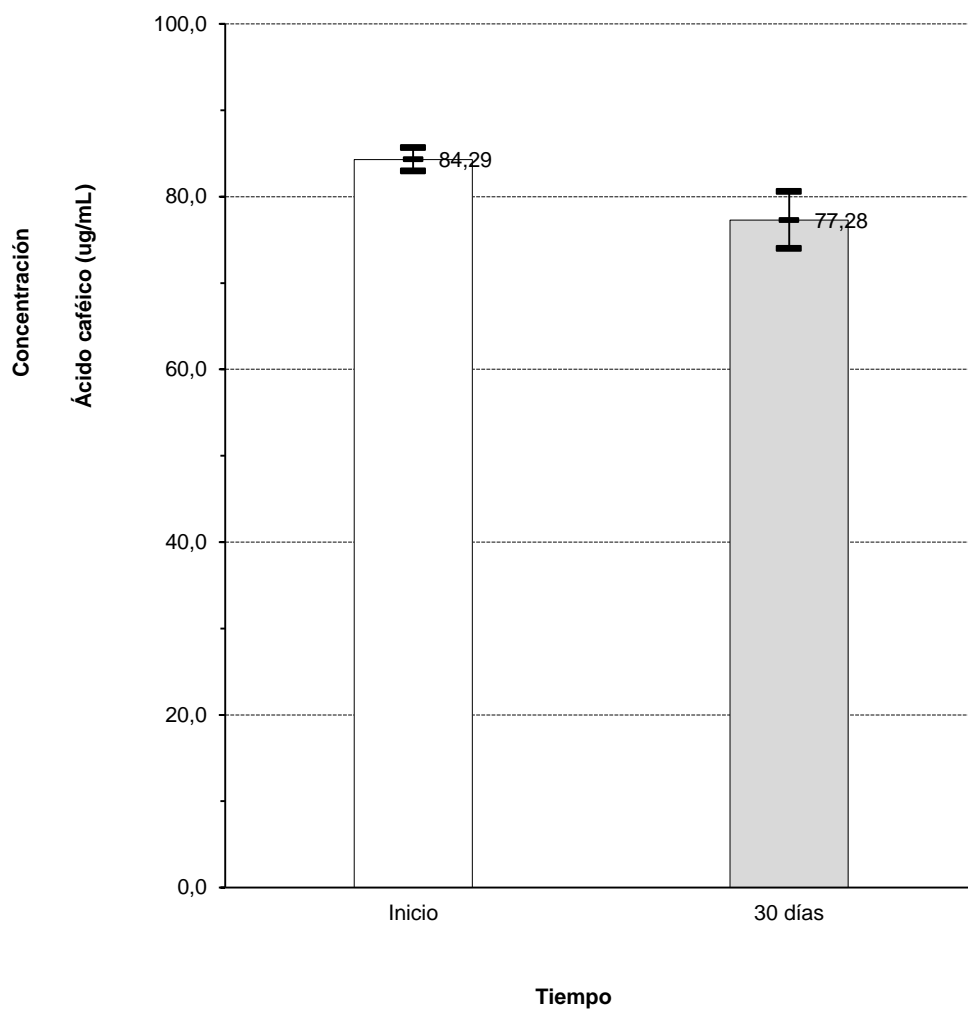
Tabla 8. Control microbiológico de la crema 2, elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" al inicio y final del estudio. Ayacucho, 2014.

Nº de tubos positivos	NMP/100 mL	95% de límite de confianza		Inicio	30 Días
		Inferior	Superior		
0	<1,1	0	3,0	Ausente	Ausente
1	1,1	0,05	6,3	Ausente	Ausente
2	2,6	0,3	9,6	Ausente	Ausente
3	4,6	0,8	14,7	Ausente	Ausente
4	8,0	1,7	26,4	Ausente	Ausente
5	>8,0	4,0	infinito	Ausente	Ausente



$T_{\text{calculado}} = 0,4944$, $T_{\text{tabla}} = 2,47$, $p > 0,05$

Figura 3. Extensibilidad de la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" frente al peso aplicado, en función al tiempo inicial y final. Ayacucho, 2014.



$$T_{\text{calculado}} = 0,36, T_{\text{tabla}} = 2,57$$

$T_c < T_t$, no existe diferencia significativa

Figura 4. Cuantificación de fenoles en la crema 2 elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", en un estudio de estabilidad de un mes. Ayacucho, 2014.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se buscó realizar una formulación semisólida a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" a una concentración de 2%, ya que a dicha concentración la crema posee mayor efecto antibacteriano tal como lo demostró Romani.¹⁴ Las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" fueron recolectadas en el centro poblado de Anchac-wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

Para la obtención del extracto atomizado de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" se siguió el protocolo descrito por Sharapin N.¹ mostrando que el extracto atomizado obtenido de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" es un producto de calidad que cumple con los parámetros mencionados.

En la Tabla 2, se presentan los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado con un color marrón claro, olor aromático, sabor amargo, aspecto de polvo fino homogéneo, soluble en metanol y bastante soluble en agua, pH de 5,34; humedad de 6,75% y ceniza de 5,24%. Según Kuklinski,³⁵ la solubilidad depende de la forma en que se encuentran: aglicones libres: son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en disolventes orgánicos ya sean polares o apolares. Heterósidos: son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólica e insolubles en disolventes orgánicos apolares.

De las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" se obtuvo un extracto atomizado con un porcentaje de rendimiento de 9,37%, es decir de 965 g de hojas secas se obtiene 90,58 g de extracto atomizado.

En la Tabla 3, se presentan los compuestos químicos identificados del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"¹⁴ siendo estos: azúcares reductores, catequinas, cumarinas, saponinas, resinas, flavonoides, fenoles, taninos, quinonas, triterpenos y esteroides. Según Del

Solar,⁷ se identificaron los siguientes metabolitos secundarios flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides y quinonas en el género *Calceolaria*. De la Cruz,¹⁰ refiere que los flavonoides (presentes en el género *Calceolaria*), como los ácidos fenólicos demuestran ser fuertes atrapadores de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición.

Fauli,³⁰ menciona que un estudio de formulación debe ir precedido del conocimiento de determinadas propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas del principio activo y las influencias sobre los excipientes y en el proceso tecnológico determina las cualidades fundamentales del medicamento que son eficacia, seguridad y estabilidad.

En el presente estudio esta situación es crítica, debido a la higroscopicidad inherente del extracto atomizado y a la cantidad de extracto añadido. Las medidas utilizadas para evitar estos inconvenientes es adecuar un área de trabajo, controlando el porcentaje de humedad en el medio.

En la presente investigación se elaboró tres fórmulas de crema al 2% a base de extracto acuoso atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Se varió la composición en excipientes y los resultados de su evaluación se muestran en la Tabla 4. Observamos que en las tres fórmulas vemos que el color y olor se mantienen uniformes; no presentan variación alguna en sus características. En cuanto al aspecto que estas presentan observamos que la fórmula 1, presenta un aspecto homogéneo pero espeso debido a la utilización de cera Lanett SX(15%), que actúa como agente tensoactivo y le da volumen a la crema en combinación con la vaselina líquida (10%) por lo que dicha fórmula por la evaluación del índice de extensibilidad fue descartada, la fórmula 3, presenta un aspecto homogéneo pero líquido debido a la utilización de alcohol cetílico (15%) que actúa como agente espesante y vaselina líquida (10%) a comparación de la formulación 2 donde no se utilizó alcohol cetílico y también por la evaluación del índice de extensibilidad se descartó esta formulación. Para seleccionar la mejor fórmula, se evaluó diferentes parámetros descritos en la Tabla 4 y la óptima incorporación del principio activo al 2% en las tres fórmulas. Respecto a la extensibilidad estas se midieron de acuerdo al procedimiento indicado donde los resultados para las fórmulas 1, 2 y 3 fueron 19466,1 mm², 23287,0 mm²; 27302,0 mm² respectivamente donde se observa que la fórmula 2 responde mejor a esta prueba. Respecto al peso promedio estas se midieron de

acuerdo al procedimiento indicado donde los resultados para las fórmulas 1, 2 y 3 fueron 19,32 g, 19,20 g, 18,98 g respectivamente donde se observa que no hay variación en cuanto a pesos entre una fórmula a otra esta debido a la precisión en el envasado. Respecto al pH, la formulación 1, 2 y 3 presentan pH ácidos 6.04, 6.13 y 5,93 respectivamente donde se observa que la fórmula 2 presenta un pH de 6,13 que es ligeramente ácido; este pH responde mejor para otros productos cosméticos como champús o productos para el cuidado del cuero cabelludo que van desde 4,0-5,5; en este caso se recomienda ajustar el pH de esta formulación de acuerdo a la zona del cuerpo donde se va a utilizar.

Evaluados los parámetros establecidos y presentados en la Tabla 4, se eligió a la fórmula 2 por presentar mejores características organolépticas y fisicoquímicas. Por lo tanto, se procedió a realizar los ensayos de pre-estabilidad a dicha fórmula cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.

Se realizó un estudio de pre estabilidad, sometiendo la fórmula 2 a diferentes condiciones de temperatura (30°C y ambiente 20-25°C) y periodos de tiempo. Esta exposición se realizó en un tiempo inicial y un mes, luego del cual se procedió a evaluar sus características organolépticas y fisicoquímicas.

En la Tabla 5, se presentan los datos de la variación de las características organolépticas de la fórmula 2. Podemos observar, que en todos los casos se observa que tanto el color como el olor se mantienen; presentando un color beige claro y un olor aromático, un aspecto homogéneo suave al inicio y al final. Respecto a los valores de extensibilidad, no hubo variación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los valores al inicio (14919,5 mm²) y luego de un mes se observa (14402.7mm²), respecto al pH se observa que al inicio presenta un pH de 6,00 y después de un mes presenta un pH de 6,00 donde tampoco presenta variación estadísticamente significativa ($p > 0,05$)

En la Tabla 7 se presentan los datos respecto al peso promedio se observa que al inicio (19,31 g) y después de un mes (19,26 g) no presentan variación estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En la Figura 3, se presenta los resultados de la variación del índice de extensibilidad de la crema 2 al inicio, y a los 30 días respectivamente donde observamos que no existe variación estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En la Tabla 7, se presenta los resultados de la variación del peso promedio de la crema 2 al inicio, día 7, día 15, día 21 y a los 30 días respectivamente donde observamos que no existe variación estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En la Tabla 5, se presenta los resultados de la variación del pH de la crema 2 al inicio, día 7, día 15, día 21 y a los 30 días respectivamente donde observamos que tampoco existe variación estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En la Figura 4, se presenta los resultados de cuantificación de fenoles en la crema 2 en un estudio de pre-estabilidad a temperatura ambiente (20-25°C), donde observamos que presenta un $t = 0,36$ que es menor que el $Tt = 2,57$ el cual nos indica que no existe variación significativa de la concentración de ácido caféico al inicio y a los 30 días de evaluación ($p > 0,05$).

En la tabla 8, se presenta los resultados del control microbiológico de la crema (fórmula 2), donde se observa la ausencia de bacterias coliformes totales, debido a la presencia de preservantes en la composición de la fórmula 2 como es el metilparabeno y propilparabeno que son excelentes antibacterianos y principalmente responde bien como fungicidas.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto atomizado tiene un olor aromático, sabor amargo, es de color marrón claro y tiene un aspecto de polvo fino homogéneo. Es muy soluble en agua, el pH es igual a 5,34; con una humedad de 6,75%; cenizas 5,24%; un rendimiento de 9,37% y con un porcentaje de fenoles de $84,84 \pm 0,06\%$.
2. Se determinó que la fórmula 2 fue la más adecuada para la formulación de la crema al 2% a base de extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" por las características que esta presentaba al incorporar el atomizado de manera óptima.
3. La crema al 2% elaborada a base de extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" elegida (crema 2), presentó un aspecto homogéneo, de color beige claro, aromático y un pH de 6,13. Del control de calidad microbiológico, la crema es conforme por presentar lecturas ausentes de bacterias coliformes y *Escherichia coli*.
4. Del estudio de estabilidad acelerada, se sometió a la crema en estudio a temperatura ambiente 20-25°C, 30°C y 50°C por 1, 7, 15, 21 y 30 días. No hubo variación estadísticamente significativa en la evaluación de los parámetros organolépticos y fisicoquímicos a temperatura ambiente y 30°C, Así mismo se observó desnaturalización de la crema expuesta a temperatura de 50°C. Los resultados de cuantificación de fenoles totales presentes en la crema, en un estudio de estabilidad acelerada a temperatura ambiente por 1 y 30 días, vemos que presenta un $t=0,36$ donde no hubo variación estadísticamente significativa en los porcentajes de ácido caféico frente a un $Tt=2,57$.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio de estabilidad a largo plazo de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" para asegurar su calidad.
2. Realizar estudios clínicos y farmacológicos para evaluar la eficacia y seguridad de la crema a base del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Sharapin N.** Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. 1ª ed. Colombia: CYTED. 2000.
2. **Rodríguez J, Escalona J, Lafoucade A.** Estudio de estabilidad química acelerada de las tabletas de *Tamarindus indica* L. Revista Cubana de Química. 2011; 23(1):9-16.
3. **Soler R, Rodríguez Y, Pérez T, Riverón Y, Morales I.** Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) para heridas y quemaduras. Revista Cubana de Farmacia. 2011; 45(4):563-574.
4. **Gennaro AR.** Remington Farmacia. 19 ed., Vol.2, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999.
5. **Fonseca L, Berrocal L.** Cinética Química Aplicada. Procesos de descomposición de los fármacos. Estabilidad de medicamentos. San José: Fondo Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2004.
6. **Casanova G.** Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* RLP Subsp. *cuneiformes* "ayapa zapatum" [Tesis Pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2004.
7. **Del Solar C.** Actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" [Tesis Pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2012.
8. **Romero M, Cesar M, Enrique A.** Aspectos Botánicos, Fitoquímico, Antibacteriano y producción del Genero *Calceolaria* en la provincia de Huamanga-Ayacucho. 2009.
9. **Harty M, Falcao D, Meneses F.** Flavonoids isolated from *Calceolaria chelidonioides* with antioxidant activity. TCDJPPS. [artículo en internet] 2010. [acceso agosto 2015]; 1(1): 4-7.
10. **De la Cruz M.** Actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", [tesis]. Ayacucho. UNSCH; 2012.
11. **Boza A.** Pre formulación de crema y ungüento a partir de un extracto seco de la corteza de *Mangifera indica* L. Centro de Química Farmacéutica ciudad de la Habana Cuba información tecnológica vol. 11 N° 4 2000. Pp 125-131 [acceso abril 2015]; Disponible en: <https://books.google.com.pe/>
12. **Goyti L.** estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, budlejaceae, "matico" y diseño de la metodología analítica. Departamento de química farmacológica y toxicológica, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 2007. Revista en internet (acceso agosto del 2015) disponible en: repositorio.uchile.cl/handle/2250/105643.
13. **Mesa J, Garcia O, Tacoronte J, Perez N.** Estabilidad del acetato de hidrocortisona en formulaciones en forma de crema al 1%. Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas, vol. 38, num. 4, octubre-diciembre 2007, pp. 37-41. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C. Distrito Federal México. Revista en internet (acceso agosto del 2015) disponible en: redalyc.org/articulo.oa?id=57938406.
14. **Romaní P.** Actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". [Tesis Pregrado]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2012.
15. **Garbarino JA, Chamy MC, Piovano M.** Chemistry of the *Calceolaria* genus. Structural and biological aspects. Molecules. 2000; 5(3):302-303.
16. **Pietrellini F.** Las plantas medicinales en un piso alto y meso andino. Ayacucho: HUITCO; 2007.

17. **Garbarino JA, Molinari A.** Diterpenes from *Calceolaria latifolia* Phytochemistry.1990; 29(9):3037-3039.
18. **Bruneton J.** Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 2ªed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2001.
19. **Lock O.** Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. 2ª ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994.
20. **Villar Del Fresno M.** Farmacognosia general. Editorial Síntesis. España. 1999.
21. **Lozano Berna M.** Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización [Tesis Pregrado]. Universidad Politécnica de Cartagena. Colombia. 2009 [Acceso el 14 de mayo.de.2015]...Disponible.en.URL: <http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/954/1/pfc3022.pdf>.
22. **Vila JL.** Tecnología farmacéutica. Formas farmacéuticas. Vol. II. Madrid: Editorial Síntesis; 1997
23. **MINSA.** Directiva Sanitaria N° 031 – MINSA/DIGEMID V. 01. Directiva Sanitaria que reglamenta los estudios de estabilidad de medicamentos; 2009
24. **Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria.** Guía de estabilidad de productos cosméticos. Primera Edición. [revista en internet]; Brasil; 2004[acceso abril 2015] disponible en: www.anvisa.gov.br/esp/cosmeticos/guia_serie_tematica_cosmeticos_espanhol.pdf.
25. **Organización Mundial de la Salud.** Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección de Plantas Medicinales. Directrices de un Grupo Científico de la OMS. Ginebra: OMS; 2003.
26. **Miranda M, Cuéllar A.** Manual de Prácticas de laboratorio. Farmacognosia y Productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la Habana: Editorial Félix Varela; 2000.
27. **Miranda M.** Métodos de análisis de drogas y extractos. La Habana – Cuba; Universidad de la Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos. 2002.
28. **Singleton V, Rossi A.** colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic [revista en internet] 1965. [acceso abril 2015] 16: 144-158. Disponible en: <http://ajevonline.org/content/16/3/144.abstract>
29. **Oficina Farmacéutica de Cadena de Boticas QF.** (2012) Procedimiento de Operación Estándar; Fabricación de Productos semisólidos no Estériles. Lima; 2015.
30. **Fauli Trillo C.** Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Ed. Luzán 5 S.A; 1993.
31. **Paniagua J.** Formulación y evaluación de la actividad antiinflamatoria de la crema y gel elaborado a base de extracto atomizado de la corteza de la *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. “uña de gato”. [tesis]. Ayacucho. UNSCH. Ayacucho. 2008.
32. **Camacho A.** Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos 2da Edición, Facultad de Ingeniería Química. UNAM México; 2009.
33. **Heberlé G.** Cosmetic formulations containing blueberry extracts (*Vaccinium myrtillus*). Center for biological activity and health sciences univates - Rs Brazil, Joan vernikos aerospace pharmacy laboratory – microgravity centre – Pucrs – Brazil January, Volume 2, Issue I. Brazil-2012.
34. **Hernández R.** Fernández C. Baptista L. Metodología de la Investigación Científica. 4º Ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.35.
35. **Kuklinski C.** Farmacognosia. 1ª ed. España: Omega; 2000

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación de la *Calceolaria engleriana* Kraenzl
"wawillay" Ayacucho -2014



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que el Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Sr. Walter Kike, MARTÍNEZ TINEO**, ha
solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	SCROPHULARIACEAE
GENERO	:	Calceolaria
ESPECIE	:	<i>Calceolaria engleriana</i>. Kraenzl
N.V.	:	"wawillay"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para
los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 22 de Noviembre del 2014

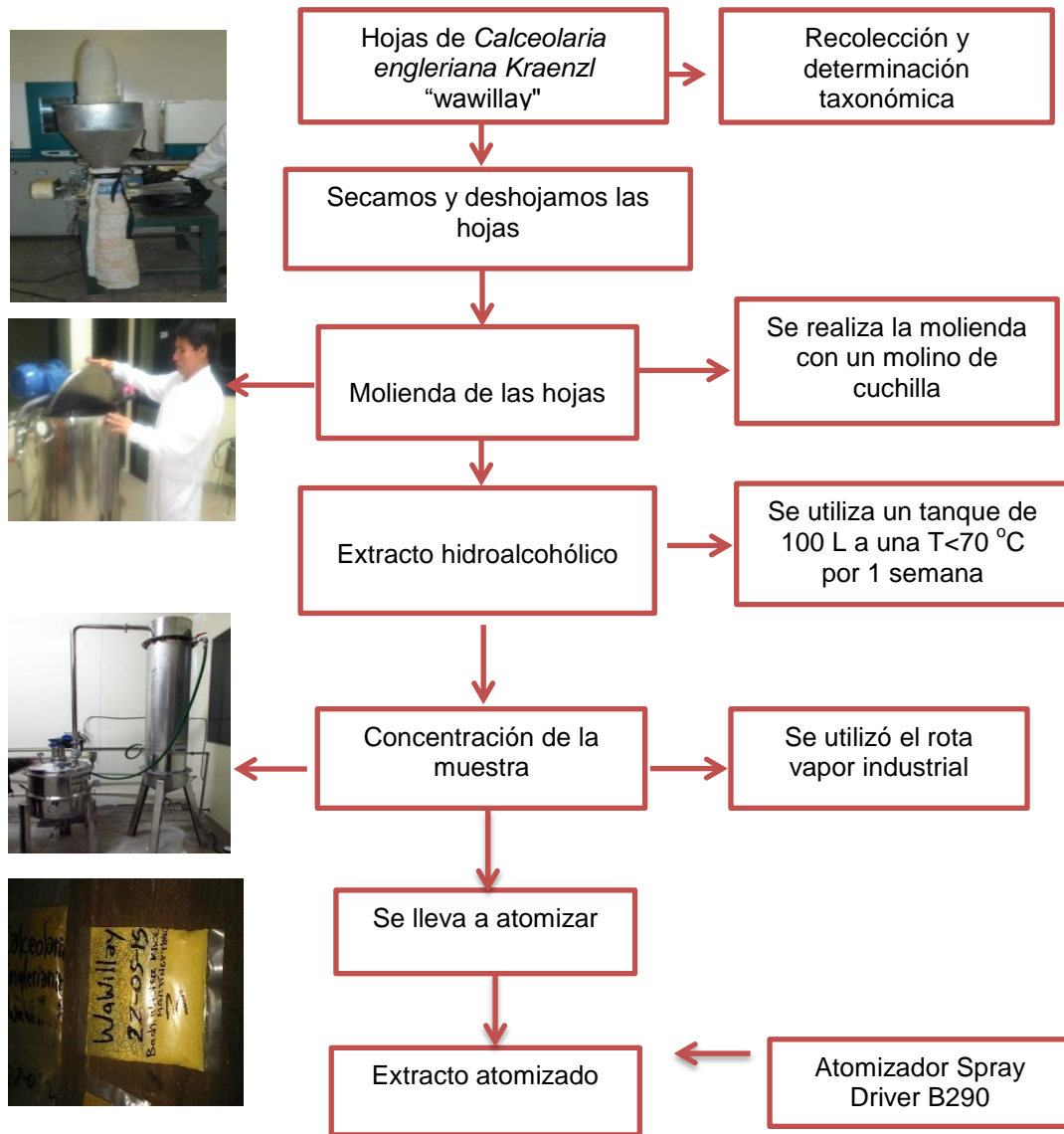
UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Biga. Laura Aucasime Medina
JEFE

Anexo 2. Fotografía de las hojas y flores de la *Calceolaria engleriana* Kraenzl
"wawillay" Ayacucho - 2014.



Anexo 3. Flujograma de obtención del extracto atomizado de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" Realizado en el Centro de Desarrollo Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos. Ayacucho



Anexo 4. Concentración del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “*wawillay*” realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2014.



Anexo 5. Programando el equipo atomizador Spray Driver B290 del Centro de Desarrollo Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos. Ayacucho – 2014

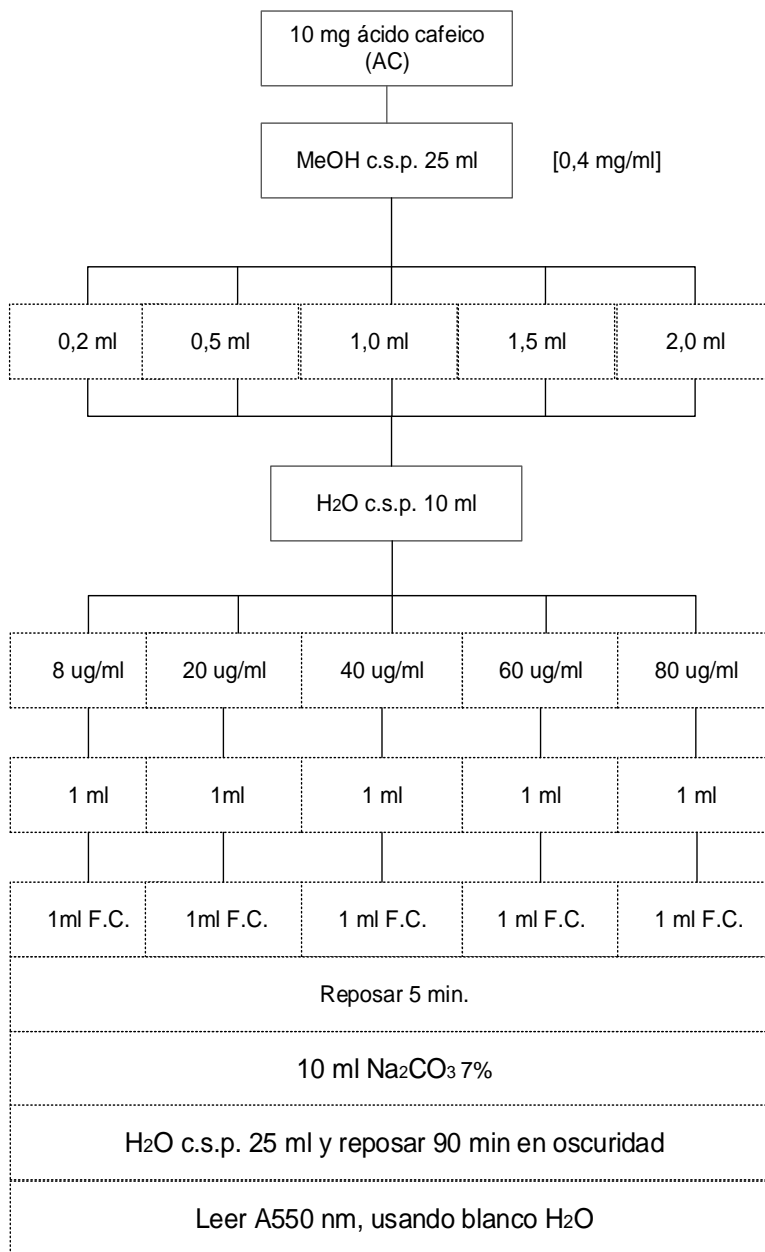


Anexo 6. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Romaní, 2012.



Anexo 7. Flujograma de cuantificación del estándar ácido caféico a diferentes concentraciones. Ayacucho-2014.

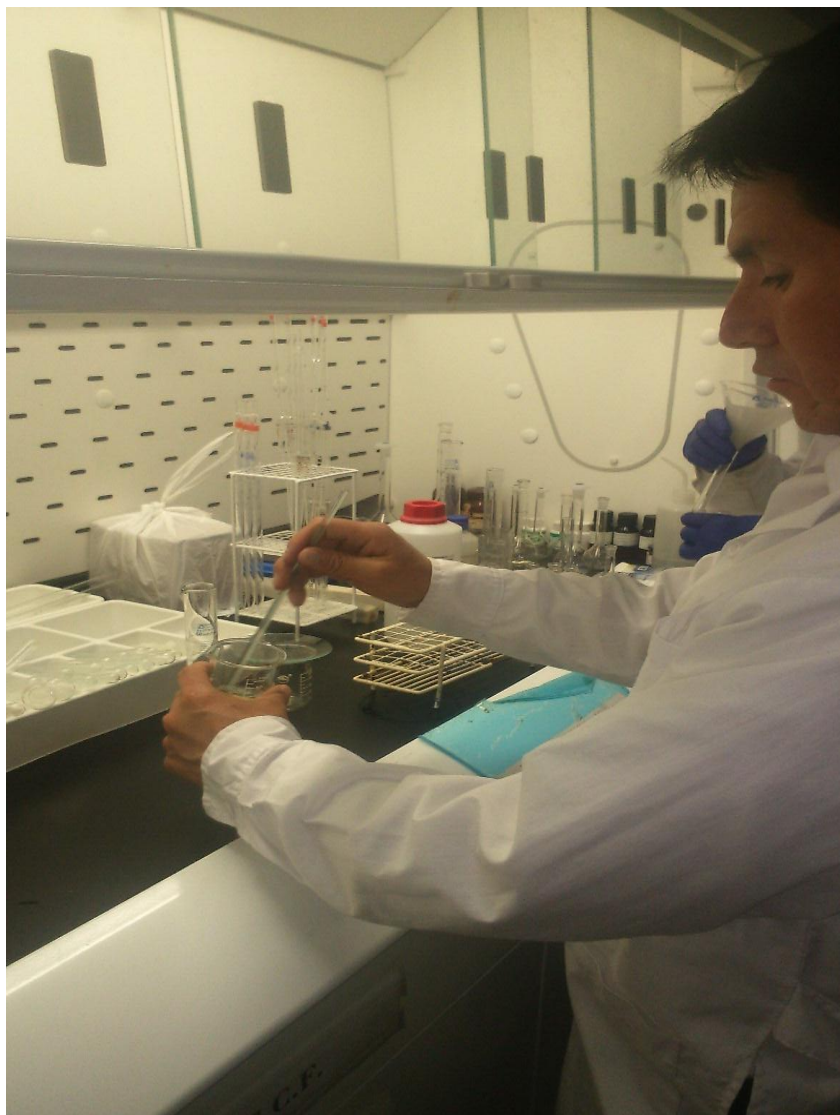
CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CAFÉICO



F.C. Folin Ciocalteu 1:6 (F.C.:H₂O)

Para la muestra problema, preparar una solución 0,0004 mg/ml (0,01 g + H₂O c.s.p. 25 mL) y proseguir ídem a los estándares

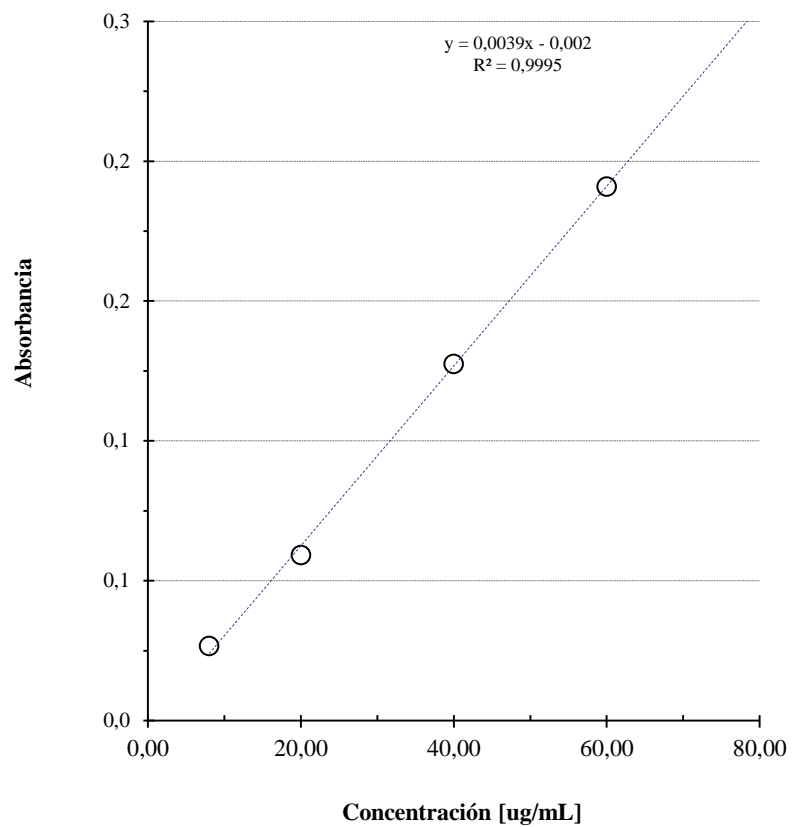
Anexo 8. Preparación del estándar ácido caféico a diferentes concentraciones.
Ayacucho-2014.



Anexo 9. Lectura de la solución estándar de ácido caféico a diferentes concentraciones más la muestra del atomizado de *Calceolaria engleriana* "wawillay" en el espectrofotómetro UV vis. En el Laboratorio de cinética y estabilidad de medicamentos de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2014.



Anexo 10. Curva de calibración de ácido caféico. Ayacucho - 2014.



Factor de calibración = 263,14, S = 11,48, %C.V. = 4,36

Anexo 11. Producto terminado de las formulas 1, 2 y 3; realizado en el Laboratorio de farmacias MASPHERMA. Ayacucho -2014.



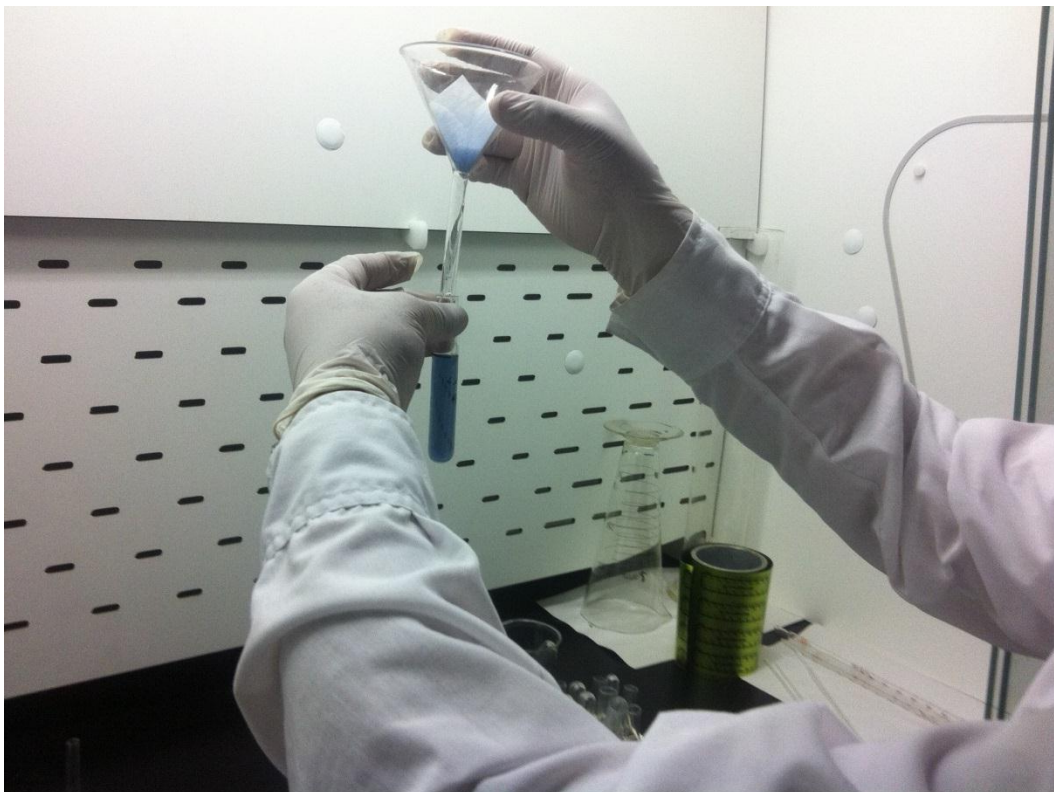
Anexo 12. Producto terminado elegido (crema 2) elaborada en el Laboratorio de farmacias MASPHERMA.Ayacucho -2014.



Anexo 13. Evaluación de pH a la crema 2 elaborada en el Laboratorio de farmacias MASPHERMA Ayacucho -2014.



Anexo 14. Cuantificación de fenoles presentes en la crema 2 elaborada en el Laboratorio de farmacias MASPHERMA Ayacucho -2014.



Anexo 15. Preparación de inóculo con caldo lauril sulfato de sodio. Ayacucho - 2014.

INOCULO (mL)	CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (mL)	VOLUMEN DE MEDIO MAS INOCULO (mL)	CALDO LAURIL REQUERIDO g/L	CONCENTRACIÓN
1	10 o mas	11 o mas	35,6	1X
10	10	20	71,2	2X
10	20	30	53,4	1.5X
20	10	30	106,8	3X
100	50	150	106,8	3X
100	35	135	137,1	3.5X
100	20	120	213,6	4X

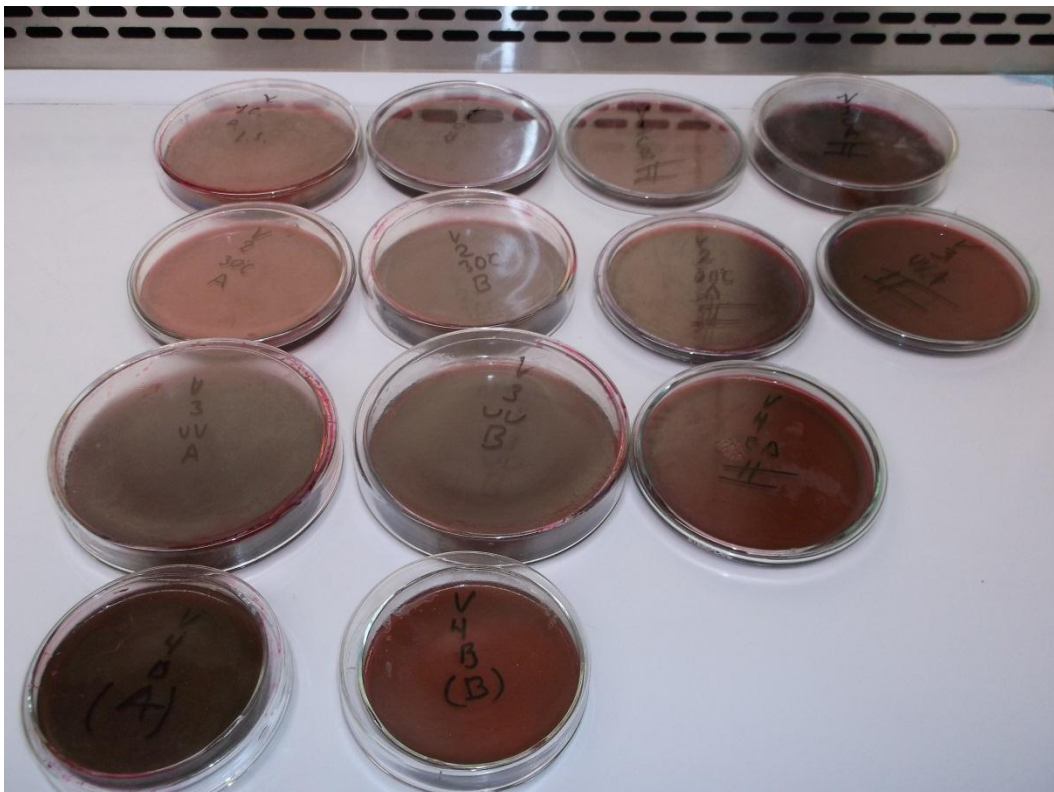
Anexo 16. Determinación del número más probable de microorganismos coliformes totales. Ayacucho -2014.



Anexo 17. Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 mL de muestra. Ayacucho -2014.

Nº de tubos positivos	NMP/100 mL	95% de límite de confianza (Aprox.)	
		Inferior	Superior
0	<1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	>8,0	4,0	infinito

Anexo 18. Lectura de resultados positivos y negativos por el método NMP de la crema de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho-2014.



Anexo 19. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	HIPÓTESIS	OBJETIVO	VARIABLE	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
Desarrollo de una formulación de crema a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho, 2014.	¿La crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" cumplirá con las especificaciones técnicas para dicha formulación?	La crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" cumple con las especificaciones técnicas para dicha formulación.	<p>General</p> <ul style="list-style-type: none"> Desarrollar una formulación de crema a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". <p>Específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluar los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". - Formular la crema a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". - Evaluar los parámetros físico-químico y microbiológicos de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". - Evaluar la estabilidad acelerada de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". 	<p>Variable Independiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> Tipo de excipiente. Cantidad de excipiente. Excipientes. <p>Variable Dependiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Formulación de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> Características fisicoquímicas: Aspecto, color, olor, pH. Control microbiológico: UFC (Unidades Formadoras de Colonia). Cuantificación de fenoles totales antes y después de someterlos a estrés térmico. 	<p>Antecedentes</p> <p>Identificación taxonómica</p> <p>Características botánicas</p> <p>Etnobotánica</p> <p>Química</p> <p>Pre formulación</p> <p>Crema</p> <p>Control parámetros fisicoquímicos</p> <p>Estabilidad</p> <p>Estabilidad acelerada</p>	<p>Tipo de investigación: Pre experimental.</p> <p>Diseño de investigación: Pre prueba – Post prueba con un solo grupo.</p> <p>Población: El extracto atomizado estandarizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</p> <p>Muestra: 25 g del extracto atomizado de hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</p> <p>Unidad experimental: 01 frasco de crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</p> <p>Metodología:</p> <ul style="list-style-type: none"> Se obtiene el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Se evaluarán los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado (características organolépticas, Identificación de compuestos químicos, pH y humedad). Se determinará la fórmula adecuada para la elaboración de la crema elaborada a base del extracto atomizado. Se evaluarán los parámetros fisicoquímicos y se realizará el control microbiológico de la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Se realizará un estudio de pre-estabilidad a la crema 2 someténdola a stress térmico a temperatura ambiente, 30°C y 50° C. Se cuantificará los fenoles totales presentes en la crema elaborada a base del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" antes y después de someterlos a stress térmico. <p>Análisis de datos: Los datos obtenidos serán procesados y analizados mediante el programa microsoft Excel. Se procederá a obtener la media, la mediana, la moda, la desviación estándar y la varianza. Se utilizará la prueba de t de student con una significancia estadística de p=0,05.</p>