

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antibacteriana de la crema elaborada a
base de extracto hidroalcohólico de las hojas de
Calceolaria engleriana Kraenzl “wawillay”,
Ayacucho - 2012.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

PRESENTADO POR

Bach. ROMANÍ TORRE PAMELA CRISTINA

Ayacucho – Perú

2012

DEDICATORIA

A mi abuelita Flora, a mi madre Cristina. A mis hermanos y amigos que me apoyaron durante toda mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad y del país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y en especial al "Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos" a sus docentes por sus enseñanzas y orientaciones durante mi formación profesional.

Un reconocimiento especial al Mg. Marco ARONÉS JARA, por su asesoramiento y la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia, fundamentales para la concreción de esta tesis.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	03
2.1 Antecedentes	03
2.2 <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl	06
2.3 Obtención de extractos	13
2.4 Formas farmacéuticas	15
2.5 Actividad antibacteriana	19
2.6 Fármacos antibacterianos	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Ubicación	22
3.2 Materiales	22
3.3 Recolección y desecación de las hojas	23
3.7 Formulación de la crema	27
3.8 Evaluación de la actividad antibacteriana	31
3.9 Análisis de datos	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	42
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	56

Actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2012.

AUTOR : Bach. Pamela Cristina, ROMANÍ TORRE

ASESORES : Mg. Marco Rolando, ARONÉS JARA

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y se tuvo como antecedentes el informe de Romero y Col. (2009), quienes reportaron la presencia de compuestos fenólicos y la actividad antibacteriana del extracto de la especie *Calceolaria engleriana*. Por lo tanto, el objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, para lo cual las hojas fueron recolectadas en el Centro Poblado Waraca Anexo Anchac - Huasi a 2 700 m.s.n.m. en el distrito de Vinchos de la región Ayacucho.

El método para evaluar la actividad antibacteriana fue la prueba de Difusión en Placa (Kirby-Bauer).

Los metabolitos secundarios identificados en las cremas fueron azúcares reductores, catequinas, flavonoides, fenoles y taninos, quinonas y triterpenos y esteroides. La crema al 0,5% presentó un halo de inhibición de $24,53 \pm 0,45$ mm; la crema al 1,0% $30,02 \pm 0,79$ mm y la crema al 2,0% un valor de $31,31 \pm 0,70$ mm respectivamente. El porcentaje de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de “wawillay” frente a discos de sensibilidad fueron: con Oxacilina tuvo un porcentaje de inhibición de $107,73 \pm 2,96$ %; Ceftriaxona $120,44 \pm 2,69$ %; Ciprofloxacino $127,49 \pm 2,84$ %; Sulfametoxazol más Trimetropin $135,49 \pm 3,02$ % y Gentamicina $162,07 \pm 3,61$ % respectivamente.

Se concluye que la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, tuvo actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las concentraciones evaluadas.

Palabras Clave: Actividad antibacteriana, extracto hidroalcohólico, *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, como en otros países en vías de desarrollo, las plantas medicinales representan aún la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional. La flora peruana ofrece grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con diferentes actividades (Cornejo, 1987). La industria farmacéutica y buena parte de la comunidad científica están considerando en nuestros días las plantas medicinales como fuentes potenciales de moléculas bioactivas con estructuras diferenciadas e innovadoras. Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna y aunque se conoce que su acción preventiva o curativa se debe a la presencia en sus órganos de sustancias químicas que provocan su efecto fisiológico. La detección de los principios activos es importante, pues permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a la planta y a la vez detectar nuevas posibles aplicaciones (Lock de Ugaz, 1994), es por eso que, con esta investigación tratamos de aportar en algo el uso de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

Calceolaria engleriana Kraenzl, comúnmente conocida como "wawillay", es una planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae. Se sabe que la distribución de *Calceolaria* va del sur de la sierra Madre Occidental en México, hasta los

Andes del sur, la mayoría de las especies están en alturas que oscilan los 2000 a 4000 m.s.n.m. La infusión de hojas y flores frescas después de los alimentos son muy usadas en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de la tos, resfrío, como hipoglucemiante, diurético, antiulceroso, también se le describe por su uso para el retraso menstrual (Molau, 2003 y Pérez, 2012).

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Para lo cual se plantearon los objetivos específicos:

- Determinar los parámetros físico químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.
- Determinar las características físico químicas de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.
- Determinar la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, frente a *Staphylococcus aureus*

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Desde épocas muy remotas el hombre tuvo que aprender a vestirse, comer y curarse, para ello debió mimetizarse con su entorno y aprender del comportamiento de los animales que basados en su instinto sabían seleccionar las especies que eran consideradas comestibles, de aquellas consideradas como medicinales y también tóxicas.

Indudablemente el reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal aún por descubrir. Un gran número de plantas son analizadas constantemente en relación a su posible valor farmacológico (Font Quer, 1978).

El género *Calceolaria* comprende cerca de 181 especies en el geotrópico, la mayoría de los cuales crecen en las zonas alto andinas y alcanzan su más alta diversidad en el norte del Perú, especialmente en el departamento de Cajamarca (Romero y Col, 2009).

Sobre el estudio de las plantas medicinales con actividad antibacteriana, la especie *Calceolaria engleriana* Kraenzlin “ayazapato”, ha demostrado la

presencia de metabolitos secundario como los flavonoides y taninos (Del Castillo, 2004).

Romero y Col. (2009), 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.

Porto y Col. (2009), demostraron, que los flavonoides, flavonas y flavononas, aisladas de muestras de propóleos cuando se encuentran a la concentración de 1% tuvieron actividad antimicrobiana frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* y *C. albicans*

Bravo y Col. (2005), determinaron la actividad antibacteriana de los compuestos hallados en *Calceolaria thyrsoiflora* en forma de infusión de hojas y flores.

Woldemichael y Col. (2003), evaluaron la actividad antibacteriana de 10 diterpenos aislados de un extracto, preparado a partir de las partes aéreas de *Calceolaria pinnifolia*, las bacterias ensayadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus metilino resistente*, *Bacillus subtilis* y *Echericha coli* L.

Alonso (2004), al establecer una comparación general de la capacidad inhibitoria de los extractos se pudo determinar que los extractos de tomillo presentan mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a

concentraciones de 10000 y 1000 µg/ml. También demostró que el romero disminuye el crecimiento de algunas bacterias tales como: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, también demostró que el aceite esencial de romero presenta propiedades antimicrobiales. Los resultados evidencian que la especie *Rosmarinus officinalis*, que contiene 4.6% de polifenoles activos, tiene acción bacteriostática contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* en la infección presente en la piel de ratón.

Ruiz y Roque (2002), demostraron que los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de la planta entera de *Cassia reticulata* (retama) mostraron actividad significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*, excepto el extracto metanólico contra *Staphylococcus epidermidis*.

Humberto y Col. (2002), determinaron que la cáscara de *Caesalpinia spinosa* tiene una buena acción inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y las hojas de *Eucalyptus sp.* demostraron también una buena efectividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. También reportan que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* "wayra muña" presenta actividad antibacteriana a medida que se incrementa la concentración del extracto muestra mayor actividad anti Hp (*Helicobacter pylori*).

2.2. Calceolaria engleriana Kraenzl

2.2.1. Clasificación taxonómica

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : ASTERIDAE
ORDEN : SCROPHULARIALES

FAMILIA : SCROPHULARIACEAE
GÉNERO : Calceolaria
ESPECIE : ***Calceolaria engleriana* Kraenzl**
NOMBRE VULGAR : "wawillay"

Fuente: Constancia emitida por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. (Anexo 5).

2.2.2. Descripción botánica

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 subcoriáceas, 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, interespacios glabros, glándulas sésiles inflorescencia compuesta de uno o dos pares de cimas de ocho 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 (Molau, 1988 y Aedes, 1998).

2.2.3. Distribución geográfica

Se sabe que la distribución de *Calceolaria* va del sur de la sierra Madre Occidental en México, hasta los Andes del sur, la mayoría de las especies están en alturas que oscilan los 2 000 a 4 000 m.s.n.m. (Molau, 2003).

Crecen en zonas alto andinas y alcanzan su más alta diversidad en el norte de Perú, especialmente en el departamento de Cajamarca.

Según el estudio realizado por el botánico Ulf Molau en el año 1983 *Calceolaria engleriana* subsp. *lutea* Molau, es endémica de los andes centrales del Perú, siendo encontrado en los departamentos de Junín y Ayacucho; desarrollándose en las laderas de la “puna” en pendientes rocosas y matorrales de montañas secas, cerca de escorrentías de agua, canales de riego, terrenos de cultivo en suelos franco arenosos y pedregosos, aproximadamente de 3 000 a 3 500 m.s.n.m. (Castillo, 2004; Aedes, 1998 y Molau, 1988). Su floración y recolección se da en los meses de primavera andina: abril, mayo, junio y julio, pero particularmente en el departamento de Ayacucho crece en los meses de lluvia de enero a abril, siendo escaso en agosto a diciembre (Aedes, 1998).

2.2.4. Composición química

Se han realizado diversos estudios sobre la composición química del género *Calceolaria*, identificando algunos compuestos químicos, como resultado de estudios fitoquímicos, donde se reportan la presencia de taninos, flavonoides, esteroides, quinolonas, cardenólidos, esteroides, anillos lactona, triterpenos y en los últimos años han sido reportados muchos nuevos diterpenos. (Romero y Col, 2009).

Se puede mencionar que los compuestos terpenicos del género *Calceolaria* han sido ampliamente estudiados. Silva y Col. (1993), aislaron los diterpenos de las

partes aéreas de *Calceolaria petiolaris*, llegando a identificarlos como: 18 - maloniloxi - 9 - epi - eti - 7, 15 - pimaradieno, 18 - hidroxiloxi - 9 - epi - ent - 7, 15 - pimaradieno, 18 - acetoxiloxi - 9 - epi - ent - 7, 15 - pimaradieno y el Petiolato (un bis - diterpeno).

Bhupinder y Col. (1999), aislaron una naftoquinona al estudiar las partes aéreas de *Calceolaria recta* y *Calceolaria paposana*. Chamy y Col. (2007), asimismo reportan que aislaron dos naftoquinonas de *Calceolaria andina*, identificadas como 2 - (1,1 - dimetilpro - 2 enil) - 3 - hidroxiloxi - 1, 4 - naftoquinona y su correspondiente acetato, el 2 - acetoxiloxi - 3 - (1, 1 - dimetilpro - 2 - enil) - 3 - hidroxiloxi - 1, 4 - naftoquinona.

Wollenweber y Col. (2000), menciona que estudiaron 22 especies de la familia *Scrophulariaceae* demostraron la presencia de flavonas y flavonoles metoxilados.

2.2.5. Usos tradicionales

En el empleo de la medicina tradicional a la planta silvestre *Calceolaria engleriana* Kraenzi se le atribuye ciertas propiedades medicinales como: diurético, digestivo astringente, febrífugo, antiulceroso e hipoglucemiante también se le describe por su uso para las tos, resfrió y retraso menstrual; éstas son usadas en forma de infusión las hojas y flores frescas tomándolas después de los alimentos (Pérez, 2012).

Castillo (2004), menciona que hay otras especies como: *Calceolaria engleriana* subsp. *lutea* Molau que se utiliza como hipoglucemiante (esta propiedad se le atribuye a la planta entera).

La *Calceolaria deflexa* R&P, especie silvestre se utiliza como "llipta" para el chacchado de la coca; *Calceolaria cuneiforme* R&P se utiliza como diurético en

infecciones uterinas, como infusión de toda la planta y como cosmético quita las manchas de la piel y el polvo de la flor elimina cicatrices; *Calceolaria herzogiana* Kran, es una especie silvestre utilizada para problemas estomacales; *Calceolaria pinnata* L, especie silvestre distribuida entre la costa y la sierra y es utilizada como diurético; *Calceolaria santolinoides Kraenzlin*, posee floración estival y sus órganos aéreos se emplean en medicina tradicional como facilitadores del parto, aplicación que se proyecta también como abortiva; *Calceolaria herbeo - hybrida*, se encuentra en la costa como una especie cultivada ornamentalmente (Brack, 1999 y Cabrera, 1993).

2.2.6. Relación estructura actividad de los metabolitos secundarios

La detección de los principios activos es importante pues permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a la planta y a la vez detectar nuevas posibles aplicaciones. Por otra parte, el conocimiento de los metabolitos secundarios facilita la dosificación y en algunos casos la administración, no obstante, existe la tendencia al uso de los extractos o polvo obtenidos de las plantas o sus órganos (Lock de Ugaz, 1994).

➤ **Fenoles ácidos y ácidos fenólicos**, algunos de los compuestos químicos bioactivos más sencillos son derivados mono sustituidos del anillo fenol. Entre ellos destacan el ácido caféico y el ácido cinámico, donde reportan que el ácido caféico es eficaz frente a bacterias, hongos y virus. La posición y el número de grupos hidroxilo del grupo fenol parece influir en el efecto antimicrobiano de tal forma que a mayor grado de hidroxilación mayor poder tóxico y mayor poder inhibitorio. El mecanismo responsable del efecto antimicrobiano de los fenoles parece estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados, posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacción con

proteínas. Los aceites esenciales de los compuesto fenólicos también destacan por su poder antimicrobiano (Cantón y Col, 2012).

➤ **Quinonas**, son anillos aromáticos que presentan dos grupos cetónicos su capacidad para formar complejos irreversibles con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas establece su potencial como agentes antimicrobianos al conducir a la inactivación y pérdida de función de estas proteínas. Asimismo y de manera secundaria, las quinonas pueden inducir la formación de sustratos no asimilables por los microorganismos (Cantón y Col, 2012).

➤ **Flavonas, flavonoides y flavonoles**, son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Estas sustancias son producidas de manera natural por las plantas como respuesta a procesos infecciosos, por lo que no se extraña que se haya demostrado *in vitro* su eficacia antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos. Su actividad es debida probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y con la pared celular de la bacteria, de forma análoga a las quinonas. Los flavonoides poseen, así mismo efectos inhibitorios frente a múltiples virus. Existen numerosos estudios que demuestran su eficacia frente al virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Cantón y Col, 2012).

➤ **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 publicados 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 (Cantón y Col, 2012).

➤ **Cumarinas**, son compuestos fenólicos resultante de la fusión del anillo de benceno y una alfa pirona. Como grupo las cumarinas tiene 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 gram positivos y las fitoalexinas, derivado hidroxilados de las cumarinas tienen actividad antifúngica. (Cantón y Col, 2012).

➤ **Terpenoides**, los aceites esenciales también denominados terpenoides, son metabolitos secundarios altamente enriquecidos en compuestos con una estructura básica isoprenoide. Respecto al espectro de la actividad antimicrobiana, cerca del 60% de los aceites esenciales conocidos son inhibitorios frente a hongos y un 30% frente a bacterias, aunque también hay evidencias de su acción sobre virus y protozoos (Cantón y Col, 2012).

➤ **Lecitinas y compuestos polipéptidos**, la capacidad antimicrobiana de estos compuestos se conoce desde hace tiempo. En 1942 se publicaron las primeras evidencias de los efectos antimicrobianos de los péptidos, concretamente de una lipoproteína aislada de la harina de trigo. Los péptidos con capacidad antimicrobiana son moléculas de la defensa inmunitaria natural que tienen efectos directos sobre bacterias, hongos y virus con envoltura (Cantón y Col, 2012).

2.3. Obtención de extractos

Los métodos y técnicas operatorias a seleccionar para realizar la extracción y/o

Aislamiento de principios activos de un material vegetal, depende de diversos factores, siendo entre ellos fundamentales:

- Tipo de sustancias en cuestión (naturaleza química).
- Contenido de agua.
- Grado de fragmentación (tamaño de partículas).
- La temperatura y su influencia sobre la solubilidad y la descomposición de las sustancias.
- Estabilidad o labilidad del producto.
- Selección del disolvente o menstruo.
- Cambios en la relación de partición sólido/líquido.
- Recuperación del soluto según la proporción de partición.
- Formación de emulsiones.
- Costo del proceso.
- Trabajo involucrado, reproducibilidad y factibilidad.
- Eficiencia del proceso extractivo.

En el mercado farmacéutico hallamos cuatro tipos de extractos: extractos secos, blandos, hidroalcohólicos (fluidos y tinturas) y extractos oleosos. En todos ellos la concentración de principios activos es óptima, facilitándose la dosificación de los mismos.

- Extractos secos, se obtiene por la concentración de los licores extractivos mediante evaporación al vacío o por atomización.
- Extractos blandos, son masas semisólidas, se obtiene por concentración de los licores extraídos sin llegar a sequedad.

- Extractos hidroalcohólicos, son los que extraen la mayor diversidad de componentes químicos presentes en drogas (Miranda, 1996).

2.3.1. Métodos de extracción

Según Miranda (1996), las principales técnicas extractivas son: maceración, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación y extracción continua.

- a. Maceración, consiste en remojar la droga en un solvente, el material se agita esporádicamente por un periodo de 2 - 14 días, finalizando el proceso se decanta el líquido filtrado.
- b. Lixiviación, se coloca la droga en un percolador, se macera previamente (30 min.), y se hace pasar continuamente el solvente, hasta desaparecer las burbujas.
- c. Digestión, forma de maceración donde se aplica calor al material, lo cual incrementa su poder disolvente.
- d. Infusión, la droga se extrae con agua caliente o fría, sin someter a ebullición.
- e. Decocción, la droga se somete a ebullición con agua.
- f. Destilación, es el proceso de evaporar una sustancia, condensar los vapores y recoger el estado líquido.
- g. Extracción continua, el material se trata con un disolvente que disuelve uno o algunos de sus componentes, este método utiliza aparatos diseñados como: soxhlet y los extractores líquido-líquido.

2.3.2. Control físico químicos de extractos

El empleo de métodos físico-químicos de análisis, permite establecer la calidad

de los extractos obtenidos a partir de drogas crudas, así como controlar su estabilidad.

Para la determinación de los parámetros de calidad de un extracto o de un aceite esencial, son empleados algunos métodos.

- a. Determinación de los requisitos organolépticos.
 - Determinación de olor; se toma un tira de papel secante, se introduce un extremo en la muestra, se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.
 - Determinación de color; se toma un tubo de ensayo, se llena con la muestra hasta las tres cuartas partes, y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas.
- b. Determinación de la densidad relativa.
- c. Determinación del índice de refracción.
- d. Determinación del pH de extractos y tinturas.
- e. Determinación de sólidos totales.
- f. Determinación del contenido alcohólico.
- g. Análisis capilar (Miranda, 1996).

2.4. Forma farmacéutica

Se denominan preparados farmacéuticos, formas medicamentosas, formas farmacéuticas o de dosificación, o simplemente preparados a los productos procedentes de la transformación de una droga o de una asociación de drogas mediante procedimientos farmacotécnicos a fin de darles características físicas y morfológicas particulares que faciliten su administración y acción farmacológica, pero sin dosis establecidas (Domínguez - Gil, 2008).

2.4.1. Formas farmacéuticas semisólidas.

Son preparaciones de consistencia semisólida destinadas a ser aplicadas sobre

la piel o sobre ciertas mucosas con el fin de ejercer una acción local o dar lugar a la penetración percutánea de principios activos; o por su propia acción emoliente o protectora (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1988).

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 (Vila, 2001).

2.4.2. 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 (Vila, 2001).

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

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

b) **Creimas;** son formas farmacéuticas multifásicas constituidas por dos fases, una lipófila y otra acuosa.

- Hidrófobas. La fase continua o externa es la fase lipófila debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo W/O.
- Hidrófilas. 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 emulgentes tipo W/O.

c) **Geles;** estas preparaciones están formadas por líquidos gelificados con ayuda de agentes apropiados.

- *Hidrófobos (oleogeles).* Están constituidos por excipientes como la parafina líquida adicionada de polietileno, aceites grasos gelificados con sílice coloidal o por jabones de aluminio o zinc.
- *Hidrófilos (hidrogeles).* Se elaboran con excipientes hidrófilos como el agua, el glicerol y los propilenglicoles, gelificados con sustancias como goma de tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxivinílicos, silicatos de magnesio y aluminio.

d) **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 (Vila, 2001).

2.4.3. Método de elaboración de cremas

Primero es la formación de la fase oleosa, luego de la fase acuosa y finalmente es la formación de la emulsión.

2.4.4. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos y biológicos de las cremas

Para determinar la calidad de un producto farmacéutico, se realizan controles tanto a nivel de procesos como en producto terminado, por lo tanto los parámetros a ser evaluados en las formas farmacéuticas semisólidas elaboradas son los siguientes:

Control en procesos

1. Características organolépticas

- Aspecto.
- Sabor.
- Color.
- Olor.

2. Características físicas

- pH.
- Peso específico.
- Índice de refracción.
- Viscosidad.
- Control de volumen de llenado.
- Control de sellado.
- Control de etiquetado.
- Control de limpieza exterior del frasco.

Control en producto terminado

1. Características organolépticas

- Aspecto.
- Color.
- Olor.

2. Características físicas

- Peso específico.

- Índice de refracción.
- Control de volumen de llenado.
- Control de sellado.
- Control de etiquetado.
- Limpieza exterior.

3. Control microbiológico

- Recuento total, mesófilo, aeróbios y facultativos viables.
- Recuento de mohos.
- Recuento de levaduras.

2.5. Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o de sus derivados. La actividad biocida se define como "la capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento o destruyendo a los microorganismos" generalmente los compuestos que poseen dicha actividad viene a tener un gran interés a nivel mundial ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos (Cáceres, 1996).

Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo* (Cáceres, 1996).

➤ ***In vitro***

Los procedimientos más frecuentemente empleados son los mismos que los utilizados para la valoración de la actividad antimicrobiana e incluyen ensayos de macrodilución y microdilución en caldo, dilución en agar y difusión con discos.

Los métodos que utilizan medios líquidos tiene la ventaja de poder determinar la actividad bactericida o fúngica, mientras que la dilución en agar y la difusión con discos solo establecen la actividad bacteriostática. Para medir la actividad antibacteriana, estos estudios se realizan en una primera etapa de cribado para definir cualitativamente los perfiles y posteriormente de forma cuantitativa, determinando los valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y de CMB (Concentración Mínima Bactericida). La determinación de estos valores permite establecer comparaciones con antibióticos convencionales.

Dentro de los procedimientos *in vitro*, encontramos ensayos para bacterias y hongos, virus, protozoos y helmintos.

➤ ***In vivo***

La mayoría de los ensayos *in vivo* sobre la actividad de los extractos de plantas se han realizado examinando la posible eficacia antiprotozoaria probablemente por el interés de introducir alternativas terapéuticas en países en desarrollo de las zonas tropicales.

Dentro de los métodos *in vivo*, encontramos a los ensayos en animales de experimentación y ensayos clínicos en humanos (Cantón y Col, 2012).

2.5.1. Métodos de estudio de la actividad antibacteriana

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antibacteriana de extractos y preparados a base de plantas medicinales, son los métodos de difusión y dilución (Cáceres, 1996).

➤ **Difusión.-** el método de difusión usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedio o susceptibles para cada agente antimicrobiano, estos son aplicados en forma de discos de papel filtro y se conoce como método de Kirby- Bauer.

➤ **Dilución.-** el método de dilución se usa para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, se utiliza principalmente el método de Mitscher, que es recomendado para tamizajes de productos naturales, es reproducible y relativamente fácil de estandarizar y procesa gran cantidad de muestra (Cáceres, 1996).

2.6. Fármacos antibacterianos

2.6.1. **Oxacilina.-** Las penicilinas, así como todos los antibióticos beta lactámicos, inhiben el crecimiento bacteriano por interferir con un paso específico en las síntesis de la pared celular.

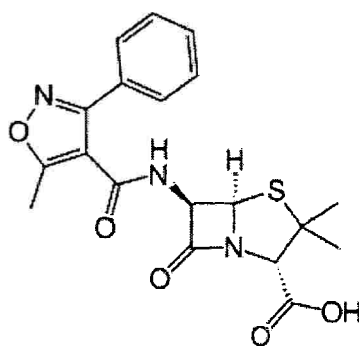


Figura N°01. Ácido (2*S*, 5*R*, 6*R*) -3,3-dimetil-6- [(5-metil-3-fenil-1,2-oxazol-4 carbonil) amino] -7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico.

Su mecanismo de acción, al igual que otros antibióticos betalactámicos, la oxacilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Evita la formación de enlaces cruzados entre las cadenas poliméricas de peptidoglicano lineal las cuales son un componente importante de la pared celular de las bacterias gram positivo. Actúa mediante la unión e inhibición competitiva de la enzima transpeptidasa usada por la bacteria para generar los enlaces cruzados

(*D* - alanil - alanina) usados en la síntesis del peptidoglicano.

La oxacilina es resistente a la enzima betalactamasa (también conocida como penicilinasas), secretada por muchas bacterias resistentes. La presencia del grupo orto - dimetoxifenil directamente unido a la cadena lateral carbonilo del núcleo de la penicilina, facilita la resistencia a betalactamasa, debido a que estas enzimas son relativamente intolerantes a la fuerza excéntrica de esta cadena. (Litter, 2007)

2.6.2. Gentamicina.- Son inhibidores irreversibles de la síntesis de proteínas, sin embargo, el mecanismo preciso de la actividad bactericida no es claro. El suceso inicial es difusión pasiva a través de canales de potasio.

La gentamicina es un aminoglucósido y se emplea como antibiótico para erradicar infecciones en el ojo contra bacterias sensibles. También sirve para tratar diversas enfermedades graves de piel, pulmón, estómago, vías urinarias y sangre, así como heridas cutáneas. Su uso está indicado cuando la administración de otros antibióticos menos potentes haya sido ineficaz. Debido a su gran toxicidad y a los múltiples efectos secundarios, ha de evitarse su uso si no es estrictamente necesario. Se concentran en oído y riñón, por lo tanto tienen efectos ototóxicos y nefrotóxicos.

Su mecanismo de acción, consiste en interferir en la síntesis normal de proteínas, originando proteínas no funcionales en microorganismos susceptibles. Para ejercer su acción deben ingresar en la célula bacteriana. Esto ocurre en dos etapas por un mecanismo de transporte activo. En la primera fase, el ingreso a la célula depende del potencial transmembrana generado por el metabolismo aerobio. La segunda fase es de ingreso acelerado, y se ve favorecida por la unión previa del aminoglucósido al ribosoma bacteriano. Ciertas condiciones que

reducen el potencial eléctrico de la membrana como la anaerobiosis o el bajo pH del medio, disminuyen el ingreso de estos compuestos al citoplasma bacteriano.

Una vez dentro de la célula, los aminoglucósidos se unen de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Esta unión interfiere con la elongación de la cadena peptídica. También causan lecturas incorrectas del código genético formándose proteínas anómalas. Algunas de estas son proteínas de membrana y el resultado es la formación de canales que permiten el ingreso de más drogas a la célula (Goodman y Gilman, 2004)

2.6.3. Trimetopim-sulfametoxazol.- Son dos tipos de antibióticos que por su actividad complementaria suelen utilizarse asociados, recibiendo la asociación el nombre de cotrimoxazol. La asociación suele ser en una relación de 1:5; es decir, que 1 mg de trimetoprima suele asociarse a 5 mg de sulfametoxazol.

La trimetoprima es un antibiótico bacteriostático derivado de la trimetoxibenzilpirimidina, mientras que el sulfametoxazol es una sulfonamida de acción intermedia. Ambos actúan sobre la ruta de síntesis del tetrahidrolato, cuya inhibición provoca finalmente que las bacterias afectadas no puedan sintetizar purinas.

La síntesis del tetrahidrolato se inicia a partir del ácido p-aminobenzoico, precisamente a este nivel actúa el sulfametoxazol, que bloquea la enzima responsable de la síntesis debido a su parecido estructural. Un paso posterior es la unión de dos moléculas de dihidrolato en una sola de tetrahidrolato. Es en este paso donde actúa la trimetoprima, ya que es análoga al dihidrolato, por lo que bloquea la enzima responsable de la unión. Esta reacción tendría un efecto altamente tóxico en el ser humano, pero debido a que la afinidad de las bacterias por la trimetoprima es mucho más elevada que la de las células humanas, se pueden utilizar dosis lo suficientemente bajas para que no hagan daño al

organismo humano mientras que son lo suficientemente altas como para interferir el metabolismo de las bacterias.

2.6.4. Ceftriaxona.- La ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación para uso parenteral que muestra una actividad significativa frente a gérmenes gram-negativos serios. La ceftriaxona penetra a través de la barrera hematoencefálica, lo que la hace útil en el tratamiento de la meningitis. Aunque su actividad frente a los organismos gram-positivos es menor que la de las cefalosporinas de primera generación, es un antibiótico efectivo frente a cepas de *estreptococos* y *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina. El espectro de actividad de la ceftriaxona es similar al de la cefotaxima y ceftizoxima. De todas las cefalosporinas, la ceftriaxona es la que tiene una mayor semi-vida plasmática, permitiendo la administración de una sola dosis al día.

La ceftriaxona, como todos los antibióticos beta-lactámicos es bactericida, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana al unirse específicamente a unas proteínas llamadas "proteínas ligandos de la penicilina (PBPs)" que se localizan en dicha pared. Las PBPs son responsables de varios de los pasos en la síntesis de la pared bacteriana y su número oscila entre varios cientos a varios miles de moléculas en cada bacteria. Estas proteínas son diferentes para cada especie bacteriana, por lo que la actividad de cada uno de los antibióticos β - lactámicos depende de la capacidad de estos para acceder y unirse a dichas proteínas. En todos los casos, una vez que el antibiótico se ha unido a las PBPs estas pierden su capacidad funcional, con lo que la bacteria pierde su capacidad para formar la pared, siendo el resultado final la lisis de la bacteria. Esta lisis se debe a las autolisinas bacterianas cuya actividad es, al parecer exaltada por los cefalosporinas de segunda y tercera generación, que son capaces de interferir con un inhibidor de las autolisinas. La presencia de un grupo aminotiazolilacetilo

y de una cadena lateral en la posición 7 de un grupo metoximino aumenta la actividad antibacteriana de la ceftriaxona, en particular frente a las enterobacterias. Aunque no todas, muchas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son sensibles a la ceftriaxona (Litter, 2007)

2.6.5. Ciprofloxacino.- Es un agente antimicrobiano de la clase de las fluoroquinolonas. Es un antibiótico de amplio espectro, activo contra las bacterias gram-positivo y gram-negativo. Funciona inhibiendo la ADN girasa, un tipo II de topoisomerasa, que es una enzima necesaria para separar el ADN replicado, inhibiendo la división celular.

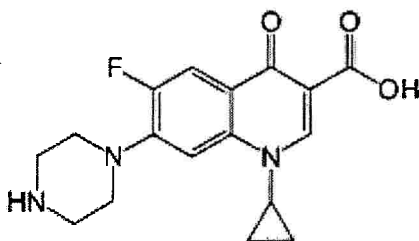


Figura N° 02. Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-quinolin-3-carboxílico.

Los efectos antibacterianos del ciprofloxacino se deben a la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA - girasa bacterianas. Estas topoisomerasas alteran el DNA introduciendo pliegues super helicoidales en el DNA de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas. La DNA-girasa tiene dos subunidades codificadas por el gen *gyra*, y actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego pegándolas una vez que se ha formado la superhélice. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano, aunque no se conoce con exactitud porqué la inhibición de la DNA-girasa conduce a la muerte de la bacteria. Las células humanas y de los mamíferos contienen una topoisomerasa que actúa de una forma parecida a la

DNA-girasa bacteriana, pero esta enzima no es afectada por las concentraciones bactericidas del ciprofloxacino.

Como todas las quinolonas, el ciprofloxacino muestra un efecto post-antibiótico: después de una exposición, los gérmenes no pueden reiniciar su crecimiento durante unas 4 horas, aunque los niveles del antibiótico sean indetectables (Goodman y Gilman, 2004)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de junio a setiembre del 2012.

3.2 MATERIALES

Población: Hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca Anexo Anchac - Huasi provincia de Vinchos del región de Ayacucho.

Muestra: Conformado por cinco kilogramos de hojas, flores y tallos desecados de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, recolectadas durante el mes de junio a partir de los cuales se realizó el extracto hidroalcohólico, siguiendo las recomendaciones establecidas para estos casos.

Cepas bacterianas: Las cepas utilizadas para determinar la actividad antibacteriana en la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las

hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donadas por el Instituto Nacional de Salud.

3.3. Recolección y desecación de las hojas *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"

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 (0,1%), 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 (OMS, 1991).

3.4. Obtención del extracto de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"

Las hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", fueron reducidas de tamaño utilizando el molino de martillo con malla de un cm. aproximadamente. Luego se pesó 500 g de muestra, se colocó en el percolador y adición 1200 mL de etanol 70° como disolvente, se maceró por una semana, posteriormente se percoló a razón de 20 gotas por minuto, se recibió el percolado y se filtró. Se percoló por cinco veces repitiendo el mismo procedimiento.

Las fracciones recolectadas se concentraron en un baño maría a 40°C, y se secó por atomización para obtener el polvo fino del extracto. El extracto se utilizó para realizar el tamizaje fitoquímico (extracto etanólico, extracto etéreo, fracción acuosa) y para elaboración de la crema.

3.5. Tamizaje fitoquímico

a) Tamizaje

Se realizaron según el esquema que se muestra en el Anexo N° 6 (OMS, 1991).

b) Identificación de compuestos químicos

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", fueron realizadas según Lock de Ugaz (1994), Miranda y Col. (2000).

3.6. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del extracto

Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", fueron evaluados los parámetros fisicoquímicos que define la calidad de los mismos, que a continuación señalamos.

a) Determinación de las características organolépticas

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

Olor: Se tomó cantidad suficiente de muestra y fue colocado en una luna de reloj o tubo de ensayo, se percibe y se determina el tipo de olor. Según la estructura estereoquímica correspondiente y olores primarios los tipos de olores pueden ser: dulce, naftalínico, almizclado, alcanforado, jazmínico, anisado, graso, floral y leñoso.

Sabor: Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj, para luego hacer contacto con la lengua y se determinó el tipo de sabor: El ser humano es capaz de percibir y distinguir 5 sabores elementales: dulce, amargo,

ácido, salado y umami. El umami fue incluido como sabor elemental hace unos años.

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.

➤ **Determinación de la solubilidad**

Solubilidad en agua. Se colocó en un tubo de ensayo un mL de agua destilada, luego se añadió un g de muestra, agitar fuertemente, en caso de no disolverse aumentar el disolvente a 10 mL agitar y observar, así sucesivamente para 0,03 L; 0,1 L; 1 L y más de 10 L .

Solubilidad en alcohol: Se colocó en un tubo de ensayo un mL de alcohol etílico, luego se añadió un g de muestra, agitando fuertemente (en caso de no disolverse aumentar el disolvente a 10 mL agitar y observar así sucesivamente para 0,03 L; 0,1 L; 1 L y más de 10 L.)

➤ **Determinación de pH**

Para determinar el pH se utilizó un potenciómetro.

➤ **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 a 105°C hasta masa constante, seguidamente se desecará 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 constantes (Miranda y Col. 2000).

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 ensayos (g)

100 = Factor matemático.

➤ **Determinación de cenizas totales**

Se pesó no menos de 2,0 g ni más de 3,0 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 incinero en una mufla a una temperatura de 700 a 750°C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante dos horas. Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg (masa constante).

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución, ácido nítrico al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco (Miranda y Col. 2000)

Cálculo:

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

Dónde:

C = Porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = Masa del crisol vacío (g)

M₁ = Masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M₂ = Masa del crisol con la ceniza (g)

100 = Factor matemático.

3.7. Formulación de la crema

Cuadro N° 1. Formulación de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. Ayacucho - 2012

PRINCIPIO ACTIVO Y EXCIPIENTES	FÓRMULAS(%)			
	0,5%	1,0%	2,0%	BASE
Extracto hidroalcohólico de "wawiyay"	0,5	1,0	2,0	
Metilparabeno	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
Propilparabeno	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075
Cera lanett N	5,0	5,0	5,0	5,0
Alcohol cetílico	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilenglicol	5,0	5,0	5,0	5,0
Butilhidroxitolueno	0,025	0,025	0,025	0,025
Vaselina sólida blanca	2,5	2,5	2,5	2,5
Agua purificada c.s.p.	100,0	100,0	100,0	100,0

3.7.1 Elaboración de la crema

Formación de la fase oleosa. Se colocó en un recipiente de acero inoxidable provista de baño maría: vaselina blanca, alcohol cetílico y cera lanette N se fundió a 70°C bajo agitación moderada.

Manteniendo la agitación, se añadió propilenglicol, hasta lograr una perfecta incorporación y homogenización manteniendo la temperatura a 70°C (Lab. Markos, 2004).

Formación de la fase acuosa. En un recipiente adecuado de acero inoxidable provista de baño maría se cargó agua purificada y se calentó a 70 – 75°C, luego se agregó metilparabeno y propilparabeno, se agita hasta disolución completa.

En un recipiente adecuado de vidrio se cargó agua purificada, y se agregó bajo agitación moderada extracto de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", hasta disolución completa (Lab. Markos, 2004).

Formación de la emulsión final. Una vez que los ingredientes estén totalmente disueltos en sus respectivas fases y manteniendo las correspondientes temperaturas. Se incorporó lentamente bajo agitación moderada la *fase acuosa* sobre *la base oleosa*, evitando la formación de burbujas, hasta lograr una emulsión completa. Se apagó las fuentes de calor y se dejó que la temperatura descienda normalmente en una hora mientras se continúa agitando constantemente.

La emulsión formada se caracteriza por ser blanca y fluida, se verificó el pH (entre 5,0 a 7,5), si fuera necesario ajustar el pH con hidróxido de sodio 1N o con ácido clorhídrico 1N (en mi investigación no fue necesario) seguir agitando moderadamente.

Se verificó el peso final del lote, se dejó en reposo hasta su enfriamiento en un ambiente aséptico. Una vez verificado sus controles y ensayos, se envasó en un ambiente aséptico en sus envases respectivos previamente sanitizados. (Paniagua, 2008) (Lab. Markos, 2004) (DIGEMID, 1999).

3.7.2. Control de los parámetros fisicoquímicos y biológicos de la crema

Para determinar y establecer la calidad de un producto farmacéutico, este debe de cumplir con ciertas especificaciones establecidas en las farmacopeas u otras bibliografías científicas autorizadas, por tanto los parámetros evaluados en la forma farmacéutica semisólida elaborada son los siguientes:

a) Determinación de las características organolépticas

Se determinó las características organolépticas de la crema siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en el párrafo de evaluación de los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico del "wawillay".

b) Identificación de compuestos químicos

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de la hojas de "wawillay", fueron realizadas siguiendo los procedimientos de Lock de Ugaz (1994), Miranda y Col. (2000), del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana - Cuba.

c) Determinación de pH

Para determinar el pH se siguió el método de Fiedler, se tomó 5 a 10 g. de crema en un vaso precipitado y luego se llevó a baño maría, se fundió la muestra y se agregó 30 mL de agua bidestilada a pH 7 calentada a 70°C, se mezcló bien hasta formación de dos fases; se filtró la fase acuosa y se determinó el pH del filtrado.

d) Determinación del tipo o signo de emulsión

Método de dilución. En dos tubos de ensayo se colocó uno a cinco mL de emulsión, a uno de ellos se agregó cinco mL de agua y al otro cinco mL de vaselina líquida, 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 homogéneo en vaselina o alcohol la fase externa es oleosa (O/W).

Método de los colorantes. En dos láminas portaobjetos, se colocó uno o dos gotas de emulsión y a uno de ellos se adicionara azul de metileno (solución acuosa concentrada o cristales concentrados) y a la otra sudan III (solución oleosa o cristales), se mezcló y se llevó al microscopio para su observación.

Cuando el colorante es soluble en la fase externa se observó un campo uniformemente coloreado (azul de metileno = color azul y sudan III = color rojo) y puntos incoloros refringentes de la fase interna. Así mismo, cuando el colorante es soluble en la fase interna (glóbulos) se observó puntos coloreados con el correspondiente colorante y el resto del campo incoloro.

e) Determinación del índice de extensibilidad

Para realizar este ensayo se utilizaron dos placas de cristal (10 x10 cm.) entre las cuales se colocó una cantidad pesada del preparado (por ejemplo = 2 g), trabajar a una variación de temperatura de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Se coloca la placa inferior de cristal sobre una hoja de papel milimetrado. Se recuadra la placa y se trazan las diagonales, se coloca la muestra del preparado sobre el punto de intersección. Se pesa 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 ($\text{Área} = n(d/2)^2$) frente a los pesos empleados.

3.8. Determinación de la actividad antibacteriana.

3.8.1. Método

Para evaluar la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, frente a la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", se empleó el método de difusión radial en medio agarizado, según recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Esta técnica estandarizada por la NCCLS está basada en el método de Kirby-Bauer.

3.8.2. Fundamento

En el método de Kirby-Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se inoculan por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja el disco, entonces si el compuesto es efectivo contra el microorganismo probado se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido en el

compuesto. El tamaño de la zona de inhibición proporciona indicios de la relativa actividad de la sustancia, en nuestro caso de las cremas.

3.8.3 Procedimiento

- a) Se preparó el Agar Muller Hilton, disolviendo 37 gramos para un litro de agua destilada a fuego directo y se autoclavó por 15 minutos a 121°C.
- b) Se prepararon 50 placas conteniendo 8 a 14 mL de Agar Muller Hilton según diámetro de la placa Petri y se incubó a 37°C por 24 horas.
- c) Se repicó por el método de estrías el cultivo madre de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, proporcionados por el Instituto Nacional de Salud, en las placas de contenían el Agar y se incubó a 37°C por 24 horas.
- d) Las colonias formadas fueron inoculadas en un tubo que contenía el caldo nutritivo Peptona y se incubaron a 37°C por 24 horas.
- e) Se tomó 0,5 mL de cultivo de bacterias y se incorporó en las placas que contenían Agar Muller Hilton y se esparció con la espátula de Drigalski.
- f) Luego se colocaron los discos de sensibilidad de Oxacilina 1 µg, Ciprofloxacino 5 µg, Gentamicina 10 µg, Sulfametoxazol 3,75 µg más Trimetropin 21,25 µg y Ceftriaxona 30 µg (Laboratorio BBL™), enseguida se llevaron a incubar a 37°C por 24 horas.
- g) Luego se impregno discos de papel secante de 6 mm de diámetro y 0,6 mm de grosor con las diferentes concentraciones de crema de 2%, 4% y 6% y se incorporó en las placas que contienen Agar Muller Hilton, enseguida se llevaron a incubar a 37°C por 24 horas.
- h) Interpretación: la actividad se determina por el diámetro del halo de inhibición 6 mm es negativo; 6 – 9 mm es intermedio y mayor a 9 mm es positivo (Cáceres, 1996).

- i) Luego se calculó Porcentaje de inhibición respecto a los estándares (Oxacilina 1 µg, Ciprofloxacino 5 µg, Gentamicina 10 µg, Sulfametoxazol 3,75 µg más Trimetropin 21,25 µg y Ceftriaxona 30 µg usando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Halo inhibición}_{(mp)} - \text{Halo inhibición}_{(bl)}}{\text{Halo inhibición}_{(st)}} \times 100$$

Dónde:

mp : muestra problema

bl : blanco

st : medicamento estándar de referencia

Halo de inhibición: milímetros

3.9. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico, control de calidad físico química se presentan en cuadros y gráficos. Los promedios de halos de inhibición de la actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones de la crema se presentan en gráficos y se realizó el análisis varianza para la comparación de medias y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan al 95% de nivel de confianza.

IV. RESULTADOS

Cuadro Nº 2. Parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

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	8,77%

Cuadro Nº 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Alcaloides	Dragendorff	+	Opalescencia ligera
	Mayer	+	Opalescencia ligera
	Wagner	-	Incoloro
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

LEYENDA:

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

Cuadro N° 4. Parámetros de las características organolépticas y pH de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

PARÁMETROS	ENSAYOS	FÓRMULAS	RESULTADOS
Características organolépticas	Color	Crema 0,5%	Beige claro
		Crema 1,0%	Beige
		Crema 2,0%	Beige oscuro
		Crema base	Blanco nieve
	Olor	Crema	Suigeneris a extracto
	Sabor	Crema	Amargo
	Aspecto	Crema	Homogéneo
Ph	Cremas	Crema base	6,93
		Crema 0,5%	6,04
		Crema 1,0%	5,90
		Crema 2,0%	5,30

Cuadro Nº 5. Tipo de emulsión de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2012

MÉTODOS	SOLVENTE	RESULTADOS
Dilución	Agua purificada	Homogéneo Soluble (Emulsión <i>OW</i>)
	Alcohol etílico	Heterogéneo Insoluble
Colorantes	Solución de azul de metileno	Fase externa color azul Fase interna incolora (Emulsión <i>OW</i>)
	Solución de Sudan III	Fase externa incolora Fase interna color rojo

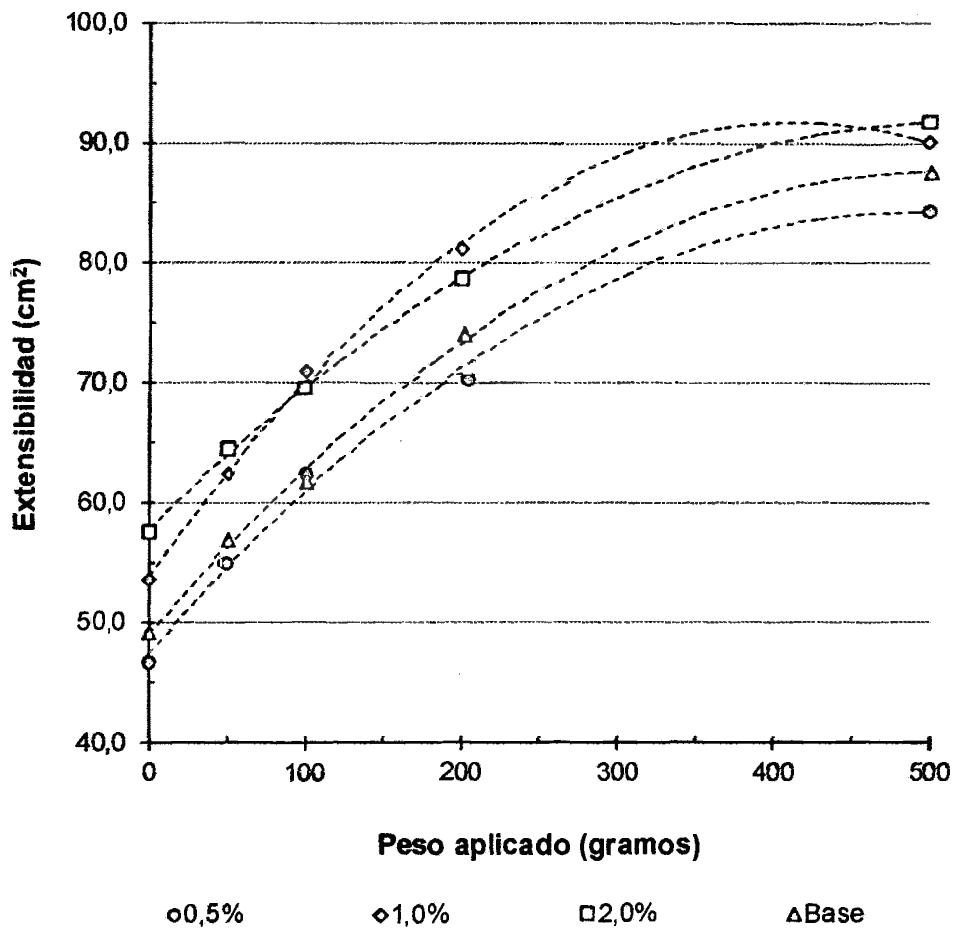


Gráfico Nº 1. Variación de la extensibilidad en función del peso aplicado a las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

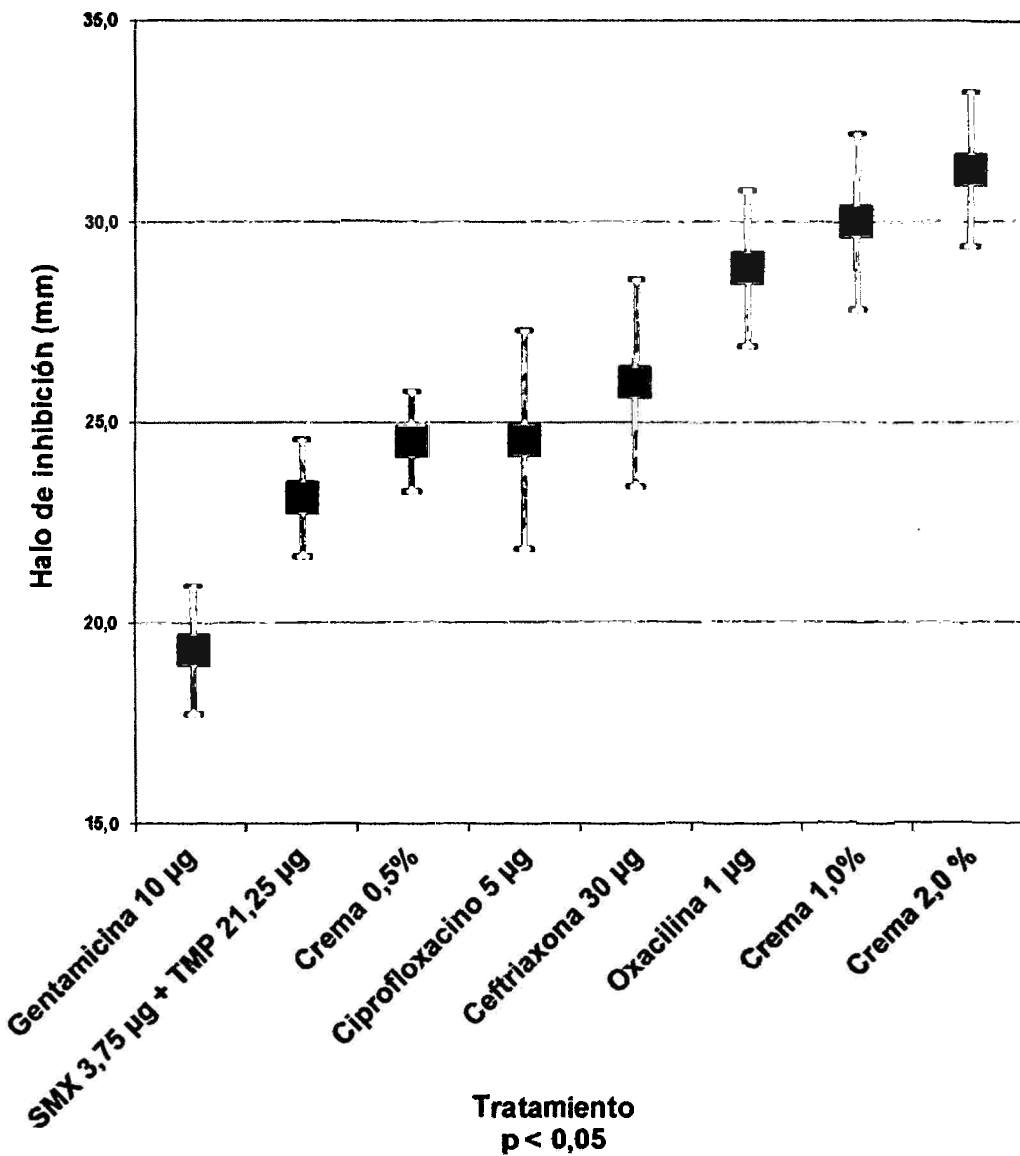


Gráfico Nº 2. Variación de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

Cuadro Nº 6. Comparaciones múltiples de Duncan de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto.

Tratamiento	N	Sub conjuntos homogéneos				
		1	2	3	4	5
Gentamicina 10 µg	5	19,32				
SMX 3,75 µg + TMP 21,25 µg	5		23,11			
Crema 0,5%	5		24,53	24,53		
Ciprofloxacino 5 µg	5		24,56	24,56		
Ceftriaxona 30 µg	5			25,98		
Oxacilina 1 µg	5				28,86	
Crema 1,0%	5				30,02	30,02
Crema 2,0 %	5					31,31
Sig.		1,000	0,194	0,191	0,266	0,220

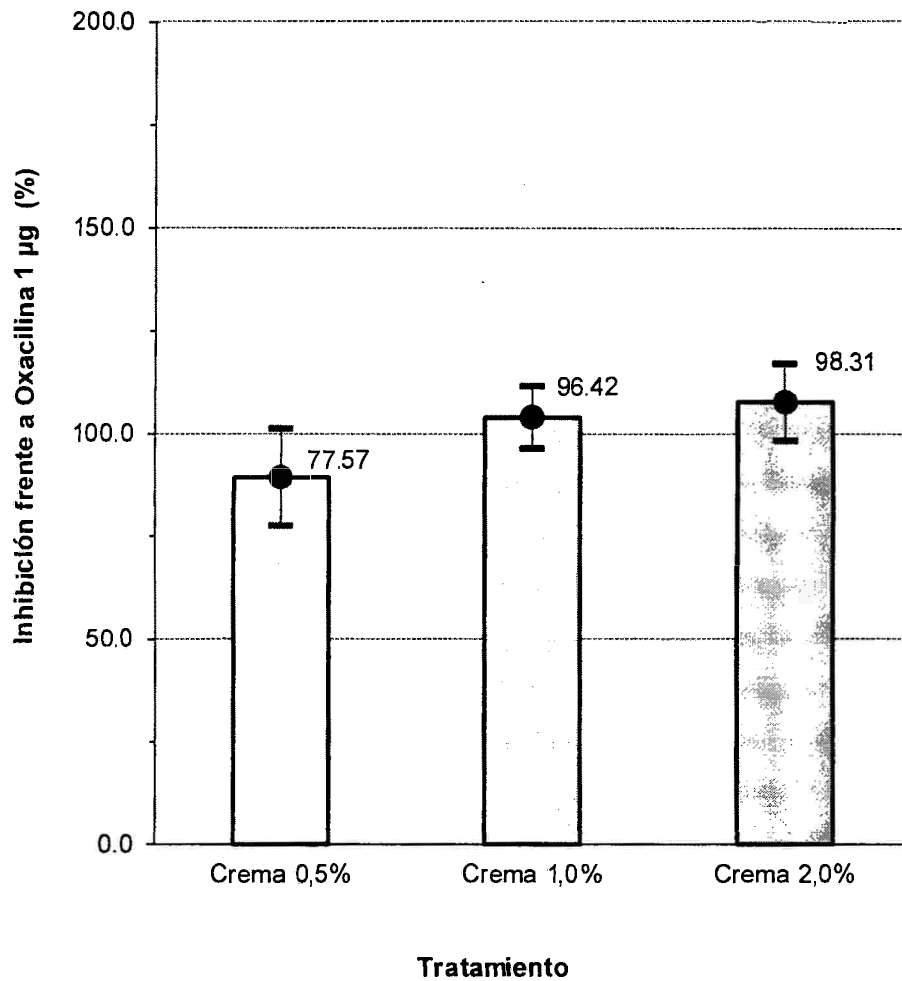


Gráfico Nº 3. Porcentaje de inhibición a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a Oxacilina 1 µg (100%) por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

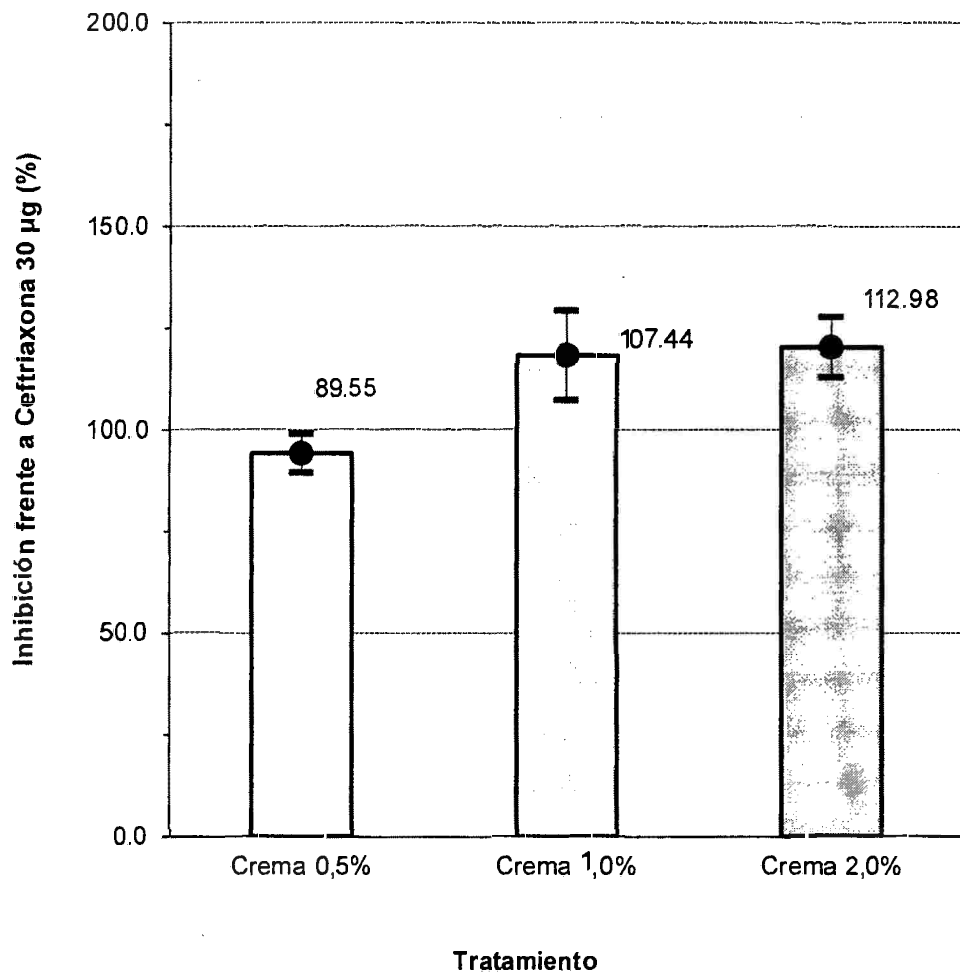


Gráfico Nº 4. Porcentaje de inhibición a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a Ceftriaxona 30 µg (100%) por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2012.

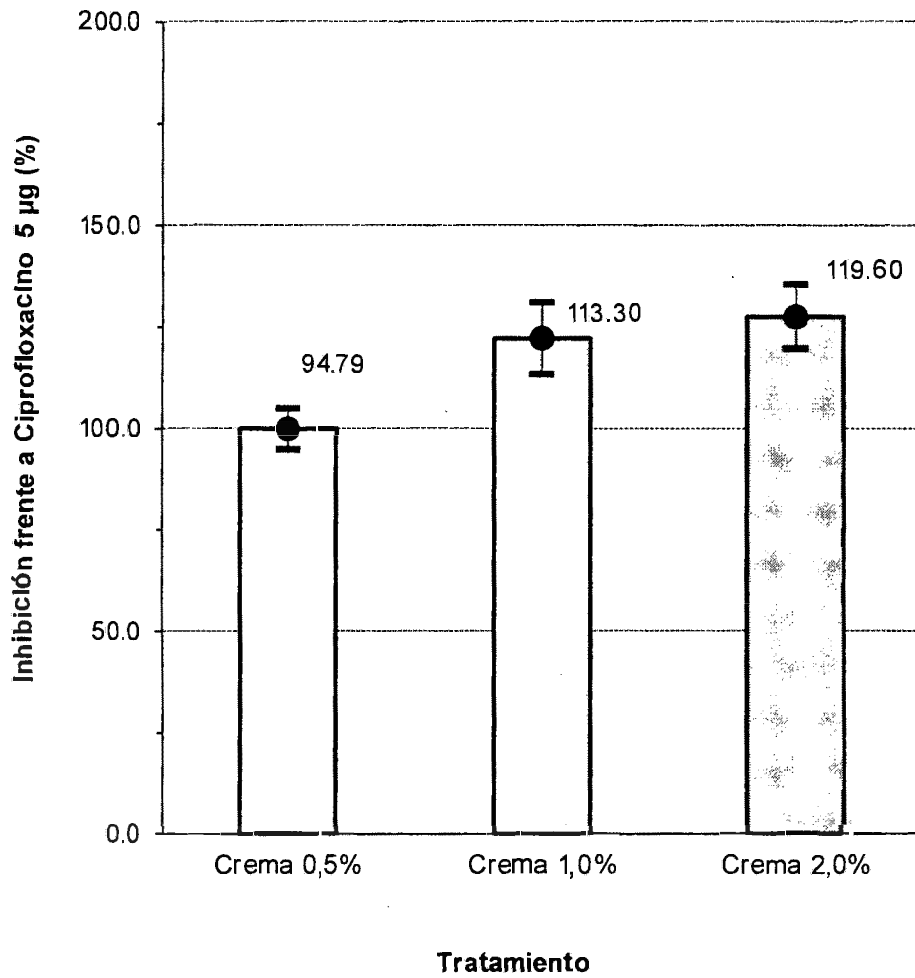


Gráfico N° 5. Porcentaje de inhibición a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a Ciprofloxacino 5 µg (100%) por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2012.

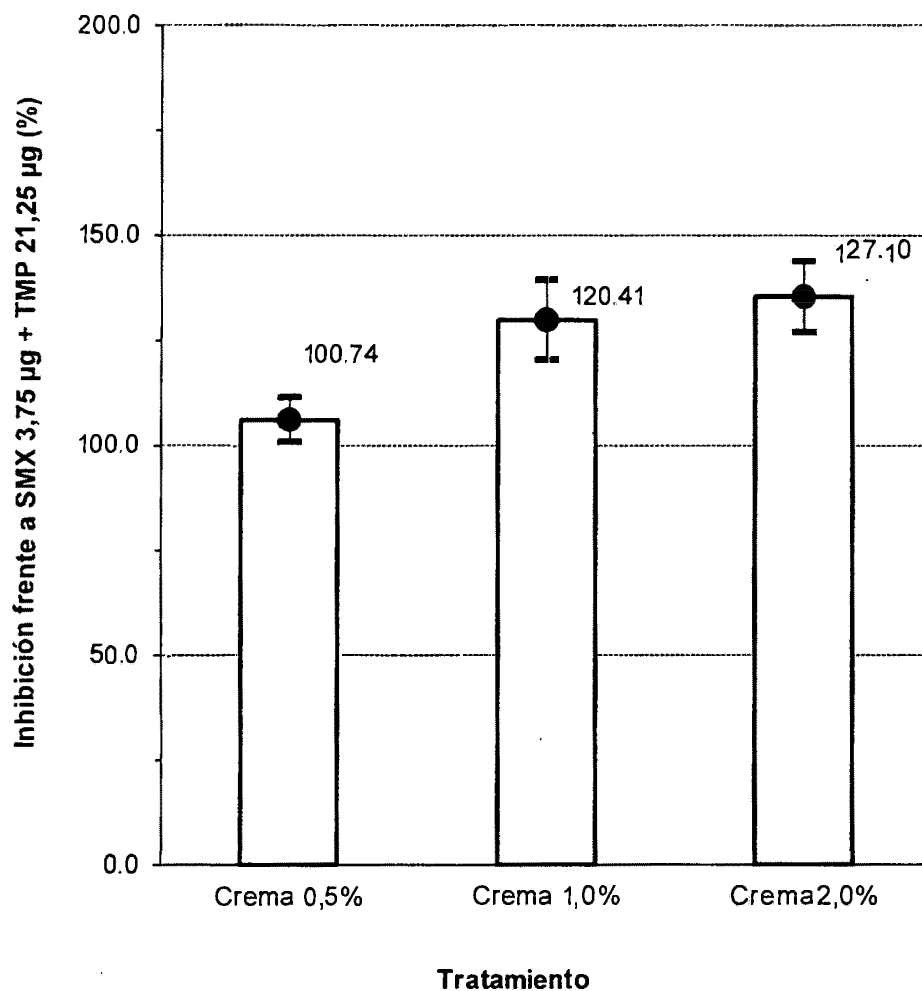


Gráfico Nº 6. Porcentaje de inhibición a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a SMX 3,75 µg + TMP 21,25 µg (100%) por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

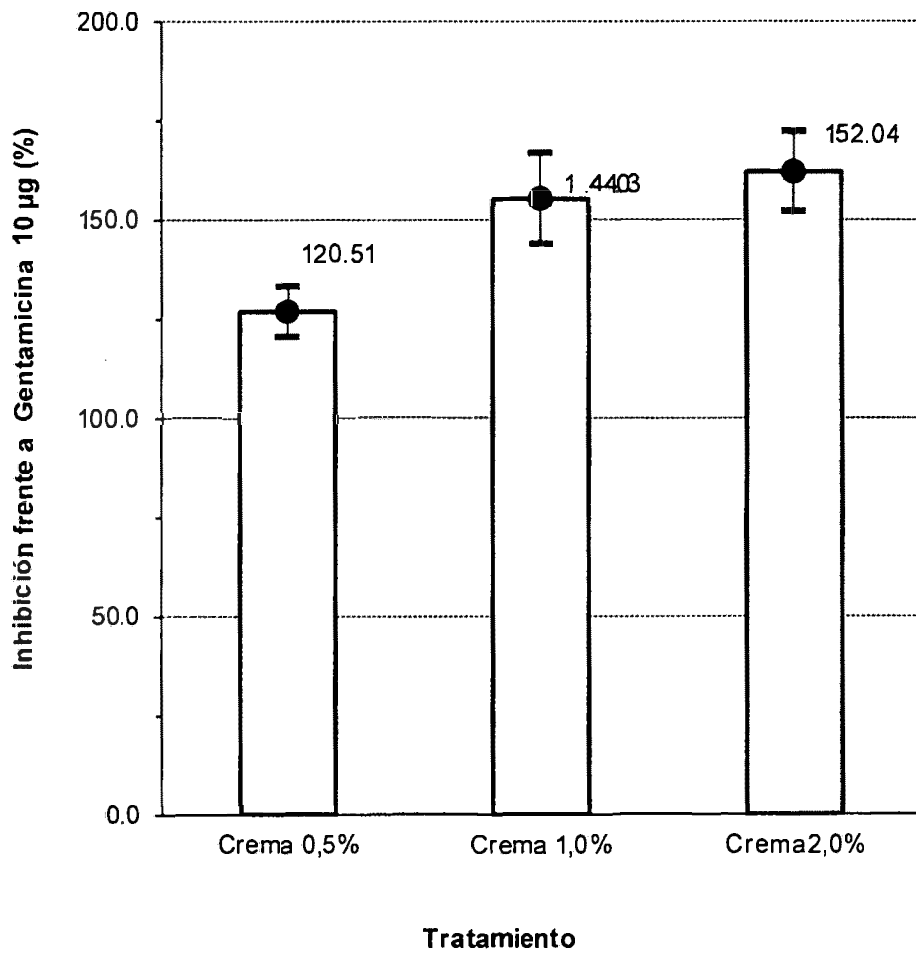


Gráfico N° 7. Porcentaje de inhibición a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a Gentamicina 10 µg (100%) por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012.

V. DISCUSIÓN

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", presenta 6,75% de humedad; 20,97% de sustancia solubles; 5,24% de cenizas y un rendimiento de 8,77% (Cuadro Nº 2). El extracto es de color marrón claro, de olor *sui generis*, sabor amargo y aspecto homogéneo. También cabe mencionar que es bastante soluble en agua y tiene un pH de 5,34.

Los metabolitos secundarios identificados fueron azúcares reductores, catequinas, cumarinas, saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, antocianidinas, quinonas, triterpenos y esteroides; Demostrándonos que en el proceso de secado por atomización no se pierden los metabolitos secundarios responsables del efecto farmacológico, tal como se muestran en el Cuadro Nº 3. Asimismo, podemos confirmar que en el proceso de desarrollo de la crema no se pierden los metabolitos secundarios que teóricamente tienen actividad antibacteriana, como los flavonoides, taninos y fenoles, cumarinas y triterpenos. En el Cuadro Nº 4, se presenta los resultados de las características organolépticas de las cremas, en ella se aprecia que el color de las cremas dependen de la concentración de extracto hidroalcohólico de "wawillay". La crema base es de un color blanco nieve, la crema al 0,5 % color beige claro, la crema 1,0 % color beige y la crema 2,0 % color beige oscuro. Las cremas tienen un olor *sui generis*

característico al extracto hidroalcohólico de "wawillay" debido al olor característico de esta planta, un sabor ligeramente amargo debido a la presencia más que nada a los excipientes. Esta forma farmacéutica semisólida presenta un aspecto homogéneo el que nos demuestra su buena estabilidad.

En el Cuadro Nº 4, se muestran los resultados del pH de las cremas; la crema base tiene un pH de 6,93 ligeramente ácido, crema 0,5% un pH de 6,03 ácida, crema 1,0% un pH de 5,90 ácida y crema 2,0% un pH de 5,30 muy ácida. El ungüento hidrófilo denominado también crema de emulsión O/W aniónicas son inestables a un pH inferior a 5,00 como describe Fernández (1998), por tanto el pH de las cremas están dentro de las especificaciones que oscilan entre 5,00 a 7,50 tal como menciona en sus procedimientos el Laboratorios Farmacéuticos Markos (2004). Es necesario tener en cuenta el pH de la piel que oscila entre 4,85 para los hombres y 5,00 para las mujeres como menciona Orlandi (2004), cuando el pH de la superficie es más alcalino, se produce prurito y dermatitis de carácter inespecífico, las que se evitan con la formulación de cremas con pH cercano a la piel, por tanto la crema 2,0 % se asemejan al pH de la piel.

En el Cuadro Nº 5, se reporta el tipo de emulsión de las cremas, es homogénea en agua y heterogénea en alcohol etílico, comprobando que es una emulsión O/W, lo que se verifica cuando se prueba con Azul de Metileno y Sudan III. Las cremas en estudio según Vila (2001) y Gennaro (2003) se les denomina emulsiones O/W, formas farmacéuticas constituidas por dos fases, una lipófila y otra acuosa, debido a que la fase externa es de naturaleza acuosa por la presencia en su composición de emulsificantes tipo O/W, en este caso es la cera Lanette N. Por tanto, hay una necesidad de ser evaluada si la forma farmacéutica semisólida en estudio corresponde a lo descrito anteriormente, en el Cuadro Nº 5 presenta dos métodos para determinar el tipo de emulsión; según

el método por dilución las cremas en estudio son solubles en agua y presentan un aspecto homogéneo, es decir si presenta una dispersión homogénea en agua la fase externa es acuosa, decimos entonces que es una emulsión O/W. Por el otro método de los colorantes nos muestra que al adicionar azul de metileno la fase externa es de color azul, es decir todo el campo se colorea uniformemente con algunos puntos refringentes, debido a que el azul de metileno es hidrosoluble. Y al adicionar el Sudam III se observa puntos de color rojo y el resto del campo incoloro, esto debido a que el Sudam III es liposoluble. Por tanto, decimos que las cremas son emulsiones O/W.

En el Gráfico N° 1, se presentan los resultados de la prueba de extensibilidad de las cremas elaboradas a base de extracto hidroalcohólico de "wawillay". En un estudio de formulación de formas farmacéuticas semisólidas es necesario evaluar el comportamiento reológico debido a que las propiedades reológicas tienen una gran influencia en la estabilidad y en la textura de los mismos como menciona Signorelli (2005). En este estudio se considera el índice de extensibilidad que proporciona una medida del umbral de deformación del sistema. Podemos observar que la extensibilidad es aproximadamente proporcional al peso aplicado (a mayor peso, mayor extensibilidad), llegando a un punto donde al aplicar mayor peso la extensibilidad es constante. El Gráfico N° 1 muestra que la crema al 2,0% tiene mayor extensibilidad aplicando 500 g de peso, igual a $72,43 \pm 5,95 \text{ cm}^2$, seguido de la crema 1,0% con $71,64 \pm 6,50 \text{ cm}^2$, crema 0,5% con $63,71 \pm 6,47 \text{ cm}^2$ y la crema base con $65,87 \pm 6,78 \text{ cm}^2$, estos comportamientos puede ser debido a que las cuatro formulaciones tienen diferentes cantidades de agua (Anexo N° 3).

Para demostrar la actividad antibacteriana se trabajó con concentraciones de 0,5%, 1,0% y 2,0% de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico

de "wawillay", los mismos que se enfrentaron a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De los resultados podemos mencionar que la crema al 0,5% presenta una media de halo de inhibición de $24,53 \pm 0,45$ mm; la crema al 1,0% presenta una media de $30,02 \pm 0,79$ mm y la crema al 2,0% un valor de $31,31 \pm 0,70$ mm. Estos resultados fueron comparados con Discos de Sensibilidad de Ceftriaxona (30 µg), Oxacilina (1 µg), Sulfametoxazol más Trimetropin (3,75 µg /21,25 µg), Ciprofloxacino (5 µg) y Gentamicina (10 µg), presentando valores de halos de inhibición de $25,98 \pm 0,93$ mm; $28,86 \pm 0,70$ mm; $23,11 \pm 0,53$ mm; $24,56 \pm 0,98$ mm y $19,32 \pm 0,57$ mm respectivamente. Podemos concluir que las cremas elaboradas a base de extracto hidroalcohólico de "wawillay" poseen actividad antibacteriana, ya que tiene valores de halo de inhibición mayores a 6 mm (Cáceres, 1996) y que la actividad es dependiente de la concentración (Gráfico N° 2). También observamos que la actividad de las cremas es superior a los discos de sensibilidad, esto posiblemente debido a que sus cantidades son inferiores, respecto a la cantidad de crema utilizada.

Al realizar el análisis de varianza se obtuvo un valor de $3,08 \times 10^{-12}$ (Anexo N°2), siendo altamente significativo e indicativo que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los halos de inhibición de los tratamientos. Al realizar las comparaciones múltiples de Duncan podemos observar que la crema al 1,0% y 2,0% presentan halos de inhibiciones estadísticamente similares y superiores a todos los demás tratamientos (Cuadro N° 6).

En los Gráficos N° 3, 4, 5, 6 y 7, se muestran los resultados del porcentaje de la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de "wawillay" frente a discos de sensibilidad de Oxacilina, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Gentamicina y Sulfametoxazol más Trimetropin. Podemos observar que hay relación concentración actividad, o sea a mayor

concentración de la crema, mayor es el porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Así, la crema al 2% frente a Oxacilina tiene un porcentaje de inhibición de $107,73 \pm 2,96\%$; frente a Ceftriaxona $120,44 \pm 2,69\%$; frente a Ciprofloxacino $127,49 \pm 2,84\%$; frente a Sulfametoxazol más Trimetropin $135,49 \pm 3,02\%$ y frente a Gentamicina $162,07 \pm 3,61\%$.

Romero y Col. (2009) reportan la actividad antibacteriana del extracto de las especies del genero *Calceolaria*, frente a dos cepas gram positivas, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, tres cepas gram negativas *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy* y *Pseudomonas aeruginosa* y finalmente una levadura *Candida albicans*, donde se observa que la especie *Calceolaria engleriana* y *Calceolaria cuneiformis*, son las que tiene mayor actividad antimicrobiana, lo cual se corrobora con nuestros resultados.

Lock de Ugaz (1994), refiere que los flavonoides poseen mayor actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas que con las gram negativas, por la presencia de hidroxilos, inhibiendo la síntesis de ADN.

Cowan (1999), sostiene que la actividad antimicrobiana de los taninos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular de las bacterias, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. Los fenoles ácidos y ácidos fenólicos, en especial el ácido caféico es eficaz frente a bacterias, hongos y virus. La posición y el número de grupos hidroxilo del grupo fenol parece influir en el efecto antimicrobiano de tal forma que a mayor grado de hidroxilación mayor poder tóxico y mayor poder inhibitorio. El mecanismo responsable del efecto antimicrobiano de los fenoles parece estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados, posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacción con proteínas. Las quinonas, tienen capacidad para formar complejos irreversibles

con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas establece su potencial como agentes antimicrobianos al conducir a la inactivación y pérdida de función de estas proteínas. Asimismo y de manera secundaria, las quinonas pueden inducir la formación de sustratos no asimilables por los microorganismos. Las flavonas, flavonoides y flavonoles, son producidas de manera natural por las plantas como respuesta a procesos infecciosos, por lo que no se extraña que se haya demostrado *in vitro* su eficacia antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos. Su actividad es debida probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y con la pared celular de la bacteria, de forma análoga a las quinonas. Los flavonoides poseen, así mismo efectos inhibitorios frente a múltiples virus. Existen numerosos estudios que demuestran su eficacia frente al virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Los taninos presentan 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 publicados 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. 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 inhibitorias de microorganismos gran positivos y las fitoalexinas, derivado hidroxilados de las cumarinas tienen actividad antifúngica. De los terpenoides, cerca del 60% de los aceites esenciales conocidos son

inhibitorios frente a hongos y un 30% frente a bacterias, aunque también hay evidencias de su acción sobre virus y protozoos (Cantón y Col, 2012).

Palomino (2000), señala que la existencia de un halo de inhibición aunque sea pequeña cuando se trabaja con material vegetal determina cierta actividad antibacteriana que puede ser mejorada con el uso de nuevas técnicas de extracción a fin de conseguir mayor concentración de principios activos y obtener mejores resultados.

VI. CONCLUSIONES

1. Los parámetros físicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl son 6,75% de humedad; 20,97% de sustancia solubles; 5,24% de cenizas y un rendimiento de 8,77%. El extracto es de color marrón claro, de olor sui géneris, sabor amargo y aspecto homogéneo, bastante soluble en agua y con un pH de 5,34.
2. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl fueron azúcares reductores, catequinas, flavonoides, fenoles y taninos, quinonas y triterpenos y esteroides.
3. Las cremas al 0,5 % presenta un color beige claro, la crema 1,0 % color beige y la crema 2,0 % color beige oscuro, tienen un pH de 6,04; 5,90 y 5,30 respectivamente.
4. La crema al 0,5% presenta una media de halo de inhibición de $26,53 \pm 0,449$ mm; la crema al 1,0% presenta una media de $32,02 \pm 0,791$ mm y la crema al 2,0% un valor de $33,31 \pm 0,699$ mm, demostrando que poseen actividad antibacteriana. El porcentaje de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de "wawillay"

frente a discos de sensibilidad fueron: con Oxacilina alcanzó un porcentaje de inhibición de $107,73 \pm 2,96\%$; Ceftriaxona $120,44 \pm 2,69\%$; Ciprofloxacino $127,49 \pm 2,84\%$; Sulfametoxazol más Trimetropin $135,49 \pm 3,02\%$ y Gentamicina $162,07 \pm 3,61\%$.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar el estudio de estabilidad de cremas O/W elaborados a base del extracto de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", a una concentración de un 2,0% y su posterior estudio clínico las cuales nos permitirá contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes.
2. Realizar otra forma farmacéutica, a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".
3. Realizar el estudio de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", frente a otros microorganismos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aedes.** 1998. Estudio de la biodiversidad vegetal y animal, cuenca de Cotahuasi: flora medicinal. Concejo Provincial de La Unión, Secretaria Técnica La Unión Arequipa-Perú.
2. **Alonso, J.** 2004. Tratamiento de Fitofármacos y Nutraceuticos. 1era edición Argentina. Pág. 938-230 1037-1041.
3. **Brack, A.**1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas, Cuzco-Perú.
4. **Bravo H, Copaja S, Figueroa-Duarte S, Lamborot M, San Martin.** 2005. 1,4-Benzoxazin-3-one,2-benzoxazolinona and gallic acid from *Calceolaria thyrsoiflora* Graham and their Antibacterial Activity. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Universidad de Chile.
5. **Bhupinder P, Khambay, Duncan Batty, Matthew Cahill, and Ian Denholm.**1999. Isolation Characterization, and Biological activity of Nafthoquinones from *Calceolaria andina* L.J. Agric. Food Chem, 47(2). 770– 775.
6. **Cabrera, A.** 1993. Flora de la provincia de Jujuy. Colección Científica. INTA XIII (9):1-560
7. **Cáceres, A.**1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. editorial Universitaria.
8. **Cantón R y Paz M.** 2012. Plantas medicinales con actividad antiinfecciosa y antiparasitaria. Curso de Plantas Medicinal y Fitoterapia Modulo III. Consejo General de Colegio Oficial de Farmacéuticos Universal Complutense de Madrid.pag 179 – 209.

9. **Castillo, L.** 2004. Actividad hipoglucemiante del extracto liofilizado de *Calceolaria engleriana Subsp.lutea Molau*.
10. **Chamy M, Piovano M, Garbarino J.** 2007. Diterpenoides from *Calceolaria recta, paposona*. Nat. Prod.res. feb;21(2):141-8
11. **Cornejo, V.** 1987. Las plantas medicinales y su correcta utilización. Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho-Perú.
12. **Cowan, M.** 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology.Rev.12 (4): 564 – 582.
13. **Del Castillo** 2004. Actividad hipoglucemiante y toxicidad del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria engleriana* Kraenzlin "ayazapato". Tesis en Farmacia y Bioquímica .Facultad de ciencias Biológicas UNSCH.
14. **DIGEMID.** 1999. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas - Ministerio de Salud. Resolución Ministerial N° 055-99.SA/DM Lima.
15. **Domínguez-Gil, A.** 2008. Catedrático de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, en declaraciones a la revista Estar bien, edición digital, 8, octubre de 2008, N° 71.
16. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.**1988. 5ª Edición. Dirección General de Control de Insumos para la Salud – Secretaria de Salud. México.
17. **Font Quer,** 1978. Botánica Pintoresca Editorial Ramos Sopena-Barcelona – España.

18. **Gennaro A.** 2003. Remington Farmacia Tomo 2. 20^a Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.
19. **Goodman L. y Gilman A.** 2004. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Octava edición.
20. **Humberto, B. Lengua V. León M.** 2002. Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto". Revista Oficial de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres – Lima. Vol. 2. N°1-2.
21. **Laboratorios Farmacéuticos Markos.** 2004. Procedimiento de Operación Estándar; Fabricación de Productos semisólidos No Estériles. Lima.
22. **Limaylla, C.** 1999. Estudio Fitoquímico de la *Calceolaria delicatula kragl* (Ayazapato). Departamento Académico de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Ayacucho-Perú.
23. **Litter, M.** 2007. Compendio de Farmacología. Editorial el Ateneo. Lima
24. **Lock de Ugaz, O.** 1994. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Fondo Editorial Pontífice Universidad Católica del Perú. Lima-Perú.
25. **Miranda M.** 1996. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. La Habana.
26. **Miranda M. y Cuéllar A.** 2000. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. La Habana.

27. **Molau, U.** 2003. Two new species of *Calceolaria* (Scrophulariaceae) from the Tropical Andes. *Novon* 13: 101-103.
28. **Molau, U.** 1988. Flora Neotropica. Monograph N°47 Scrophulariaceae. Part.1 Calceolariaceae .The New York Botanical Garden, New York –USA.
29. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)** 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 17:234-8.
30. **Organización Mundial de la Salud (OMS)**, 1991. Pautas para la evaluación de medicamentos herbareos .Ginebra.
31. **Orlandi M.** 2004. Piel Sana y Manto ácido. *Folia Dermatológica del Perú* 15(2): 121 – 124. Lima.
32. **Palomino, J.** 2000. Actividad antibacteriana de *Punica granatum* “granado” en Cepas de *vibrio cholerae* y *Escherichia coli*. Aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Ayacucho 2000.Tesis para optar el título de Biólogo UNSCH – Ayacucho.
33. **Paniagua, J.** 2008. Formulación y evaluación de la actividad antiinflamatoria de una crema y gel elaborados a base del extracto atomizado de la corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. “uña de gato”. Ayacucho - 2008. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNSCH–Ayacucho.
34. **Pérez, R.** 2012. Actividad antitusiva del extracto hidroalcoholico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. “wawillay”. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNSCH – Ayacucho.
35. **Porto T, Rangel R, Furtado N, De Carvalho T, Martis C, Veneziani R, Da Costa F, Vinholis A, Cunha W, Heleno V, Ambrosio S.** 2009.

- Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens molecules. Pàg. 191-199.
36. **Romero M, Cesar M, Enrique A.** 2009. Aspectos Botánicos, Fitoquímico, Antibacteriano y producción del Género *Calceolaria* en la provincia de Huamanga-Ayacucho. Informe de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH.
 37. **Ruiz, J y Roque, M.** 2009. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-orienté peruano. *Ciencia e Investigación. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM.* 12(1): 41-47.
 38. **Signorelli I.** 2005. Elaboración de una Crema para Uso Tópico a Base de *Urtica dioica* L. *Revista de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.* Vol. 47 (2) Universidad de los Andes. Mérida – Venezuela.
 39. **Silva P, Chamy M, Piovano M, Garbarino G.**1993. Diterpenoids from *calceolaria petiolaris*. *Phytochemistry.* Vol.34 Nº 2 pp.449-451
 40. **Vila J.** 2001. *Tecnología Farmacéutica. Volumen II (Formas Farmacéuticas).* 1ra Reimpresión. Edit. Síntesis S.A. Madrid
 41. **Woldemichael G, Wachter G, Sigh M, Maiese W, Timmermann B.** 2003. Antibacterial diterpenes from *calceolaria pinnifolia*. *J Nat Prod.* Feb; 66(2):246 – 6.
 42. **Wollenweber E, Dorr M, Roitman J,** 2000. Epicuticular flavonoids of some Scrophulariaceae. *Z Naturforsch.* Jan-Feb;55c, 5D9. PubMed-indexed for MEDLINE.

ANEXOS

Anexo N°01

Datos descriptivos de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Crema 0,5%	5	24,53	1,00	0,45	23,28	25,77	23,91	26,31
Crema 1,0%	5	30,02	1,77	0,79	27,83	32,22	27,41	32,07
Crema 2,0 %	5	31,31	1,56	0,70	29,37	33,25	28,85	32,87
Ceftriaxona 30 ug	5	25,98	2,084	0,93	23,39	28,57	23,34	28,60
Oxacilina 1 ug	5	28,86	1,568	0,70	26,91	30,80	26,70	30,90
SMX 3,75 ug + TMP 21,25 ug	5	23,11	1,180	0,53	21,65	24,58	21,80	24,60
Ciprofloxacino 5 ug	5	24,56	2,192	0,98	21,84	27,28	22,72	28,30
Gentamicina 10 ug	5	19,32	1,283	0,57	17,73	20,92	17,22	20,28
Total	40	25,96	4,03	,64	24,67	27,25	17,22	32,87

Anexo N°02

Análisis de del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana*
Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012

Tratamiento	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	548,532	7	78,362	29,54	$3,08 \times 10^{-12}$
Dentro de grupos	84,886	32	2,653		
Total	830,418	39			

Anexo N°03

Datos descriptivos de índice de extensibilidad de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Base	5	65,87	15,16	6,78	47,05	84,69	49,13	87,62
Crema 0,5%	5	63,71	14,48	6,47	45,74	81,69	46,68	84,33
Crema 1,0%	5	71,64	14,53	6,50	53,61	89,68	53,58	90,13
Crema 2%	5	72,43	13,31	5,95	55,90	88,95	57,55	91,82
Total	20	68,41	13,74	3,07	61,98	74,84	46,68	91,82

Anexo N°04

Datos descriptivo de índice de extensibilidad de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Crema 0,5% frente a Gxalicina 1 µg	6	89,42	11,29	4,61	77,57	101,26	82,85	111,57
Crema 1,0 % frente a Oxalicina 1 µg	5	104,03	6,13	2,74	96,42	111,63	94,98	111,12
Crema 2,0% frente a Oxalicina 1 µg	4	107,73	5,92	2,96	98,31	117,15	99,97	113,89
Crema 0,5 % frente a Ceftriaxona 30 µg	5	94,35	3,86	1,73	89,55	99,14	91,97	101,20
Crema 1,0 % frente a Ceftriaxona 30 µg	5	118,45	8,87	3,97	107,44	129,46	105,43	126,43
Crema 2,0 % frente a Ceftriaxona 30 µg	5	120,44	6,01	2,69	112,98	127,90	110,97	127,43
Crema 0,5 % frente a Ciprofloxacino 5 µg	5	99,87	4,09	1,83	94,79	104,95	97,35	101,13
Crema 1,0 % frente a Ciprofloxacino 5 µg	5	122,24	7,20	3,22	113,30	131,18	111,60	130,58
Crema 2,0 % frente a Ciprofloxacino 5 µg	5	127,49	6,36	2,84	119,60	135,39	117,47	133,84
Crema 0,5 % frente a SMX 3,75 µg + TMP 21,25 µg	5	106,14	4,34	1,94	100,74	111,53	103,46	113,85
Crema 1,0 % frente a SMX 3,75 µg + TMP 21,25 µg	5	129,91	7,65	3,42	120,41	139,41	118,61	138,77
Crema 2,0 % frente a SMX 3,75 µg + TMP 21,25 µg	5	135,49	6,76	3,02	127,10	143,88	124,84	142,23
Crema 0,5 % frente a Gentamicina 10 µg	5	126,96	5,19	2,32	120,51	133,41	123,76	136,18
Crema 1,0 % frente a Gentamicina 10 µg	5	155,39	9,15	4,09	144,03	166,76	141,87	165,99
Crema 2,0 % frente a Gentamicina 10 µg	5	162,07	8,08	3,61	152,04	172,11	149,33	170,13

Anexo N°05



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, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Pamela Cristina, ROMANÍ TORRE, 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"

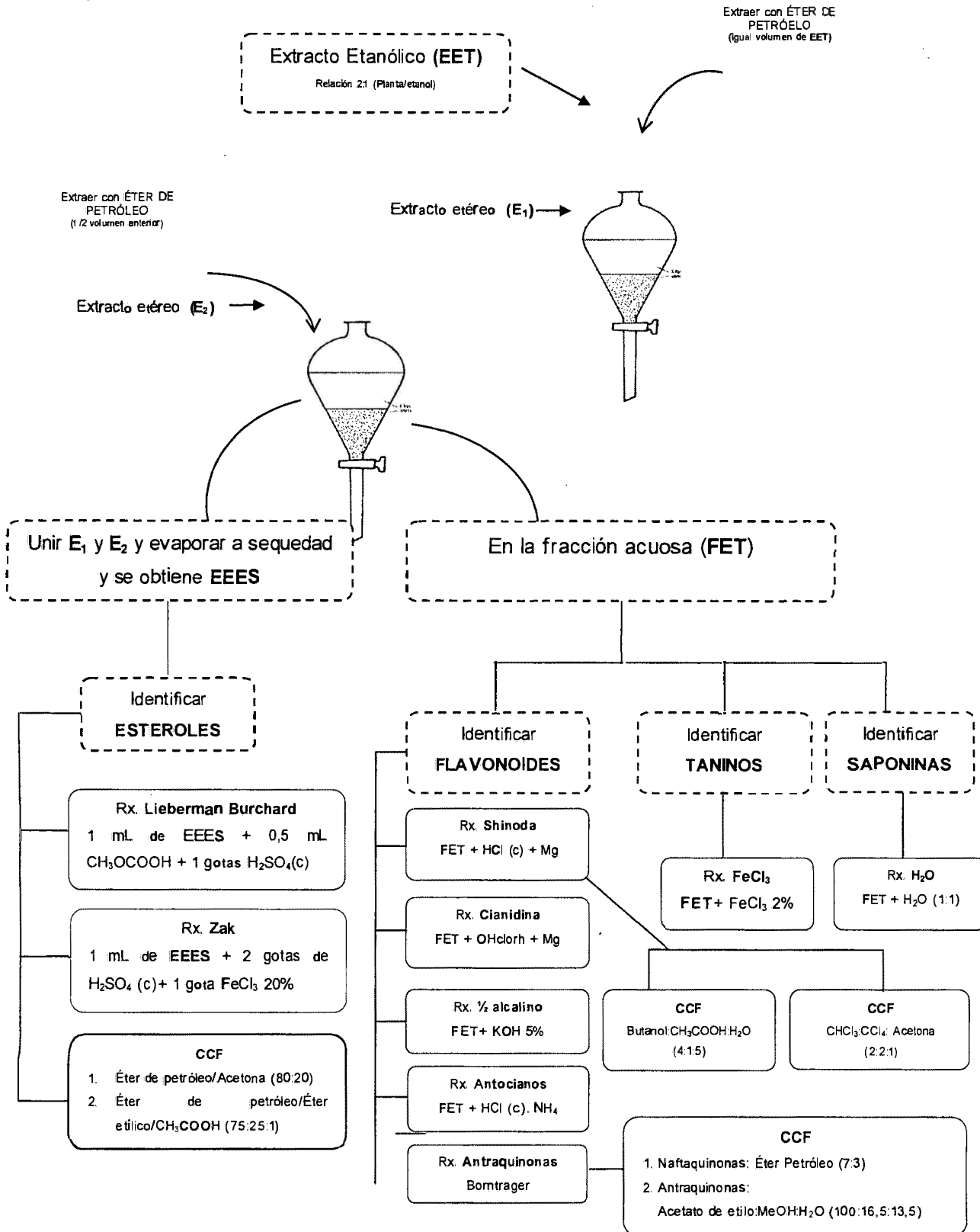
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 07 de Setiembre del 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS
[Firma]
Dña. Lourdes Domínguez de la Cruz
JEFE

Anexo N°06

Identificación de esteroides, flavonoides, antraquinonas, taninos y saponinas.



Anexo N°07

Proceso de recolección de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Proceso de prensado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

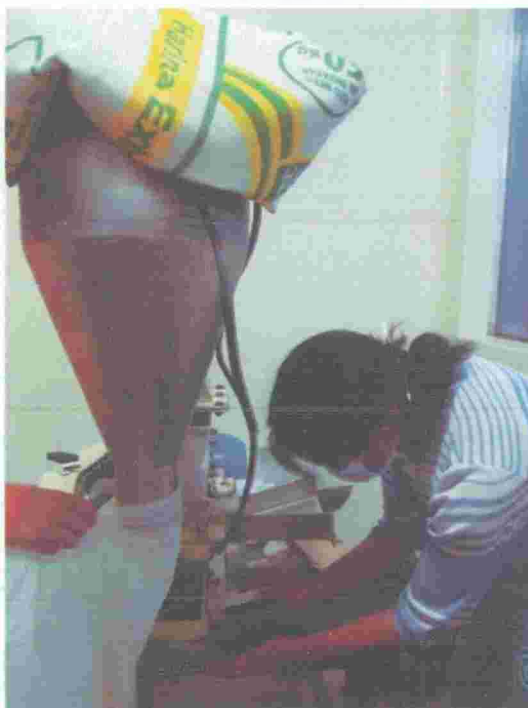


Anexo N°08

Proceso de desecación de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Proceso de molienda de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Anexo N°09

Proceso de maceración de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Proceso de concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Anexo N°10

Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

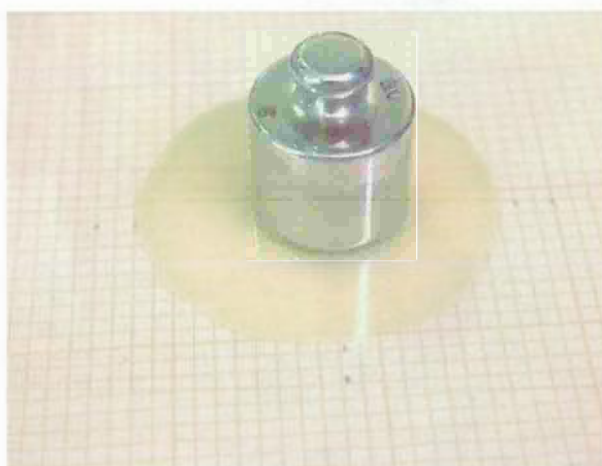


Anexo N°11

Cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

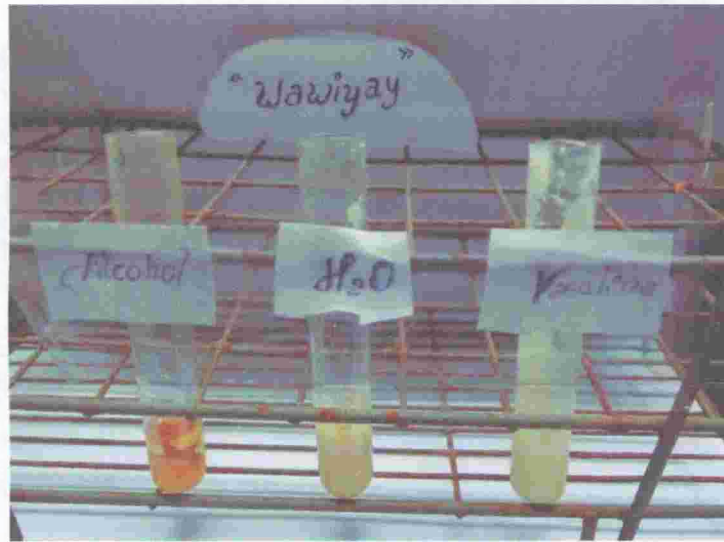


Extensibilidad de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

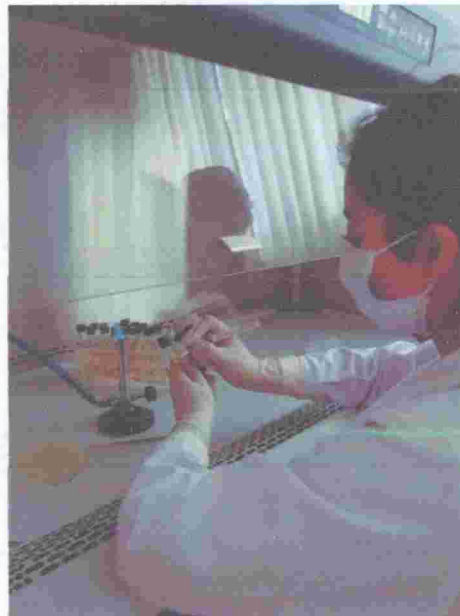


Anexo N°12

Tipo de emulsiones de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".



Siembra en el medio de cultivo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



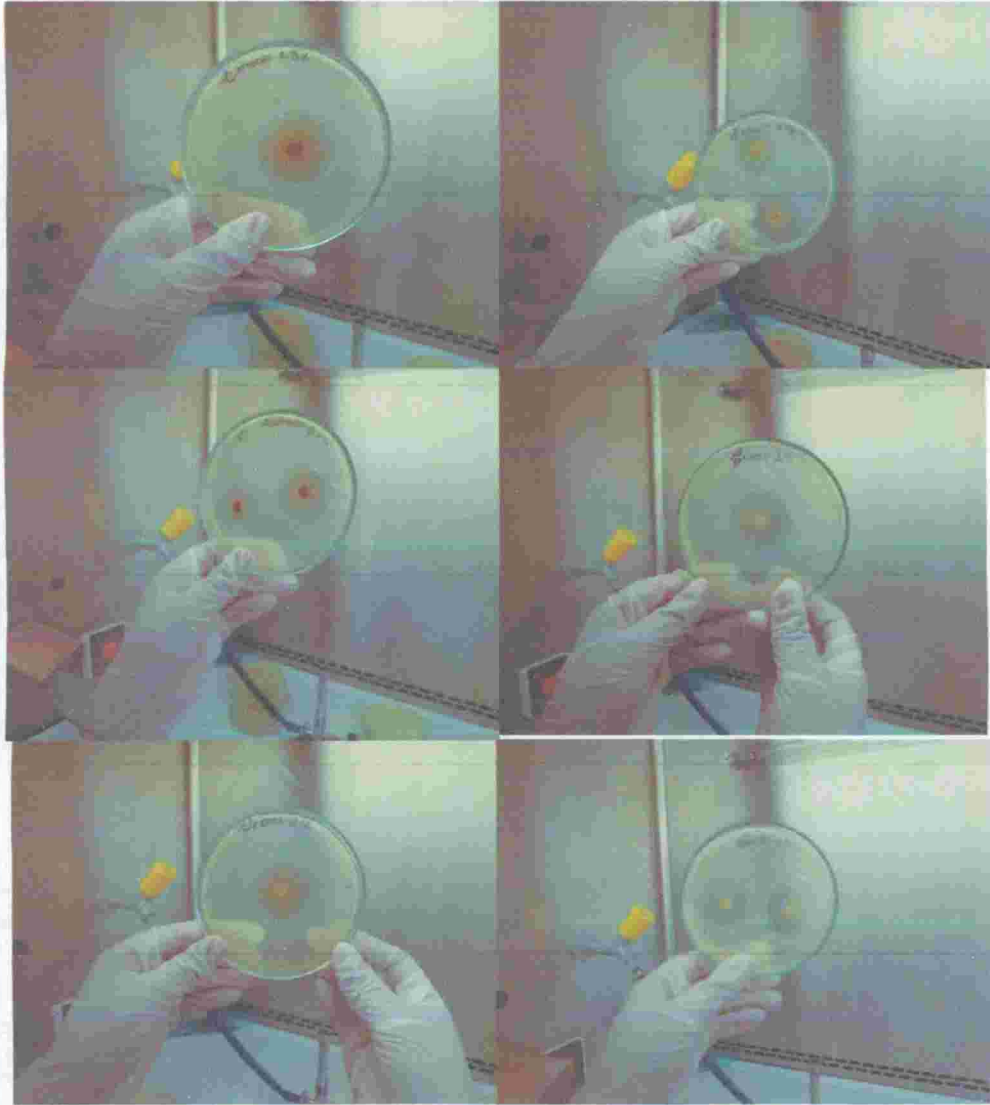
Anexo N°13

Incubación del sembrado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Anexo N°14

Resultados de la prueba antibacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Anexo 15 MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: Actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engeliana* kraenzl "wawillay", Ayacucho 2012
PERSONAL INVESTIGADOR: Romani Torre, Pamela Cristina

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	VARIABLES	METODOLOGIA
Actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl "Wawillay", Ayacucho 2012	¿Tendrá actividad antibacteriana la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl "wawillay"?	<p>Objetivo General:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Evaluar la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl "wawillay". <p>Objetivo Especifico:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Evaluar los parámetros físico químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl. ➤ Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Calceolaria engeliana</i>. ➤ Evaluación de las características físico químicas de la crema antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl. 	<p>Romero y Col. (2009), realizaron una investigación de la actividad antibacteriana, frente a dos sepas gran positivas y tres sepas gran negativas, donde se observa que la especie <i>Calceolaria engeliana</i> tiene mayor actividad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i>. También refieren Bruneton y Kukiński, que los flavonoides, taninos y las naftaquinonas son metabolitos que demuestran una gran actividad antimicrobiana. Asimismo informan que los diterpenos del núcleo primario tuvieron actividad antimicrobiana sobre algunos agentes patógenos orales como: <i>Streptococcus salivarius</i>, <i>S. sobrinus</i>, <i>S. mutans</i>, <i>S. miti</i>, y <i>Lactobacillus casei</i> (Porto y col. 2009). Entre los ensayos <i>in vitro</i> tenemos de macrodilución y microdilución en caldo, dilución en agar y difusión con discos. (Rafael)</p>	<p>Variables I Parámetros fisicoquímicos del extracto</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Olor. • Color. • pH. <p>Variable II Metabolitos secundarios</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Taninos y fenoles. • Flavonoides. • Catequinas. • Saponinas. • Alcaloides. • Triterpenos/esteroides. • Resinas. <p>Variable III Parámetros fisicoquímicos y biológicos de las cremas</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aspecto. • Color. • Olor. • Viscosidad. • Extensibilidad. <p>Variable IV Actividad antibacteriana</p> <p>indicador mm de halos de inhibición</p>	<p>Tipo de estudio: básico</p> <p>Nivel de estudio: Explicativo. Diseño experimental</p> <p>Diseño muestral: Población: hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, de la provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.</p> <p>Muestra: 5kg. De hojas, flores y tallos desecados de <i>Calceolaria engeliana kraenzl</i>, recolectadas durante el mes de junio.</p> <p>Metodología:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se obtiene el extracto de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl "wawillay". Según Olga Look. • Se evaluarán los parámetros fisicoquímicos del extracto (características organolépticas, identificación de compuestos químicos, pH y humedad), según Migdalla. • Se fabricará lotes pilotos de cremas a base del extracto de la hojas de <i>Calceolaria engeliana</i> kraenzl "wawillay", según Vila, J 2001. • Se evaluarán los parámetros fisicoquímicos y biológicos de las cremas. (Organolépticos, identificación de compuestos químicos, pH, viscosidad, extensibilidad y irritabilidad en piel, según Vila, J 2001. • Se evaluará la Actividad Antibacteriana. según el método de Kirby- Bauer.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA CREMA ELABORADA A BASE DE EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *CALCEOLARIA ENGLERIANA* KRAENZL "WAWILLAY"

Bach. Pamela Cristina, ROMANÍ TORRE¹; Mg. Marco Rolando, ARONÉS JARA¹; Mg. Juan Clímaco, PANIAGUA SEGOVIA¹

¹Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y se tuvo como antecedentes el informe de Romero y Col. (2009), quienes reportaron la presencia de compuestos fenólicos y la actividad antibacteriana del extracto de la especie *Calceolaria engleriana*. Por lo tanto, el objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", para lo cual las hojas fueron recolectadas en el Centro Poblado Waraca Anexo Anchac - Huasi a 2 700 m.s.n.m. en el distrito de Vinchos de la región Ayacucho.

El método para evaluar la actividad antibacteriana fue la prueba de Difusión en Placa (Kirby-Bauer).

Los metabolitos secundarios identificados en las cremas fueron azúcares reductores, catequinas, flavonoides, fenoles y taninos, quinonas y triterpenos y esteroides. La crema al 0,5% presentó un halo de inhibición de $24,53 \pm 0,45$ mm; la crema al 1,0% $30,02 \pm 0,79$ mm y la crema al 2,0% un valor de $31,31 \pm 0,70$ mm respectivamente. El porcentaje de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de "wawillay" frente a discos de sensibilidad fueron: con Oxacilina tuvo un porcentaje de inhibición de $107,73 \pm 2,96\%$; Ceftriaxona $120,44 \pm 2,69\%$; Ciprofloxacino $127,49 \pm 2,84\%$; Sulfametoxazol más Trimetropin $135,49 \pm 3,02\%$ y Gentamicina $162,07 \pm 3,61\%$ respectivamente.

Se concluye que la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, tuvo actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las concentraciones evaluadas.

Palabras Clave: Actividad antibacteriana, extracto hidroalcohólico, *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

SUMMARY

This research was conducted at the School of Pharmacy and Biochemistry, and had the background report and Col. Romero (2009), who reported the presence of phenolic compounds and the antibacterial activity of the extract of the species *Calceolaria engleriana*. Therefore, the objective was to determine the antibacterial activity of the cream base elaborated hydroalcoholic extract of leaves of *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", to which the leaves were collected in the center populated Annex Waraca Anchac - Huasi a 2700 m.s.n.m., Vinchos district of Ayacucho.

The method to evaluate the antibacterial activity was the disk diffusion test (Kirby-Bauer).

Secondary metabolites were identified in reducing sugars creams, catechins, flavonoids, phenols and tannins, quinones and triterpenoids and steroids. The 0.5% cream showed a halo of inhibition of 24.53 ± 0.45 mm, 1.0% cream 30.02 ± 0.79 mm and one 2.0% cream value of 31.31 ± 0.70 mm respectively. The percentage of the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 from cream produced from hydroalcoholic extract "wawillay" versus sensitivity disks were oxacillin had a percent inhibition of $107.73 \pm 2.96\%$, for Ceftriaxone $120.44 \pm 2.69\%$; Ciprofloxacin $127.49 \pm 2.84\%$; Sulfamethoxazole and trimethoprim $135.49 \pm 3.02\%$ and $162.07 \pm 3.61\%$ for Gentamicin respectively.

We conclude that the brewed cream base of hydroalcoholic extract of *Calceolaria engleriana* Kraenzl had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 at concentrations tested.

Keywords: Antibacterial activity, hydroalcoholic extract of *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, como en otros países en vías de desarrollo, las plantas medicinales representan aún la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional. La flora peruana ofrece grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con diferentes actividades¹. La industria farmacéutica y buena parte de la comunidad científica está considerando en nuestros días las plantas medicinales como fuentes potenciales de moléculas bioactivas con estructuras diferenciadas e innovadoras. Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna y aunque se conoce que su acción preventiva o curativa se debe a la presencia en sus órganos de sustancias químicas que provocan su efecto fisiológico. La detección de los principios activos es importante pues permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a la planta y a la vez detectar nuevas posibles aplicaciones², es por eso que, con esta investigación tratamos de aportar en algo el uso de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

La *Calceolaria engleriana* Kraenzl, es una planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae, comúnmente conocida como "wawiyay". Se sabe que la distribución de *Calceolaria* va del sur de la sierra Madre Occidental en México, hasta los Andes del sur, a mayoría de las especies están en alturas que oscilan entre 2 000 a 4 000 m.s.n.m. La infusión de hojas y flores frescas después de los alimentos son muy usadas en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de la tos, resfrió, como hipoglucemiante, diurético, antiulceroso, también se le describe por su uso para el retraso menstrual.

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de la crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Para lo cual se plantearon los objetivos específicos:

Determinar los parámetros físico químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

Determinar las características físico químicas de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

Determinar la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* de la crema elaborada a

base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población: Hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca Anexo Anchac - Huasi provincia de Vinchos de la región Ayacucho y el proceso de recolección y desecación se realizó según la OMS, 1991³.

Muestra: 5 Kg de hojas, flores y tallos desecados de *Calceolaria engleriana* Kraenzl, recolectadas durante el mes de junio a partir de los cuales se realizará el extracto hidroalcohólico, siguiendo las recomendaciones establecidas para estos casos.

Cepas bacterianas: las cepas utilizadas para determinar la actividad antibacteriana en la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donadas por el Instituto Nacional de Salud.

Obtención del extracto de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay"

Las hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", fueron reducidas de tamaño utilizando el molino de martillo con malla de 1 cm. Luego se pesó 500 g de muestra y se colocó en el percolador y se adicionó 1200 mL de etanol 70° como disolvente. Se maceró por 1 semana y posteriormente se percoló a razón de 20 gotas por minuto. El percolado se filtró y la operación se realizó por cinco veces.

Las fracciones recolectadas se concentraron en un baño maría a 40 °C, y se secó por atomización para obtener el polvo fino del extracto⁴.

Identificación de compuestos químicos

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "Wawillay", fueron realizadas según Oiga Loock² y Miranda Migdalia⁴.

Evaluación de los parámetros físicoquímicos del extracto

Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", se evaluaron los parámetros físicoquímicos que definen la calidad⁴.

Formulación de la crema

Se formularon cremas al 0,5; 1,0; 2,0% de extracto atomizado y la elaboración se realizó basada en el procedimiento descrito por Paniagua y col⁶.

Cuadro Nº 2. Parámetros de las características organolépticas y pH de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

Parámetros	Ensayos	Fórmulas	RESULTADOS
Características organolépticas	Color	Crema 0,5%	Beige claro
		Crema 1,0%	Beige
		Crema 2,0%	Beige oscuro
		Crema base	Blanco nieve
	Olor	Crema	Suigeneris a extracto
	Sabor	Crema	Amargo
	Aspecto	Crema	Homogéneo
pH	Cremas	Crema base	6,93
		Crema 0,5%	6,04
		Crema 1,0%	5,90
		Crema 2,0%	5,30

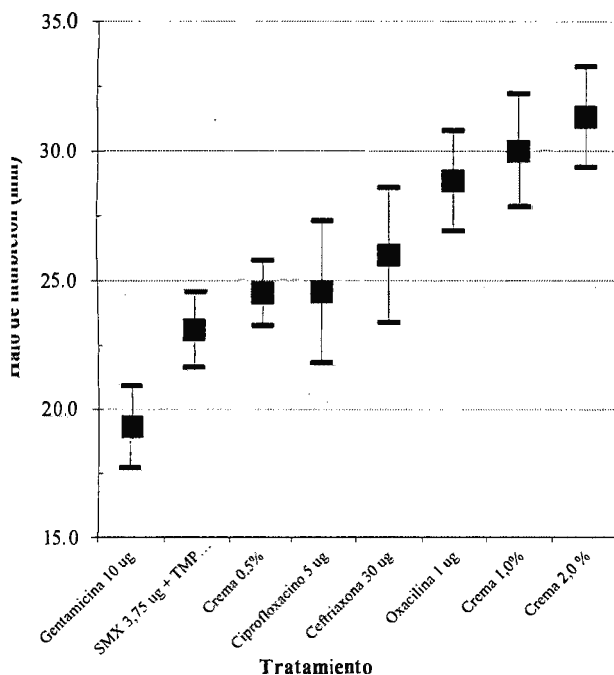
Cuadro Nº 3. Resultado de las comparaciones múltiples de Duncan de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

Tratamiento	N	Sub conjuntos homogéneos				
		1	2	3	4	5
Gentamicina 10 ug	5	19,3				
SMX 3,75 ug + TMP 21,25 ug	5		23,1			
Crema 0,5%	5		24,5	24,5		
Ciprofloxacino 5 ug	5		24,6	24,6		
Ceftriaxona 30 ug	5			25,9		
Oxacilina 1 ug	5				28,8	
Crema 1,0%	5				30,0	30,0
Crema 2,0 %	5					3,31
Sig.		1,000	0,19	0,19	0,26	0,22

DISCUSIÓN

En el Cuadro Nº 2 se muestran los resultados del pH de las cremas; la crema base tiene un pH de 6,93 ligeramente ácido, crema 0,5% un pH de 6.03 ácida, crema 1,0 % un pH de 5,90 ácida y crema 2,0 % un pH de 5.30 muy ácida. El ungüento hidrófilo denominado también crema de emulsión O/W aniónicas son inestables a un pH inferior a 5.00⁹, por tanto el pH de las cremas están dentro de las especificaciones que oscilan entre 5.00 a 7.50 tal como menciona en sus procedimientos el Laboratorios Farmacéuticos Markos (2004)⁵. Es necesario tener en cuenta el pH de la piel que oscila entre 4.85 para los hombres y 5.00 para las mujeres como menciona Orlandi (2004)¹⁰, cuando el pH de la superficie es más alcalino, se produce prurito y dermatitis de carácter inespecífico, las que se evitan con la formulación de cremas con pH cercano a la piel, por tanto la crema 2,0 % se asemejan al pH de la piel.

Para demostrar la actividad antibacteriana se trabajó con concentraciones de 0,5%, 1,0% y 2,0% de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de "wawillay", los mismos que se enfrentaron a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De los resultados podemos mencionar que la crema al 0,5% presenta una media de halo de inhibición de $24,53 \pm 0,45$ mm; la crema al 1,0% presenta una media de $30,02 \pm 0,79$ mm y la crema al 2,0% un valor de $31,31 \pm 0,70$ mm. Al realizar el análisis de varianza se obtuvo un valor de $3,08 \times 10^{-12}$, siendo altamente significativo e indicativo que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los halos de inhibición de los tratamientos. Al realizar las comparaciones múltiples de Duncan podemos observar que la crema al 1,0% y 2,0% presentan halos de



$p < 0,05$

Gráfico Nº 1. Variación de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por efecto de las cremas elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay".

inhibiciones estadísticamente similares y superiores a todos los demás tratamientos (Cuadro 3).

Romero y col. (2009)¹¹ 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 typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* y finalmente una levadura *Candida albicans*, donde se observa que la especie *Calceolaria engleriana* y *Calceolaria cuneiformis*, son las que tiene mayor actividad antimicrobiana, lo cual se corrobora con nuestros resultados.

Lock de Ugaz (1994)², refiere que los flavonoides poseen mayor actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas que con las gram negativas, por la presencia de hidroxilos, inhibiendo la síntesis de ADN.

Cowan (1999)¹², sostiene que la actividad antimicrobiana de los taninos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular de las bacterias, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. Los fenoles ácidos y ácidos fenólicos, en especial el ácido caféico es eficaz frente a bacterias, hongos y virus. La posición y el número de grupos hidroxilo del grupo fenol parece influir en el efecto antimicrobiano de tal forma que a mayor grado de hidroxilación mayor poder tóxico y mayor poder inhibitorio. El mecanismo responsable del efecto antimicrobiano de los fenoles parece estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados, posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacción con proteínas. Las quinonas, tiene capacidad para formar complejos irreversibles con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas establece su potencial como agentes antimicrobianos al conducir a la inactivación y pérdida de función de estas proteínas. Las flavonas, flavonoides y flavonoles, son producidas de manera natural por las plantas como respuesta a procesos infecciosos, por lo que no se extraña que se haya demostrado *in vitro* su eficacia antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos. Su actividad es debida probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y con la pared celular de la bacteria, de forma análoga a las quinonas. Los taninos presentan 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 publicados 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. Las cumarinas tienen propiedades

antimicrobianas por su capacidad estimuladora de macrófagos que incide de forma directa en el proceso infeccioso¹³.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cornejo, V. 1987. Las plantas medicinales y su correcta utilización. Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho-Perú.
2. Lock de Ugaz, O.1994. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Fondo Editorial Pontífice Universidad Católica del Perú. Lima-Perú.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS), 1991. Pautas para la evaluación de medicamentos herbaceos .Ginebra.
4. Miranda M y Cuéllar A. 2000. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. La Habana.
5. Laboratorios Farmacéuticos Markos. 2004. Procedimiento de Operación Estándar; Fabricación de Productos semisólidos No Estériles. Lima.
6. Paniagua, J. 2008. Formulación y evaluación de la actividad antiinflamatoria de una crema y gel elaborados a base del extracto atomizado de la corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. "uña de gato". Ayacucho – 2008.
7. DIGEMID. 1999. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas - Ministerio de Salud. Resolución Ministerial N° 055-99.SA/DM Lima.
8. Cáceres, A.1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. editorial Universitaria.
9. Orlandi M. 2004. Piel Sana y Manto ácido. Folia Dermatológica del Perú 15(2): 121– 124. Lima.
10. Romero M, César M, Enrique A.2009. Aspectos Botánicos, Fitoquímico, Antibacteriano y producción del Genero *Calceolaria* en la provincia de Huamanga-Ayacucho.
11. Cowan, M. (1999). Plant Planducts as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology.Rev.12 (4): 564 – 582.
12. Cantón R , 2012. Plantas medicinales con actividad antiinfecciosa y antiparasitaria. Servicio de Microbiología. Facultad de Farmacia – Universidad Complutense de Madrid.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Pamela Cristina, ROMANI TORRE

R.D. N° 409-2012-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las tres de la tarde del día jueves ocho de noviembre del año dos mil doce; reunidos en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, los miembros del jurado calificador del acto público de sustentación de tesis, bajo la Presidencia del Doctor Dr. Tomas Castro Carranza con la asistencia de los miembros Mg. Víctor Luis Cárdenas López, Q.F. Hugo Roberto Luna Molero, quien además actuará como secretario encargado, Mg. Marco Rolando Aronès Jara, para recepcionar la tesis titulada: **“Actividad antibacteriana de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de Calceolaria engleriana kraenzl “wawillay” - Ayacucho 2012**, presentado por la bachiller en Farmacia y Bioquímica **Pamela Cristina, ROMANI TORRE**, con el cual pretende optar el título profesional de Químico-Farmacéutica.

El señor presidente inicia el acto de sustentación verificando el expediente, e invitando al secretario a dar lectura de la documentación y la Resolución Decanal N° 409-2012 – FCB-D, luego instruye a la sustentante a dar inicio a la sustentación, teniendo para ello un tiempo de 45 minutos. La sustentante realiza la exposición de su trabajo de tesis, haciendo uso del equipo multimedia.

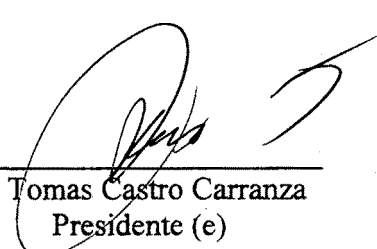
Terminando este proceso, el presidente del jurado de la sustentación de tesis invita a los miembros del jurado calificador a realizar las observaciones, aclaraciones y preguntas correspondientes que crean conveniente para la evaluación de la sustentante.

Luego el presidente solicita a la sustentante y al público en general a abandonar el auditorio para que el jurado calificador pueda deliberar y emitir la calificación como sigue:

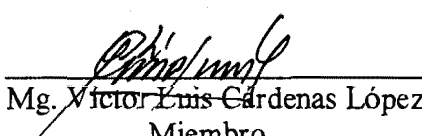
MIEMBROS DEL JURADO	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Víctor Luis Cárdenas López	16	16	16
Q.F. Hugo Roberto Luna Molero	17	17	17
Mg. Marco Rolando Aronés Jara	17	17	17
	PROMEDIO		17

La sustentación obtiene la nota promedio de DIECISIETE (17) de la cual dan fe los del jurado calificador estampando su firma al pie de la presente.

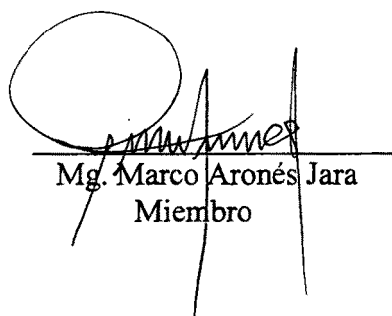
Culmina el acto de sustentación siendo las cinco pm.



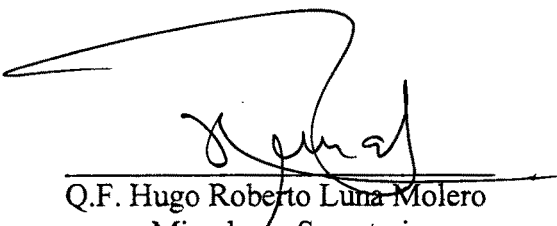
Dr. Tomas Castro Carranza
Presidente (e)



Mg. Víctor Luis Cárdenas López
Miembro



Mg. Marco Aronés Jara
Miembro



Q.F. Hugo Roberto Luna Molero
Miembro - Secretario