

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



“Determinación del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Calendula officinalis* L. (Caléndula) en animales de experimentación”.

Trabajo de tesis presentado por:

MOGROVEJO VALDIVIA, Alejandra Corina

**Para optar al Título Profesional de Químico-
Farmacéutico**

Asesor:

Ph. D. José Villanueva Salas

AREQUIPA – PERU

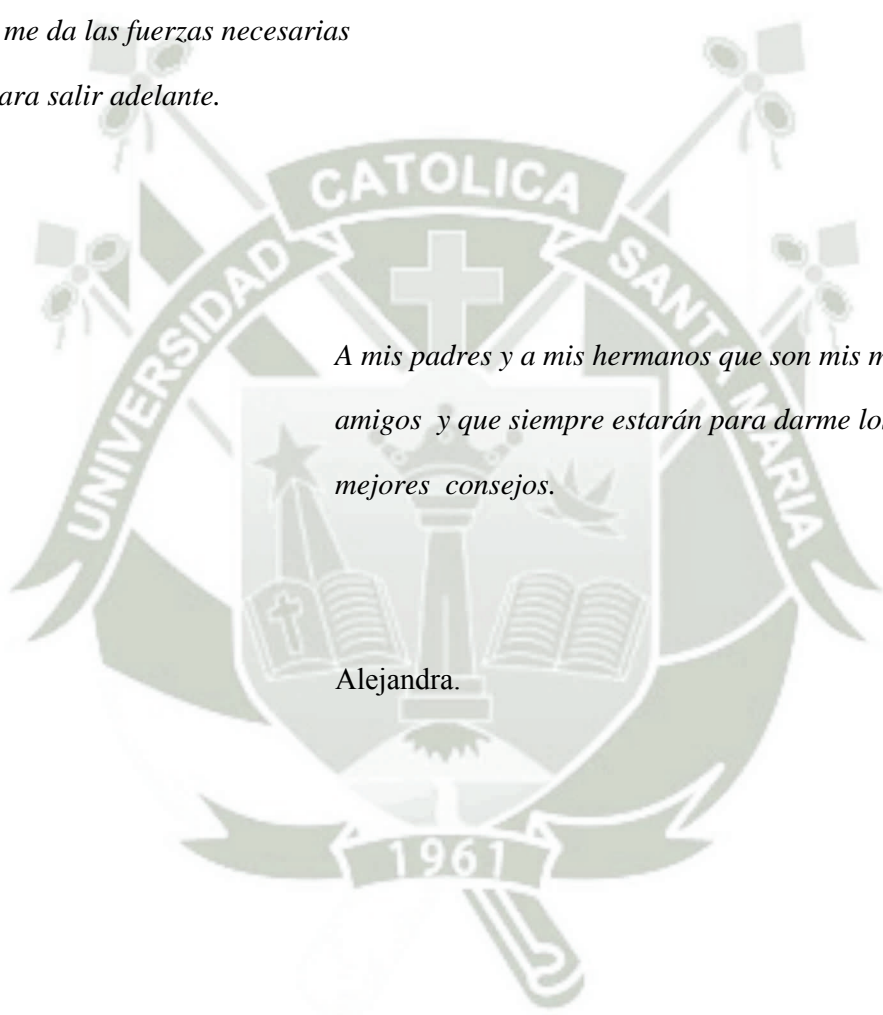
2014

DEDICADO A:

A Dios que siempre guía mis pasos

Y me da las fuerzas necesarias

Para salir adelante.



*A mis padres y a mis hermanos que son mis mejores
amigos y que siempre estarán para darme los
mejores consejos.*

Alejandra.

INDICE

INDICE	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCION	8
OBJETIVOS	10
HIPOTESIS	11
CAPITULO I	12
MARCO TEORICO.....	12
1. <i>Calendula officinalis L.</i>	12
1.1. INTRODUCCION.....	12
1.2. CLASIFICACION TAXONOMICA.....	12
1.3. DESCRIPCION BOTANICA	13
1.4. ASPECTOS QUIMICOS.....	14
1.5. ASPECTOS FARMACOLOGICOS	14
2. FLAVONOIDES.....	15
2.1. CONCEPTO	15
2.2. DISTRIBUCION Y LOCALIZACION	16
2.3. ESTRUCTURA QUIMICA.....	16
2.4. BIOSINTESIS	17
2.5. CLASIFICACION	17
2.6. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	19
2.7. PROPIEDADES BIOLOGICAS	19
3. QUERCETINA	20
3.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	20
3.2. BIOSINTESIS	20
3.3. PROPIEDADES BIOLOGICAS	22
4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).....	22

4.1. CONCEPTO	22
4.2. BASES DE LA SEPARACION CROMATOGRAFICA.....	23
4.3. PARTES	24
4.4. CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA	28
5. GELES	29
5.1. EXCIPIENTES DE LOS GELES.....	30
5.2. SUSTANCIAS ORGANICAS	30
5.3. PREPARACION DE LOS GELES	32
6. ESTRUCTURA DE LA PIEL Y CICATRIZACION	33
6.1. LA PIEL.....	33
6.2. CICATRIZACION	37
CAPITULO II	44
MATERIALES Y METODOS	44
1. LUGAR DE LA INVESTIGACION	44
2. TIPO DE INVESTIGACION	44
3. MATERIALES	44
3.1. UNIDADES DE ESTUDIO	44
4. MATERIAL DE LABORATORIO.....	45
4.1. MATERIAL DE VIDRIO	45
4.2. EQUIPOS	46
4.3. REACTIVOS.....	46
4.4. OTROS	47
5. METODOS	47
5.1. TRATAMIENTO DE LA DROGA Y OBTENCION DEL EXTRACTO....	47
5.2. OBTENCION DEL EXTRACTO	48
5.3. METODO ANALITICO.....	50
5.4. PREPARACION DE GELES.....	61
5.5. METODO PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO CICATRIZANTE	63
CAPITULO III.....	68
RESULTADOS Y DISCUSION	68
1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCION DEL EXTRACTO	68

2. VALIDACION DE METODO ANALITICO POR CROMOTOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	70
2.1. LINEALIDAD	72
2.2. LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION	73
2.3. PRECISION	75
2.4. EXACTITUD	77
2.5. CUANTIFICACION DE QUERCETINA EN EXTRACTO GLICOLICO DE <i>Calendula officinalis L.</i> (CALENDULA) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.	79
3. ELABORACION DEL GEL	81
4. DETERMINACION DEL EFECTO CICATRIZANTE	82
4.1. REALIZACION DE HERIDAS INCISAS Y APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS	82
4.2. PRUEBA TENSIOMETRICA	84
4.3. ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA)	95
4.4. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY (HSD)	97
CAPITULO IV	100
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	100
CONCLUSIONES	100
SUGERENCIAS	102
BIBLIOGRAFIA	103
ANEXOS	110



RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) en heridas producidas en animales de experimentación.

Con tal fin, se procedió a la recolección de la planta medicinal en el departamento de Ayacucho, luego los pétalos fueron extraídos del cáliz, y cortados en pequeños trozos, se siguió con la elaboración del extracto mediante el método de percolación, obteniéndose un extracto glicólico al 20% límpido, aromático y de color anaranjado característico. Este extracto fue estandarizado mediante el análisis cuantitativo del flavonoide quercetina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando como fase móvil metanol: agua (50:50), una longitud de onda de 254 nm con un flujo de 1.0 mL.min⁻¹, evaluándose los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y de cuantificación, obteniéndose que; para la linealidad del método, usando un estándar con pureza $\geq 99\%$ en un rango de concentraciones de 0.15 a 1.50 mg.L⁻¹, el coeficiente de correlación fue de 0.997, para la precisión se determinó por repetibilidad y la precisión intermedia en la que el resultado de los coeficientes de variación porcentual no excedía del 8 y el 16%

respectivamente (según AOAC), la exactitud se evaluó a través del porcentaje de recuperación obteniendo un valor de 92.37%, los límites de detección y cuantificación fueron de 0.054 y 0.063 mg.L⁻¹ respectivamente, al analizar la concentración de quercetina en el extracto se halló un valor de 6.300 mg.kg⁻¹.

El extracto estandarizado fue empleado en la elaboración de geles al 5 y 10%, que fue utilizado para evaluar el efecto cicatrizante en 16 ratas de la especie *Rattusnorvegicus*, para lo cual se realizaron 2 heridas incisas por rata que involucraron dermis y epidermis, de 1 cm de largo cada una, haciendo un total de 32 heridas, aplicándose a 8 heridas el gel preparado al 5%, a otras 8 el gel preparado al 10%, a otras 8 el preparado comercial Cicatricure® y otras 8 para labase del gel. Al final del periodo de tratamiento que fue de 5 días con una dosificación de 2 veces al día se determinó el efecto cicatrizante mediante el método tensiométrico.

Se obtuvo los promedios de los pesos en gramos necesarios para abrir las heridas producidas en los animales de experimentación y fueron 188.86 ± 17.27g para el grupo tratado con el gel base; 255.95 ± 14.39 g para el grupo tratado con el gel de *Calendula officinalis L.* al 5%; 294.81 ± 16.38 para el grupo que recibió tratamiento con el gel de *Calendula officinalis L.* al 10%; y para el grupo tratado con el preparado comercial Cicatricure® el promedio fue de 294.65 ± 18.72 g; lo que demuestra que el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% y el preparado comercial Cicatricure® muestran la misma eficacia en el proceso de cicatrización.

Del análisis estadístico se demuestra que no existen diferencias significativas entre el grupo tratado con el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% y el preparado comercial Cicatricure®, pero estos sí difieren del grupo tratado con el gel base y el grupo tratado con el gel de *Calendula officinalis L.* al 5% ya que estos dos sí muestran diferencias significativas al 0.05. Por lo que se concluyó que el gel al 10% de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) puede emplearse en el tratamiento de heridas superficiales logrando una cicatrización eficaz similar al de los tratamientos en los que se emplean productos reconocidos en el mercado tales como el Cicatricure®.



ABSTRACT

The present research had as its main goal to evaluate the healing effect of a standardized *Calendula officinalis* gel L. (*Calendula*) in procured wounds on animals for experimentation.

To this purpose, we proceeded to collect the herb in the department of Ayacucho, after the petals were removed from the sepal, and cut into small pieces, followed by the preparation of the extract by the continuous extraction method, percolation, obtaining a 20% limpid extract, aromatic and with characteristic orange color. This extract was standardized by the flavonoid quercetin quantitative analysis by high performance liquid chromatography (HPLC), using as mobile phase methanol: water (50:50), wavelength of 254 nm with a flow of 1.0 mL.min⁻¹ evaluating the linearity parameters, precision, accuracy and limits of detection and quantification, obtaining; to the linearity of the method, using a standard purity $\geq 99\%$ in a concentration range of 0.15 to 1.50 mg.L⁻¹, the correlation coefficient was 0.997, the accuracy was determined by repeatability and the intermediate accuracy in which the result of the coefficients of variation did not exceed percentage from 8% to 16% respectively (according to AOAC), the accuracy was evaluated by the recovery percentage

obtaining a value of 92.37%, the detection and quantification limits were 0.054 0.063 mg.L-1 respectively, by analyzing the concentration of quercetin in the extract a value of 6.300 mg.kg-1 was found.

The standardized extract was used in the preparation of gels of 5% to 10%, which was used to evaluate the healing effect in 16 rats of the *Rattusnorvegicus* species, for which two incised wounds per rat were performed involving dermis and epidermis, 1 cm long each, making a total of 32 wounds; the gel prepared at 5% was applied to 8 wounds, the gel prepared at 10% to other 8 wounds, the commercial preparation Cicatricure® to other 8 wounds and finally the base of gel applied to other 8 wounds. At the end of the treatment that was a period of 5 days at a dosage of 2 times a day, the healing effect was determined by the tensiometric method.

It was obtained the averages of the weights in grams required to open the wounds in animals for experimentation and were 188.86 ± 17.27 g for the group treated with the base of the gel; 255.95 ± 14.39 g for the group treated with *Calendula officinalis* L. gel at 5%; 294.81 ± 16.38 for the group treated with *Calendula officinalis* L. gel at 10%; and for the group treated with the commercial preparation Cicatricure® the average was 294.65 ± 18.72 g; This shows that the gel of *Calendula officinalis* L. at 10% and the commercial preparation Cicatricure® deliver the same efficacy in the healing process.

The statistical analysis showed no significant differences between the group treated with the *Calendula officinalis* L. at 10% gel and the group of the commercial preparation Cicatricure®, but they do differ from the group treated with the base of the gel and the group treated with the gel *Calendula officinalis* L. at 5% since these two show significant differences of 0.05. So it was concluded that the *Calendula officinalis* L. at 10% (calendula) can be used in the treatment of superficial wounds achieving successful healing similar to the treatments that use well known commercial products such as the Cicatricure®.

INTRODUCCION:

La medicina tradicional es la suma de conocimientos teóricos y prácticos que se basan en la experiencia y observación que se difunden de generación en generación hasta la actualidad. Es muy importante ya que es la herencia ancestral de nuestros pueblos amazónicos que utiliza un sinnúmero de especies vegetales para la cura de muchas enfermedades.

En el Perú, nuestra flora amazónica constituye una de las mayores reservas de la fitoterapia, hoy en día numerosas especies han sido estudiadas, obteniéndose de ellas importantes compuestos biológicamente activos que han contribuido a aliviar las dolencias de la humanidad, de ahí mi gran interés de analizar y estudiar estos recursos tan importantes que nos da la naturaleza.

La Caléndula, planta anual de origen mediterráneo, tiene como nombre científico *Calendula officinalis* L.; sus flores tienen diversas propiedades farmacológicas, una de mi interés es la propiedad cicatrizante; es importante mencionar que las flores de Caléndula cumplen con los requisitos establecidos por las farmacopeas internacionales para su uso como planta medicinal.

En el presente trabajo de investigación se desea corroborar la acción cicatrizante de esta especie vegetal además de formular un preparado farmacéutico que brinde dicha propiedad atribuida a la planta y que ésta sea empelada como alternativa de productos naturales con fines cicatrizantes y también contribuir más en los conocimientos de nuestra flora que por investigaciones anteriores es una planta rica en principios activos.





OBJETIVOS:

1. Preparar un extracto glicólico de los pétalos de *Calendula officinalis L.* (Caléndula).
2. Elaborar un preparado farmacéutico (gel) a base del extracto glicólico de *Calendula officinalis L.*(Caléndula).
3. Estandarizar el extracto glicólico en función con su contenido de quercetina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
4. Determinar el efecto cicatrizante del gel elaborado a base del extracto glicólico de *Calendula officinalis L.*(Caléndula) por el método tensiométrico en animales de experimentación.
5. Comparar el efecto cicatrizante del gel de *Calendula officinalis L.*(Caléndula) con una especialidad farmacéutica en animales de experimentación.



HIPOTESIS:

Dado que la medicina tradicional le atribuye a la *Calendula officinalis* L. “Caléndula” efectos beneficiosos sobre el tratamiento de heridas superficiales, es probable que un preparado farmacéutico a base de extracto glicólico de dicha planta posea efecto cicatrizante en animales de experimentación.



CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. *Calendula officinalis L.*

1.1.INTRODUCCION.

Calendula officinalis L. es una planta anual de origen mediterráneo que se cultiva en todo el mundo, es de clima templado y resiste a las sequías; sus flores son utilizadas en el punto de vista ornamental como también para la preparación de productos farmacéuticos y productos cosméticos. ⁽¹⁾

1.2.CLASIFICACIÓN TAXONOMICA.

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Engler&Prantl modificado por Melchor en 1964, Hamilton Beltrán S.; Severo Baldeón M. y Elida Carrillo F., biólogos del

Herbario San Marcos de la Universidad Mayor de San Marcos, determinan para la *Calendula officinalis* L. (Caléndula) la siguiente clasificación:⁽²⁾

Reino	Vegetal
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Género	Caléndula
Nombre	<i>Calendula officinalis</i>

1.3.DESCRIPCION BOTANICA.

La Caléndula (Figura N° 1) es una planta de 30 a 60 cm de altura; tallo erguido ramificado, pubescente.



FIGURA N° 1: *Calendula officinalis* L. (Caléndula)

De hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas, los radios planos son de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, las flores de 3cm a 6 cm de diámetro sus colores oscilan entre el amarillo y el anaranjado intenso, florecen todo el año.⁽¹⁾

1.4.ASPECTOS QUIMICOS.

Las flores de Caléndula presentan un amplio espectro de compuestos químicos, los más investigados por su interés farmacológico son los flavonoides y los carotenoides, Ociosziynska Y. en su estudio de la química de *Calendula officinalis L.* por inflorescencia plantea respecto a los carotenoides un contenido entre 0.017 y 0.078% tales como alfa, beta y gamma caroteno, violaxantina, rubixantinacitroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteolina, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, y luteinlipóxido.

En el caso de los flavonoides, se plantea un contenido entre 0.33 y 0.88% tales como quercetina, isoquercetina, quercetina glucósido, isorhamnetina, rutinósido, kaemferol, calendoflosido, calendoflavósido, calendoflavobiosido, narcisina, etc.

Otros compuestos de interés en las flores de *Calendula officinalis L.* son los triterpenos como el ursadiol, el loliolido, el calendulosido F, también destacan los aceites esenciales el cual se plantea un rendimiento de 0.02% y se determinó la presencia de pedunculatina, carvona, cariofileno, geranil acetona, torryol. Las saponinas que presentan como aglicón al ácido oleanólico, los ácidos fenólicos como el vainillico, cafeico, ferulico, clorgénico, y taninos como catecol y pirogalol también fueron reportados.⁽¹⁾

1.5.ASPECTOS FARMACOLOGICOS.

Los extractos de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) presentan propiedades farmacológicas de interés para la industria farmacéutica.

- **Cicatrizante:** utilizada para el tratamiento de heridas, quemaduras de primer grado, contusiones, erupciones en la piel, es una de las propiedades más utilizadas de la Caléndula, debido a su contenido en flavonoides, triterpenos y carotenoides. ⁽³⁾
- **Antiinflamatoria:** se debe a los triterpenos. DellaLoggia *et al.* (1994) utilizaron un modelo experimental, la inflamación de oreja de ratón inducido por crotón. ⁽³⁾
- **Antibacteriana:** Dumenil plantea que los extractos etanólicos al 80% mostraron una actividad antibacteriana sobre todo contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. ⁽¹⁾
- **Hipolipemiante:** Wojeicki demostró que la aplicación diaria de saponósidos obtenidos de las flores de *Calendula officinalis L.* normalizaron los niveles de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, lípidos totales en la sangre. ⁽¹⁾
- **Antioxidante:** Los extractos metanólico y de propilenglicol de las flores de *Calendula officinalis L.* demostraron efecto antioxidante por Fe₂ liposomal inducido por peroxidación de ácido ascórbico. ⁽⁴⁾

Entre otras propiedades, la Caléndula es diurética, espasmolítica, antipirética, hepatoprotectora, regula la menstruación atenuando además los dolores que involucra, es anti-VIH, y anticancerígena, estas dos últimas propiedades actualmente están en investigación.

2. FLAVONOIDES.

2.1. CONCEPTO.

Son compuestos polifenólicos pertenecientes al grupo de los metabolitos secundarios caracterizados por una estructura benzo – γ – pirano los cuales están distribuidos en el reino vegetal en forma de glucósidos (ligados a carbohidratos). ^(5,6)

Son copigmentos hidrosolubles que contribuyen a la coloración de flores y frutos,⁽⁷⁾ son importantes para el buen funcionamiento y desarrollo de las plantas, ya que son agentes protectores contra la luz UV, y contra infecciones causadas por microorganismos fitopatógenos.⁽⁵⁾

2.2.DISTRIBUCION Y LOCALIZACION:

Están distribuidos en gimnospermas y angiospermas, en las partes aéreas: hojas, flores y frutos.⁽⁸⁾ La composición varía de acuerdo al órgano de la planta, la familia Asteraceae contiene gran cantidad de flavonoides.^(6,7)

2.3.ESTRUCTURA QUIMICA:

Son estructuras del tipo $C_6 - C_3 - C_6$ con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno tal como se muestra en la Figura N° 2.

Su estructura deriva de la γ -cromona (benzo - γ - pirano) con un fenilo en posición 2 siendo 2-fenil- γ -cromona. Todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4; las variaciones se producen en las posiciones 1; 2; 3 de la unidad C_3 del anillo B, en el anillo aromático son estructuras hidroxiladas y por lo tanto son polifenólicos. Pueden encontrarse como agliconas libres o en forma de O-heterósidos, C-heterósidos unidos generalmente a una glucosa.⁽⁷⁾

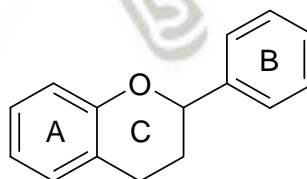


FIGURA N° 2: Estructura general de un flavonoide.

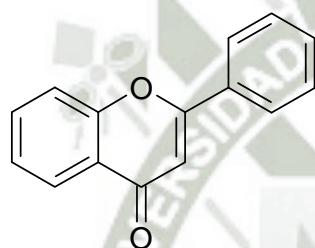
2.4.BIOSINTESIS.

Los flavonoides proceden del metabolismo secundario a través de la ruta del ácido shikimico y la ruta de los policétidos.

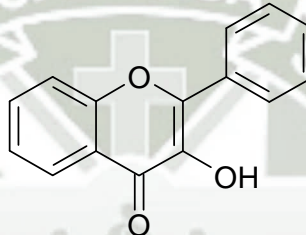
Anillo A: ruta de los policétidos (Ruta del MalonilCoA).

Anillo B y unidad C₃: ruta del ácido shikimico. ^(6,8)

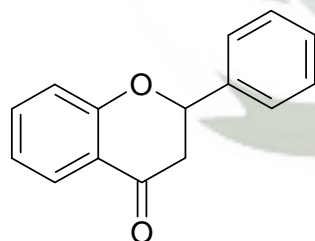
2.5.CLASIFICACIÓN.



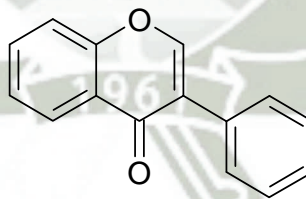
FLAVONA



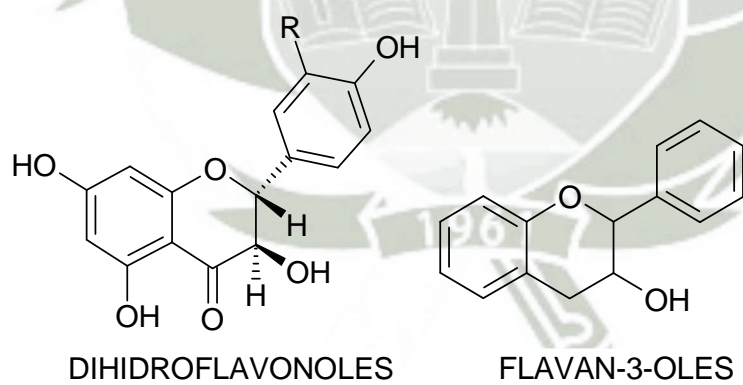
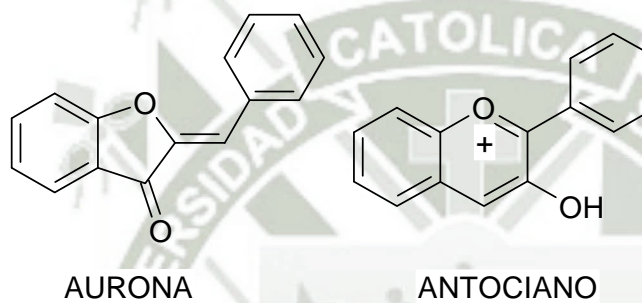
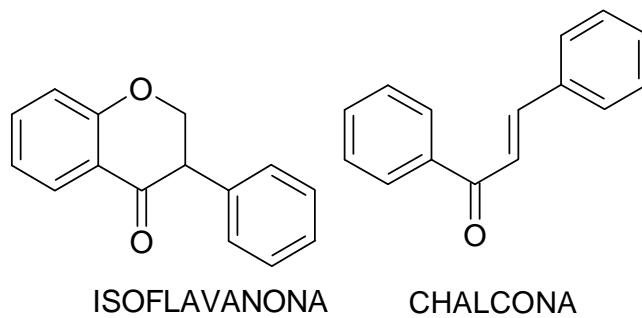
FLAVONOL



FLAVANONA



ISOFLAVONA



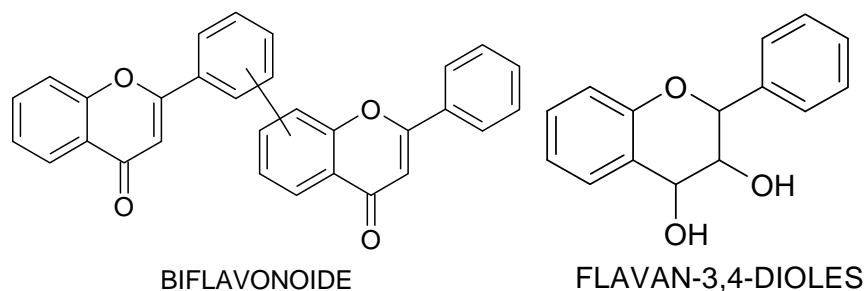


FIGURA N° 3: Clasificación de los flavonoides.

2.6. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

Las flavonas, flavonoles, y auronas, debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que van desde el amarillo muy fuerte hasta el rojo, las flavanonas y flavononoles, por su carbono quiral C-2 presentan rotación óptica.

Los glicósidos son sólidos amorfos solubles en agua y alcohol mientras que las agliconas son sólidos cristalinos altamente hidroxiladas y solubles en solventes orgánicos polares como etanol, metanol y en solventes orgánicos no polares tales como éter etílico y cloroformo. ^(6,8)

Debido a sus funciones fenol son ionizables en medio ácido, lo cual permite su identificación por tener reacciones coloreadas; forman complejos con Fe^{+3} ($FeCl_3$) y Al^{+3} ($AlCl_3$). ⁽⁸⁾

2.7. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

La mayoría de flavonoides son degradados a nivel de intestino en condiciones altamente alcalinas, rompiéndose el anillo C, por eso no son tóxicos para el hombre y los mamíferos. ⁽⁸⁾

Los flavonoides son capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentar su resistencia, por eso son recomendados en caso de patologías circulatorias menores y fragilidad capilar. (7).

Los flavonoides son inhibidores enzimáticos, antiinflamatorios, antibacterianos, antioxidantes, antiaritmicos, antihemorrágicos, antiespasmódicos y diuréticos. (7,8).

3. QUERCETINA.

La Quercetina es un flavonoide que fue identificado inicialmente en una planta de especie *Quercus*, pertenece al grupo de los flavonoles y está presente en diversas especies vegetales; según la IUPAC su nombre es el 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavonol.

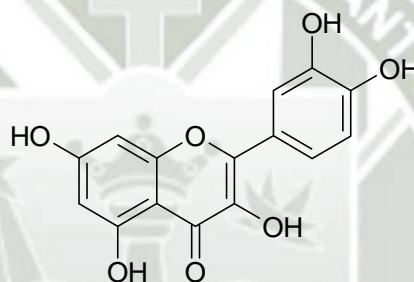


FIGURA N° 4: Estructura de la Quercetina

3.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

La fórmula molecular de la quercetina es $C_{15}H_{10}O_7$ por lo que su peso molecular será $302.23 \text{ g.mol}^{-1}$, se encuentra como un polvo cristalino de color amarillo verdoso debido a la presencia de enlaces conjugados en su molécula, es inodoro, y en cuanto a su solubilidad es altamente soluble en propilenglicol, metanol y etanol pero insoluble en éter y agua. (9)

3.2. BIOSINTESIS.

La biosíntesis de los flavonoles se da bajo la vía del fenilpropanoide. La enzima fenilalanina amonioliase (PAL) cataliza la conversión de la L-fenilalanina a ácido

trans-cinámico. La enzima 4 cinamato-hidroxilasa (CH4) cataliza la síntesis del ácido p-cumárico.

El ácido p-cumárico se convierte a p-cumaril CoA por medio de la 4-cumarato CoA ligasa (4CL). El p-cumaril CoA se activa al reaccionar con 3 moléculas de malonil CoA.

Ahora, el punto de partida se da a través de la condensación de una molécula de p-cumaril-CoA y 3 moléculas de malonil-CoA, como resultado se obtiene la naringinachalcona. Esta reacción se lleva a cabo por la chalconasintasa (CHS). La naringinachalcona después es isomerada a una flavonona, la naringinina, por la enzima chalconaisomerasa (CHI). A continuación, la enzima flavanona 3-dioxigenasa convierte la naringinina a dihidroquercetina.

Al mismo tiempo, una reacción de 2-oxoglutarato y O₂ se da para producir succinato y CO₂, ya de este compuesto, dihidroquercetina, se sintetizan los flavonoles bajo la reacción de la enzima flavonol sintasa (FLS) ⁽¹⁰⁾, así como se muestra en la Figura 5.

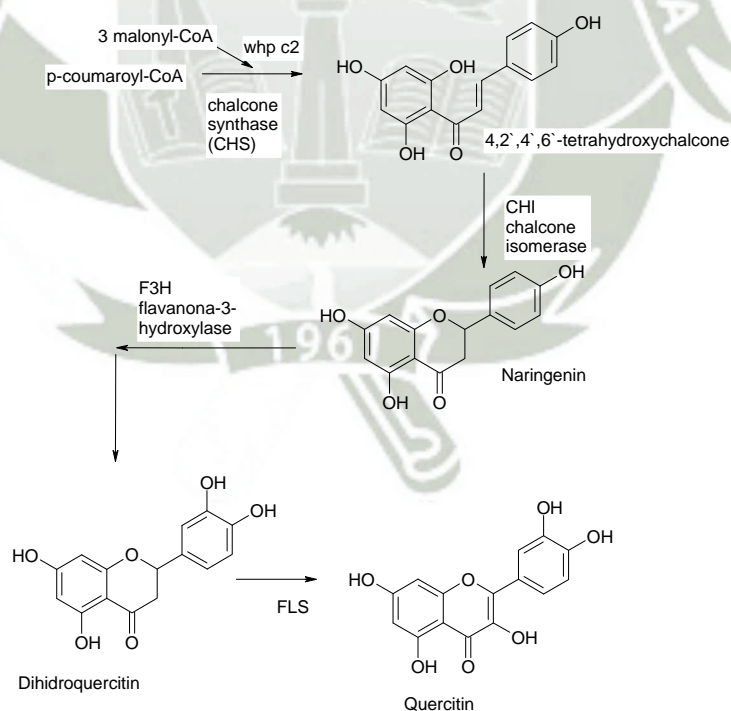


FIGURA N° 5: Biosíntesis de la quercetina.

3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

Estudios han demostrado que la quercetina es muy ventajosa para el ser humano ya que tiene propiedades antioxidantes, antidiabéticas, antitumorales, cicatrizantes, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antivirales, anticancerígenas además que inhibe la oxidación y citotoxicidad de las LDL in vitro pudiendo reducir el riesgo para la enfermedad cardíaca coronaria ⁽¹¹⁾ y probablemente mejoran el desempeño mental y físico, ⁽¹²⁾ de ahí la importancia de contar con métodos para la determinación de este importante flavonoide.

4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

4.1. CONCEPTO.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica de separación y de cuantificación, en el cual los componentes de una muestra se distribuyen en dos fases, la fase estacionaria que es sólida, y la fase móvil que es líquida.

La fase estacionaria:

Está depositada en la columna. Generalmente está compuesta por un sólido poroso, de tamaño de partícula muy pequeño, éste sólido está constituido por una película delgada de un líquido. La columna es el lugar donde se produce la separación y puede considerarse como el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se centra todo, equipos de mayor o menor complejidad.

La fase móvil:

Es un solvente o la mezcla de solventes que tiene un alto grado de pureza, la fase móvil pasa a través de la columna a una velocidad constante transportando la muestra hacia la fase estacionaria.

4.2. BASES DE LA SEPARACION CROMATOGRÁFICA.

Un cromatógrafo líquido está compuesto por (Figura N° 6):

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil
- El inyector: un sistema que permite la introducción de la muestra.
- La bomba: un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna.
- El detector: un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna.
- Un sistema de registros de datos que proviene del detector, la señal del detector puede ser utilizada por un registrador gráfico o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada en una computadora. Como resultado se obtiene dos productos:
 - El cromatograma: es un gráfico que relaciona la concentración del soluto en función del tiempo.
 - El eluato: el fluido que proviene de la columna, que contiene la fase móvil y los componentes de la muestra separados. ⁽¹³⁾

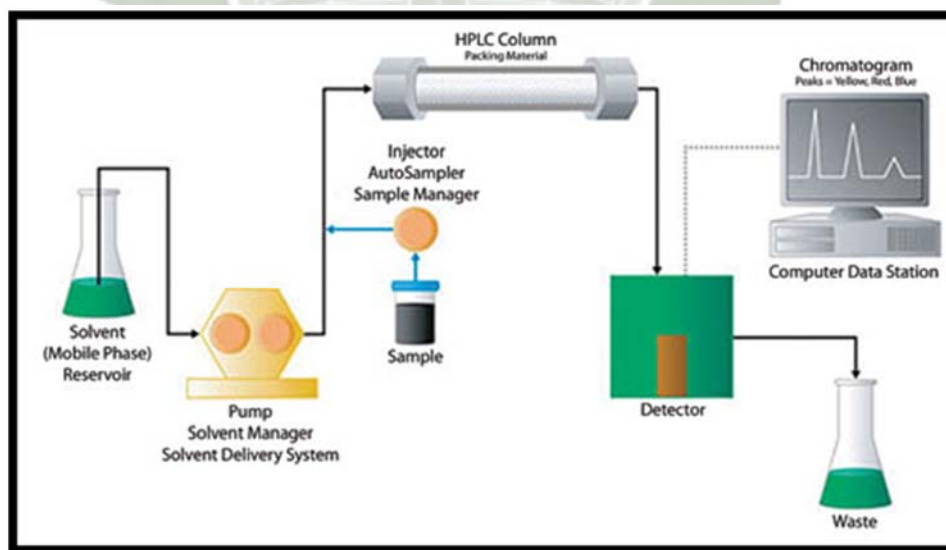


FIGURA N° 6: Sistema de cromatografía de alta resolución. ⁽¹⁴⁾

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, las interacciones hidrofóbicas, dipolares, electrostáticas y puentes de hidrogeno, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en salir de la columna (eluir) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y sale antes de la columna.

4.3.PARTES.⁽¹³⁾

4.3.1. RESERVORIO DE LA FASE MÓVIL.

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil, se ubica generalmente a algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenar las conexiones.

Como reservorio de fase móvil, puede utilizarse un frasco de buena calidad (vidrio o polímero resistente) con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas al sistema y puedan contaminarlo. Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

4.3.2. TUBERIAS.

La fase móvil que se emplea para el HPLC debe circular por tuberías que conectan el reservorio del solvente con la bomba, la bomba con el inyector, el inyector con uno o más detectores conectados en serie y con un colector de válvulas de distribución. Las tuberías deben de ser inertes y resistentes a altas presiones.

4.3.3. UNIONES.

Una unión consiste en dos piezas que se acoplan perfectamente, las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico.

Las uniones deben de reunir determinadas características:

- Deben de ser inertes a fases móviles y muestras.
- Deben de cerrarse herméticamente.
- No deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.

4.3.4. BOMBA.

Las bombas en el HPLC impulsan la fase móvil que proviene del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna, su caudal de trabajo es variable según la escala de trabajo escogida. Existen dos tipos de bomba: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa).

Las bombas están elaboradas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico, el material adecuado es acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón, el acero inoxidable se utiliza como “cuerpo” de toda la bomba, para la elaboración de tuberías, conectores, y cabezales de los pistones, cuando el acero inoxidable es incompatible con el tipo de (generalmente las de origen biológico se desea conservar la actividad biológica) debe de ser reemplazado por titanio.

Habitualmente los pistones están elaborados de zafiro y las válvulas de retención por una pequeña esfera de rubí que se apoya en un asiento de zafiro y una malla o retentor de acero inoxidable.

Características de las bombas:

- **Caudal:** Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10.0 mL.min⁻¹ y trabajan con presiones de hasta 6000 psi.
- **Exactitud en el caudal:** se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado, se determina midiendo el volumen de

líquido entregado en un intervalo de tiempo preestablecido la importancia de esta característica reside en la importancia que pueda darse a la exactitud en la determinación de los tiempos de retención de las sustancias a cuantificar.

- **Ruido:** se refiere a las pulsaciones (variaciones) que presentan las bombas del tipo recíprocante y que conducen a variaciones en el caudal del solvente entregado en intervalos cortos de tiempo; deficiencias en el sistema de bombeo como válvulas tapadas, burbujas de aire ocluidas en los cabezales o sellos en mal estado intensifican el valor del ruido. Este parámetro es de importancia crucial para asegurar resultados cuantitativamente válidos debido a que las áreas de los picos de HPLC varían cuando el caudal del solvente cambia.
- **Deriva:** es un cambio continuo en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos, la deriva en el caudal conlleva a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en periodo de tiempos muy largos. Para disminuir el efecto de la deriva se efectúa una nueva calibración del instrumento con estándares apropiados luego de la inyección de cada serie de 5 ó 10 muestras.
- **Sistema de corte:** es conveniente que la bomba posea sistema de corte de caudal cuando se superen valores límites de presión tanto superior como inferior para evitar excesos en la presión del sistema cromatográfico y así no dañar componentes como columnas y detectores además que permite detectar las posibles pérdidas de solvente o la incorporación de burbujas de aire al agotarse la fase móvil.

4.3.5. INYECTORES.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal del solvente a través del sistema. ⁽¹³⁾ Actualmente los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna por medio de un

loppor el cual se introduce la solución a inyectar. Un inyector debe de reunir las siguientes características:

- Debe de ser fácil de operar.
- Debe de ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe de ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida al sistema.
- No puede provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

4.3.6. DETECTORES.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna. Los detectores deben de reunir ciertas características tales como:

- **Tener un amplio rango de respuesta:** un cambio de la concentración produce un cambio en la señal.
- **Poseer una respuesta lineal:** el detector debe medir propiedades del analito que se incrementen linealmente al aumentar su concentración.
- **No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar:** se refiere a la pérdida de eficiencia
- **Responder a todos los solutos.**
- **Tener sensibilidad apropiada**
- **No afectarse a los cambios de temperatura:** los cambios de temperatura no deben de modificar la señal emitida por los detectores.

- **Poseer una buena relación señal/ruido:** Estas perturbaciones que se producen en la línea base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica, o a fluctuaciones en el caudal.
- **No destruir la muestra:** esta propiedad es característica de casi todos los detectores de HPLC, a excepción del detector electroquímico.
- **Tener una constante de tiempo baja:** la constante de tiempo de un detector indica la velocidad con que éste responde a un cambio instantáneo a la concentración del analito.

DETECTORES UV/VISIBLE.

Es el detector más empleado en HPLC, posee buena sensibilidad y rango lineal además que permite detectar analitos en el orden de nanogramos, no es destructivo y pueden emplearse con sistemas de gradiente con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo.

Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura, opera en el rango 190 nm - 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 nm – 700 nm) recibiendo así el nombre de UV/VISIBLE. ⁽¹³⁾

4.4.CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA.

Es un tipo de cromatografía líquida, su nombre se debe a la inversión de las polaridades de las fases; donde la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar, este cambio de la polaridad resulta en un cambio en el orden de elución de los componentes de la muestra a estudiar.

La difusión de la fase reversa se debe a la sílica gel que es un material fuertemente higroscópico. Las ventajas de la cromatografía en fase reversa se resumen de la siguiente manera:

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- La adsorción irreversible en silicagel ocurre raramente.
- La fase móvil predominante es agua.
- El modificador orgánico predominante es el metanol ya que es asequible en calidad y en precios.
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil. ⁽¹³⁾

5. GELES.

Sobre la piel se aplican una gran variedad de formulaciones de diversa naturaleza fisicoquímica, ya sea con fines terapéuticos o cosméticos.

Las formas líquidas se pueden preparar como soluciones, suspensiones o emulsiones; entre las formas sólidas están los polvos suavizantes y lubricantes, las barras que contienen sustancias medicamentosas y las formas de consistencia semisólidas que son el grupo más amplio dentro de las formulaciones de aplicación tópica. ⁽¹⁵⁾

Los sistemas semisólidos poseen características y propiedades que pueden considerarse específicas de las formulaciones de aplicación tópica.

Los geles son preparaciones que están formados por líquidos gelificados que pueden ser:

- **Oleogeles:** Hidrófobos, constituidos por excipientes como parafina, aceites grasos gelificados, o por jabones de aluminio y zinc.

- **Hidrogeles:** Se elaboran con excipientes hidrófilos como agua, glicerol, y propilenglicoles, gelificados con sustancias como gomas, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxílicos, silicatos de magnesio y aluminio.

Los hidrogeles constituyen geles en el sentido “clásico”, se obtiene por esponjamiento limitado de sustancias orgánicas macromoleculares o combinaciones orgánicas. Su contenido de agua es elevado (hasta un 90%). El esponjamiento en presencia de agua de estas sustancias cursa con un incremento de volumen.

5.1. EXCIPIENTES DE LOS GELES.⁽¹⁵⁾

5.1.1. SUSTANCIAS INORGANICAS.

- **DIOXIDO DE SILICIO:** Es más conocido por su denominación comercial, Aerosil®, y está constituido por partículas coloidales esféricas de SiO₂, prácticamente puro. Se obtiene por pirohidrólisis del SiCl₄. La sustancia no es muy densa. La presencia de electrolitos facilita la gelificación.
- **BENTONITA:** Es un silicato aluminico hidratado, relacionado con el caolín. Es un polvo muy fino cuyas partículas poseen la forma de laminillas, insoluble en agua pero la absorbe rápidamente con esponjamiento. Para la obtención de geles extensibles se requieren concentraciones de 15-20%. La presencia de electrolitos, al igual que el Aerosil®, facilita la gelificación.

5.2. SUSTANCIAS ORGANICAS.

- **DERIVADOS DE LA CELULOSA:** La celulosa es insoluble en agua a pesar de que las cadenas moleculares filiformes están constituidas por unidades básicas, glucopiranosas, que contienen tres grupos –OH por unidad. Ello se atribuye a la formación de enlaces hidrogeno entre las cadenas de moléculas. Sin embargo, estos enlaces pueden romperse introduciendo sustituyentes (metilo, etilo, etc.) que conducen a la formación de éteres, y los productos así obtenidos son solubles en agua.

- La *metilcelulosa* corresponde al éter metílico que contienen entre 1,3 y 2 grupos metóxilo por unidad de glucosa.
- La *etilhidroxietilcelulosa* contiene éteres con ambos grupos, etilo e hidroxietilo.
- La *carboximetilcelulosa sódica* es una metilcelulosa con un sustituyente carboxilo (-OCH₂ COOH).

En resumen, si bien la celulosa (celulosa microcristalina, Avicel ®) es esponjable en agua hasta cierto límite, los productos eterificados muestran esponjabilidad ilimitada. Exceptuando la carboximetilcelulosa sódica, todos los éteres de celulosa son de carácter no ionógeno, lo que representa una ventaja por cuanto no dan origen a incompatibilidades con sustancias de carácter iónico. De hecho, el comportamiento tixotrópico de los geles de celulosa microcristalina carboximetilcelulosa sódica sufre modificaciones importantes en presencia de electrolitos.

- **ACIDO POLIACRILICO:** A partir del ácido se obtienen, por polimerización, productos de peso molecular variable. Las dispersiones acuosas de estos polímeros presentan un pH igual a 3 y una viscosidad prácticamente similar a la del agua. La neutralización de estas dispersiones con bases inorgánicas u orgánicas conduce a la obtención de geles que oscilan de 1 a 5%, la concentración necesaria para la obtención de la consistencia de pomada. El producto comercial de uso más extendido es el Carbopol®.

Para valores de pH de 6 a 10, la viscosidad de los geles se mantienen prácticamente constante; valores superiores de pH (10-11) conducen a una rápida caída de la viscosidad.

Su carácter aniónico hace que sean muy sensibles a las sales, produciéndose, en presencia de cationes metálicos, una disminución de la consistencia. Desde

un punto de vista fisiológico, estas bases son atóxicas y bien toleradas por la piel.

- **ALCOHOL POLIVINILICO:** También conocido como Poliviol®, se presenta en diversos grados de polimerización. Para formación de geles sólo son adecuados los productos de peso molecular elevado (40.000), y son necesarias concentraciones del 12-15% para obtener geles extensibles.

Fisiológicamente son bien tolerados, y son muy utilizados en preparados cosmetofarmacéuticos. Presentan incompatibilidades con ácidos, sales, taninos y ácido poliacrílico.

- **POLIVINILPIRROLIDONA:** Se obtiene por polimerización de la N-vinilpirrolidona, de alto peso molecular (20 000 - 700 000). Para obtener geles extensibles, se requieren concentraciones del 10 al 15%. Básicamente se utilizan como pomadas protectoras. Hay que tener presente que con algunos medicamentos (cloranfenicol, sulfatiazol, anestésicos locales tipo procaína) se producen complejos que pueden ser causa de la inactivación del preparado.

5.3. PREPARACION DE LOS GELES.

En la preparación de los geles interviene el agua, el agente gelificante seleccionado, la sustancia higroscópica como la glicerina o el propilenglicol que impida la desecación rápida una vez que el preparado se aplique sobre la piel, también es conveniente la adición de agentes microbianos.

Pueden prepararse por imbibición lenta del agente gelificante en el agua, en la que previamente se habrán disuelto la sustancia medicinal y los demás componentes, si se desea, se puede acelerar el proceso de preparación mezclando los componentes mediante agitación fuerte. ⁽¹⁵⁾

6. ESTRUCTURA DE LA PIEL Y CICATRIZACION.

6.1.LA PIEL.

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano, es un órgano de vital importancia, de estructura compleja y de múltiples funciones que se describen a continuación:

- a. **Barrera:** mantiene el medio interno
- b. **Protección:** agresiones físicas, químicas, microbiológicas, rayos UV.
- c. **Termorregulación:** conserva el calor por vasoconstricción y por la estructura aislante de la hipodermis; y enfría por vasodilatación y evaporación del sudor.
- d. **Percepción múltiple.**
- e. **Interviene en el metabolismo de importantes moléculas:** como vitamina D.
- f. **Vigilancia inmunológica:** por medio de las células de Langerhans.

En resumen, la piel es el órgano más extenso del organismo y se encarga de asegurar el mantenimiento de la integridad y de la homeostasis del organismo. ⁽¹⁶⁾

Desde afuera hacia dentro, se distinguen tres capas de tejido (Figura N° 7):

- La epidermis
- La dermis
- La hipodermis o tejido subcutáneo.

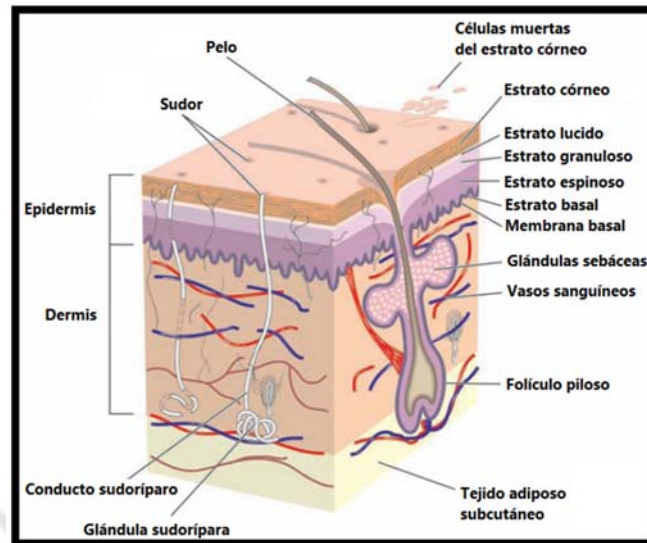


FIGURA N° 7: Estructura de la piel. ⁽¹⁷⁾

LA EPIDERMIS:

La epidermis es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal, es la capa de la piel con mayor número de células y con una grande dinámica de intercambio. Está compuesta por cinco capas denominadas estratos como nos muestra la Figura N° 8, las cuales se describen a continuación:

- **Estrato córneo:** que comprende a las células muertas.
- **Estrato lúcido:** se encuentra en la parte gruesa de las palmas de la mano y de las plantas de los pies, no existe en la piel delgada.
- **Estrato granuloso:** donde las células sintetizan la queratohialina que es la sustancia precursora de la queratina, la cual se acumula en gránulos en el citoplasma.

- **Estrato espinoso y estrato basal:** están formadas por células vivas que se reproducen continuamente por división mitótica, conjuntamente se les denomina capa germinativa.

Se considera que la epidermis está formada por queratinocitos, responsables de sintetizar queratina, los cuales constituyen el 80% de las células epidérmicas, pero también se encuentran otros tipos celulares tales como los melanocitos, células de Langerhans y las células de Merkel. ⁽¹⁸⁾

LA DERMIS:

La dermis es la estructura de soporte de la piel que le proporciona resistencia y elasticidad. Básicamente está formada por tejido conectivo fibroelástico, y sirve de soporte y alimento a la epidermis. Histológicamente se divide en dos capas, desde el exterior hasta el interior las cuales son:

- **Estrato papilar:** compuesta por papilas dérmicas en las cuales se encuentran las asas capilares (sistema circulatorio) que proporciona nutrientes a la epidermis. La capa papilar también contiene terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos.
- **Estrato reticular:** más gruesa que la papilar, es la estructura que proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen.

Las células de la dermis son escasas y comprenden los fibroblastos, macrófagos, mastocitos o células cebadas, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos. Los fibroblastos móviles se diferencian en fibrocitos, que se enlazan mediante elongación y forman un entramado tridimensional. Los fibroblastos sintetizan y liberan los precursores del colágeno, elastina y proteoglicanos para construir la matriz extracelular. Ambas capas, epidermis y dermis se aprecian en el esquema de la Figura N° 8

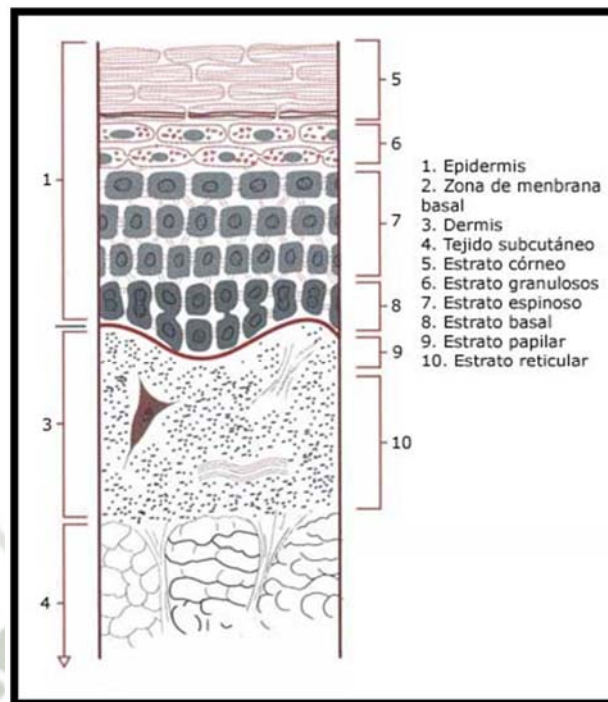


FIGURA N° 8: Esquema de la epidermis y dermis. ⁽¹⁸⁾

La matriz extracelular es una sustancia amorfa compuesta principalmente por proteoglicanos (heteropolisacáridos y proteínas), antiguamente denominados mucopolisacáridos, que debido a su gran capacidad de absorción de agua, forman una materia pegajosa y gelatinosa, que no sólo sirve como elemento de unión entre el resto de elementos tanto celulares como fibrosos, sino que influencia la migración, la cementación y la diferenciación celular. ⁽¹⁸⁾

LA HIPODERMIS:

La dermis se integra con la hipodermis (tejido subcutáneo) y no tiene un límite definido. Esta capa está formada de tejido conectivo laxo y muchas de sus fibras se fijan a las de la dermis, formando franjas de anclaje, fijando así la piel a las estructuras subyacentes (fascia, periostio o pericondrio).

El espesor de la hipodermis es muy variable dependiendo de la localización, el peso corporal, el sexo o la edad. Está formada por tejido adiposo. La hipodermis sirve de

almacén de energía, además de aislante térmico y de protector mecánico frente a golpes. ⁽¹⁸⁾

6.2.CICATRIZACION.

Una herida es la región anatómica donde queda interrumpida la continuidad de la piel o mucosas producida por un agente físico o químico. ^(19,20)

Producida una herida, acontece un conjunto de procesos biológicos que utiliza el organismo para recuperar su integridad y arquitectura que se conoce como cicatrización.

La cicatrización es un proceso dinámico, interactivo en el cual participan mediadores solubles extracelulares, células sanguíneas, células de la matriz tisular, y del parénquima.

6.2.1. TIPOS Y FASES DE CICATRIZACION. ⁽²⁰⁾

Existen 3 maneras de cicatrización según el periodo y la forma en que ésta ocurra.

6.2.1.1.CICATRIZACION POR PRIMERA INTENCION.

Los tejidos cicatrizan por unión primaria cumpliendo con las características de mínimo edema, sin secreción local, tiempo breve, sin separación de los bordes de la herida y con una mínima formación de cicatriz.

6.2.1.2.CICATRIZACION POR SEGUNDA INTENCION.

Cuando la herida no se afronta por falta de una atención oportuna o por indicación médica, se lleva a cabo un proceso de cicatrización más prolongado y más complicado. La herida cicatriza desde las capas profundas y desde sus bordes. Normalmente se forma tejido de granulación que contiene miofibroblasto. La herida cierra por contracción y deja una cicatriz inestética.

6.2.1.3. CICATRIZACIÓN POR TERCERA INTENCIÓN.

Este es un método seguro de reparación en heridas muy contaminadas o en tejidos muy traumatizados

El proceso de cicatrización está dividido en fases, las cuales ocurren de manera secuencial, se describen a continuación:

a. FASE INFLAMATORIA Y HEMOSTÁTICA.

La cicatrización comienza inmediatamente tras producirse la lesión mediante la hemostasia, (Figura N° 9) que se manifiesta inicialmente a nivel macroscópico con una palidez local en el tejido lesionado que aparece poco minutos después de la lesión inicial, y a nivel celular con la formación de un tapón hemostático compuesto por plaquetas y fibrina, que aparte de contribuir con la hemostasia, actúa como una matriz extracelular provisional que va a servir como enrejado para la llegada de las células inflamatorias, fibroblastos y factores de crecimiento.

Al producirse la lesión, las membranas de las células endoteliales destruidas van a liberar vasoconstrictores potentes como el tromboxano A₂ y la prostaglandina 2 α .

La fibrina se produce a partir de la proteólisis del fibrinógeno por acción de la trombina. Los monómeros de fibrina insoluble son entrecruzados mediante el factor XIII, fijando directamente las plaquetas para formar el coágulo. ⁽²¹⁾

Los neutrófilos son los primeros respondedores a los mediadores de la inflamación que se acumulan tras la formación del coágulo (Figura N° 10). Estas células limpian los tejidos de la herida de partículas extrañas y bacterias mediante la secreción de enzimas proteolíticas y son eliminados con la escara o fagocitados por los macrófagos. Las siguientes células en aparecer son los monocitos, en respuesta a factores quimiotácticos como los fragmentos de proteínas de la matriz extracelular, el factor de crecimiento transformante y la proteína quimiotáctica de monocitos -1 (MCP-1).

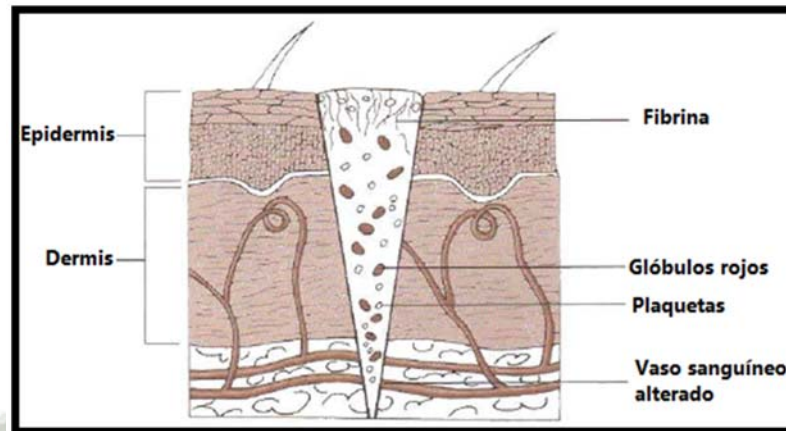


FIGURA N° 9: Fase hemostática de la cicatrización ⁽²²⁾

Los macrófagos se unen a proteínas específicas de la matriz extracelular mediante receptores de integrinas, lo que estimula la fagocitosis de microorganismos y fragmentos de la matriz extracelular, y la secreción del factor estimulante de colonias -1 (CSF-1), una citoquina necesaria para la supervivencia de los monocitos y macrófagos, factor de necrosis tumoral - α (TNF- α), una potente citoquina inflamatoria y PDGF. Otras citoquinas también segregadas por los monocitos y macrófagos son el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), interleucina-1 (IL-1), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). Todos estos mediadores segregados por los monocitos y macrófagos son esenciales en el inicio y la formación de nuevo tejido en las heridas.

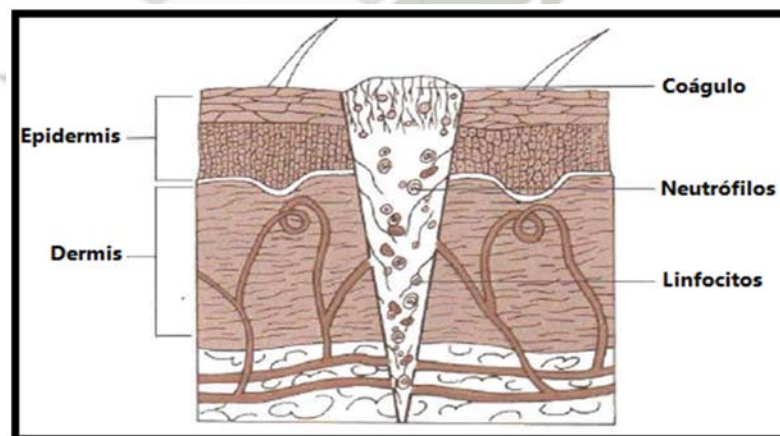


FIGURA N° 10: Fase inflamatoria de la cicatrización. ⁽²²⁾

b. FASE PROLIFERATIVA.

En la segunda fase de la curación de la herida predomina la proliferación celular con el fin de alcanzar la reconstitución vascular y de volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido granular que ha sido formado por los fibroblastos (Figura N° 11). El tejido de granulación está compuesto por sustancia fundamental y colágeno.⁽²³⁾

Durante esta etapa la continuidad del tejido se restablece. Los fibroblastos y las células endoteliales son las últimas poblaciones celulares que infiltran la herida en cicatrización y el factor quimiotáctico más potente para fibroblastos es el PDGF. Tras penetrar en el ambiente de la herida, los fibroblastos reclutados necesitan proliferar primero y luego activarse para realizar su principal función de síntesis y remodelación de la matriz. Esta acción es mediada en especial por las citosinas y los factores de crecimiento que los macrófagos de la herida liberan.

Los fibroblastos al migrar depositan una neomatriz de fibronectina y ácido hialurónico para comenzar a sintetizar la matriz de colágeno, los fibroblastos aislados de heridas sintetizan más colágeno que los que no provienen de heridas, proliferan menos y efectúan de modo activo la contracción de la matriz. Aunque es claro que el ambiente de la herida abundante en citosina tiene una función importante en esta alteración y activación fenotípicas, los mediadores exactos sólo están caracterizados en parte. Además, el lactato, que se acumula en cantidades importantes en el ambiente de la herida con el tiempo, es un regulador potente de la síntesis de colágeno mediante un mecanismo que incluye ADP-ribosilación.⁽²¹⁾

Las células endoteliales también proliferan en forma extensa durante la fase de cicatrización. Estas células participan en la formación de nuevos capilares (angiogénesis), un proceso esencial para el éxito en la cicatrización de la herida. Las células endoteliales migran de vénulas intactas cerca de la herida. Su migración, replicación y nueva formación de túbulos capilares están influidas por citosinas y factores de crecimiento como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), TGF- β (factor beta de transformación del crecimiento) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

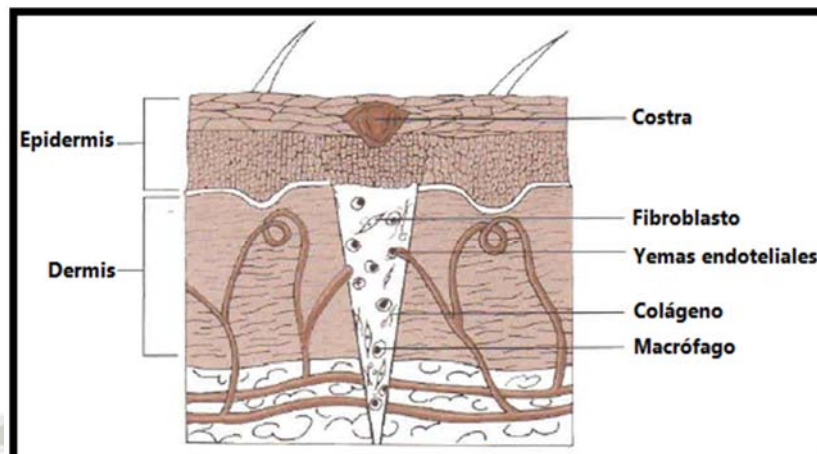


FIGURA N° 11: Fase proliferativa de la cicatrización. ⁽²²⁾

Aunque muchas células producen VEGF, los macrófagos representan una fuente mayor en la herida en cicatrización y en las células endoteliales se localizan en específico receptores de VEGF.

c. FASE DE MADURACION Y DE REMODELACION.

Esta fase se inicia durante la fase fibroplástica y se caracterizan por una reorganización del colágeno sintetizado con anterioridad. El colágeno se cataboliza mediante metaloproteínas de matriz (MPM) y el contenido neto de colágeno de la herida es el resultado de un equilibrio entre la colagenólisis y la síntesis de colágeno. Ocurre un cambio neto hacia la síntesis de colágeno y por último al restablecimiento de la matriz extracelular compuesta por una cicatriz rica en colágeno hasta cierto punto celular.

Tanto la calidad como la cantidad del colágeno recién depositado determinan la fuerza y la integridad mecánica de una herida reciente.

El depósito de matriz en el sitio de la herida sigue un patrón característico: la fibronectina y el colágeno tipo III constituyen la estructura temprana de la matriz; los glucosaminoglucanos y los proteoglucanos representan los siguientes componentes importantes de la matriz, y el colágeno tipo I es la matriz final. La cantidad de colágeno en la herida llega a una meseta varias semanas después de la lesión, pero la

fuerza de tensión continua en aumento durante varios meses más, la formación de fibrillas y el enlace cruzado de las mismas disminuye la solubilidad del colágeno e incrementa la fuerza y la resistencia a la degradación enzimática de la matriz de colágeno.

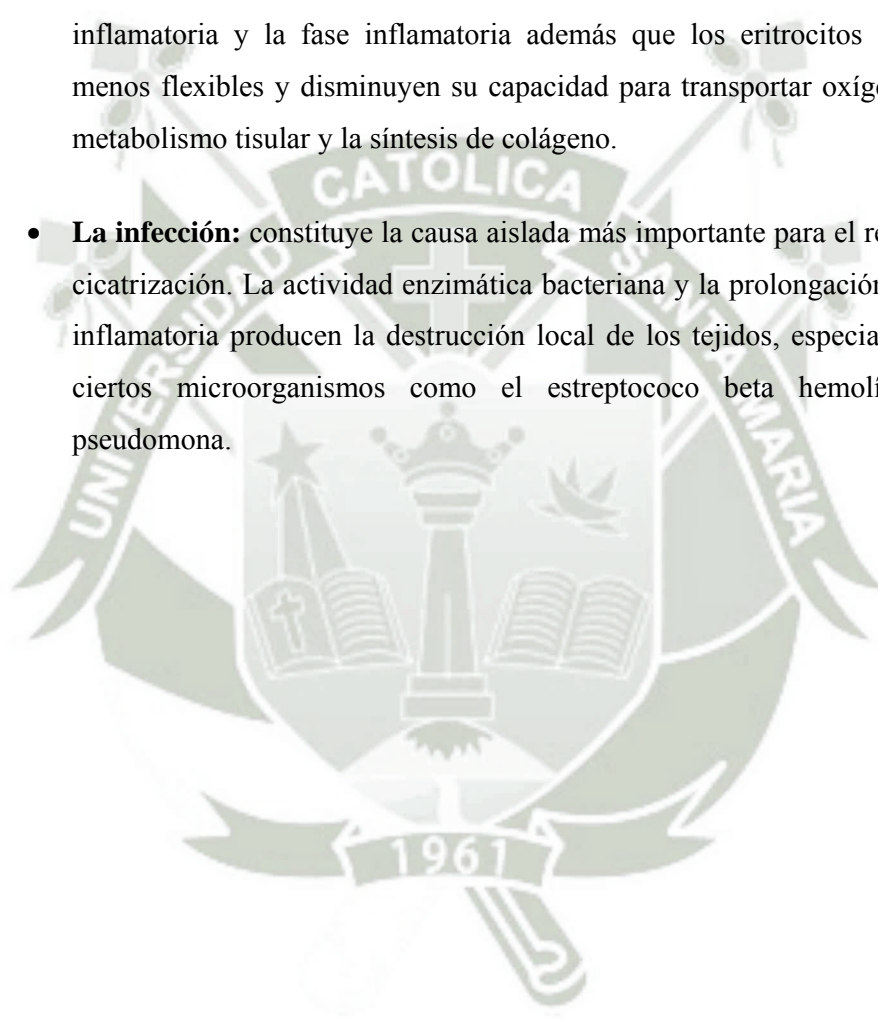
La remodelación de la cicatriz continúa durante muchos meses - de 6 a 12 - después de la lesión y tiene como resultado la formación gradual de una cicatriz madura, avascular y acelular. La fuerza mecánica de la cicatriz nunca iguala la del tejido lesionado.⁽²¹⁾

6.2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CICATRIZACION.⁽²¹⁾

- **La nutrición:** un estado nutricional deficitario con una ingesta inadecuada de proteínas, puede producir una disminución de la resistencia de la herida debido a la alteración de síntesis de colágeno aunque la síntesis también depende de la disponibilidad de las vitaminas. El hierro es también un cofactor de la hidroxilación del colágeno y su déficit altera la capacidad bactericida de los fagocitos. La malnutrición conlleva a un estado de inmunodepresión produciendo un alto riesgo de infecciones de la herida y una alteración en el proceso normal de cicatrización.
- **La oxigenación tisular:** la carencia de oxígeno tisular impide la curación de las heridas y produce una disminución de la resistencia del tejido formado, ya que es fundamental para la síntesis de colágeno.
- **Los fármacos:** los corticoides ejercen una importante acción antiinflamatoria, interfiriendo en la función de los fibroblastos y de las células endoteliales pero la disminución de la resistencia de la curación que producen los corticoides puede revertirse mediante la administración de vitamina A sistémica y local. Los quimioterápicos actúan interfiriendo la síntesis de ADN y ARN, la división celular y la síntesis de proteínas por lo que afectan principalmente a la fase proliferativa de la cicatrización. La

penicilina disminuye los puentes unión al colágeno y, por tanto, la resistencia de la herida.

- **Las hormonas:** la hormona del crecimiento y los andrógenos favorecen la cicatrización aumentando la sangre tras una herida.
- **Las enfermedades metabólicas:** la diabetes mellitus, la glicosilación debilita la fagocitosis bacteriana de macrófagos y neutrófilos prolongando la fase inflamatoria y la fase inflamatoria además que los eritrocitos se vuelven menos flexibles y disminuyen su capacidad para transportar oxígeno para el metabolismo tisular y la síntesis de colágeno.
- **La infección:** constituye la causa aislada más importante para el retraso de la cicatrización. La actividad enzimática bacteriana y la prolongación de la fase inflamatoria producen la destrucción local de los tejidos, especialmente por ciertos microorganismos como el estreptococo beta hemolítico y la pseudomona.





CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1. LUGAR DE LA INVESTIGACION.

En el presente trabajo, la obtención del extracto se realizó en el laboratorio H- 203, la investigación cromatográfica y la elaboración de los geles se realizó en el Laboratorio de Investigación del Proyecto MERCURIO (H- 202), y el estudio del efecto cicatrizante en los animales de experimentación se realizó en el bioterio, todos ubicados en el campus de la Universidad Católica de Santa María en el departamento de Arequipa.

2. TIPO DE INVESTIGACION.

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, prospectivo.

3. MATERIALES.

3.1.UNIDADES DE ESTUDIO.

3.1.1. UNIDAD VEGETAL.

Para efectuar el presente trabajo se utilizó las flores de *Calendula officinalis* L. (Caléndula), las mismas que fueron recolectadas y desecadas en un lugar seco y seguro a cargo de la “Asociación Huitco”, ubicada en la provincia de Lucanas, Puquio en el departamento de Ayacucho y que se muestran en la Figura N° 12.



FIGURA N° 12: Flores de *Calendula officinalis* L.

3.1.2. UNIDAD BIOLÓGICA.

Como unidad biológica se utilizó un grupo de 16 animales de experimentación, hembras de especie *Rattus norvegicus*, entre 200-300 g de peso y con una edad aproximada de 7 meses.

4. MATERIAL DE LABORATORIO.

4.1. MATERIAL DE VIDRIO.

- Probetas de 100 mL, 250 mL.
- Vasos de precipitados de 100 mL, 120 mL y 250 mL
- Pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Frascos de vidrio de 100 mL y 500 mL
- Reservorios de 1000 mL y 500 mL

- Fiolas de 5 mL y 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo
- Frascos color ámbar
- Baguetas

4.2.EQUIPOS.

- Percolador (Elaboración propia)
- Balanza Ohaus®
- Balanza “Triple Beam Balance” Ohaus®
- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) LaChrom con una Bomba Cuaternaria L-7100, una Interfase D-7000, un Detector UV L-7400 Merck HITACHI®
- Equipo de desgasificación
- pH metro Methrom®
- Sonicador Branson® 2510
- Centrifugadora Hettich Zentrifugen®
- Plancha agitadora ThermoScientific®
- Equipo tensiométrico (elaboración propia)
- Equipo EASYPURE II®

4.3.REACTIVOS.

- Propilenglicol USP
- Metanol grado HPLC
- Ácido ortofosfórico grado HPLC
- Estándar de Quercetina pureza $\geq 95\%$ (Sigma).
- Carbopol 940 USP (Delta)
- Trietanolamina pureza $\geq 99\%$ (Merck).
- Metilparabeno pureza $\geq 99\%$ (Fluka).

- Propilparabeno pureza $\geq 99\%$ (Fluka).

4.4. OTROS.

- Algodón
- Alcohol yodado
- Barbijo y gorro de laboratorio
- Máquina de afeitar
- Bisturí #21
- Espátulas de 10 cm
- Guantes de látex talla M
- Jeringa de tuberculina
- Papel filtro
- Ketamina 500 mg/10 mL
- Plumón marcador indeleble

5. METODOS.

5.1. TRATAMIENTO DE LA DROGA.

5.1.1. RECOLECCION Y DESECACION.

La recolección y desecación estuvo a cargo de la “Asociación Huitco”, en la provincia de Lucanas, Puquio en el departamento de Ayacucho.

5.1.2. TRATAMIENTO DE LA DROGA.

Unos 60 gramos de pétalos fueron extraídos del cáliz de la flor, luego se cortaron en pequeños trozos con una tijera y se depositaron en el percolador.

5.2.OBTENCION DEL EXTRACTO.

5.2.1. EXTRACTO.

Es un preparado concentrado de droga animal o vegetal, obtenido por concentración parcial o total de los líquidos extractivos. ^(8,24) Existen 4 tipos:

- **Extractos fluidos:** el disolvente se ha evaporado en el rotavapor hasta conseguir una concentración de principio activo similar a la concentración de principio activo en la droga original. Tienen consistencia líquida y se obtiene generalmente por maceración o percolación, los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y el aire y son muy usados para obtener formas líquidas tales como jarabes, gotas entre otras, ya que se manipulan con facilidad.
- **Extractos blandos:** poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tiene consistencia semisólida, prácticamente no se utilizan por razones de estabilidad y manipulación.
- **Extractos secos:** se obtienen por evaporación total del disolvente y tiene una consistencia de polvo, presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son bastante estables y de fácil manipulación.
- **Crioextractos:** se obtiene de la droga fresca congelada, de la que se extraen principios activos mediante nitrógeno líquido y luego se añade alcohol etílico, son muy costosos y muy útiles para la obtención de enzimas y proteínas de ciertas especies. ⁽⁸⁾

5.2.2. METODO DE PERCOLACION.

La percolación es un método de extracción continua con disolvente.

DISOLVENTE: Propilenglicol USP

FUNDAMENTO

Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente. La droga se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte superior de la columna, atraviesa toda la zona donde está la droga, va extrayendo los principios activos y por la parte inferior se recogen los líquidos extractivos que contiene dichos principios.

Antes de llenar el percolador debe humedecerse la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento, a fin de facilitar la penetración del disolvente en las membranas celulares durante la percolación.

Es muy importante el período de tiempo en el que la droga permanece en contacto con el líquido extractivo (tiempo de extracción) y la relación existente entre droga y líquido extractivo (cantidad de disolvente).

En la percolación ocurren los procesos de lavado celular y de difusión celular, cuando la droga entra en contacto con el disolvente, se produce una difusión de los principios activos de la droga hacia el disolvente debido a que en la droga la concentración de principios activos es superior a la concentración del disolvente utilizado en la extracción. La difusión se produce hasta alcanzar el equilibrio. Al renovar el disolvente se mantiene una diferencia de concentración de principios activos entre la droga y el disolvente, lo cual permite que se produzca la difusión celular pasiva. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas de la droga pero con un elevado consumo de disolvente.

PROCEDIMIENTO:

Previamente se instaló el equipo de percolación en un soporte de madera, luego se colocó una torunda de algodón en el pico del percolador, y se introdujo los 60 gramos de pétalos de la muestra procediendo a humedecerla con propilenglicol y presionando con una bagueta para que la droga quede compactada. Posteriormente se colocó papel filtro y perlas de vidrio, luego se añadió la suficiente cantidad de propilenglicol para que este quede a 1 cm por encima de la droga y finalmente se dejó macerando por 24 horas, tal como se muestra en el esquema de la Figura N° 13.

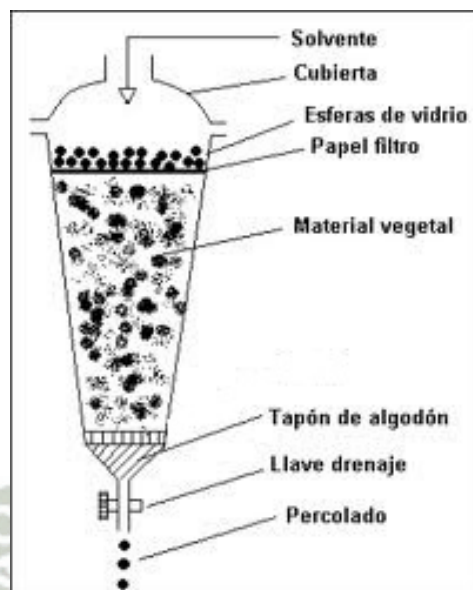


FIGURA N° 13 Extracción mediante el método de percolación

Pasadas las 24 horas se procedió a soltar la llave del percolador para iniciar el goteo a una velocidad aproximada de 30 gotas por minuto. Al cabo de 3 horas y media se obtuvo 300 mL de percolado el cual se volvió a percolar agregando más cantidad de disolvente y luego de otras 3 horas y media se obtuvo 300 mL de percolado de color anaranjado característico. Este percolado se envasó en una botella de vidrio color ámbar, se rotuló, se fechó y se almacenó en un lugar fresco y seco para su posterior análisis por HPLC y la elaboración del gel.

5.3.METODO ANALITICO.

5.3.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

Validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente confiable y reproducible para la obtención de resultados que demuestren que el proceso analítico es apto para el uso indicado. ^(25,26)

La validación se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, pues proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer (25, 27, 28).

La validación de un método analítico es necesaria ya que hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables, reproducibles y adecuados para un propósito porque las decisiones que se toman son en base a la información que nos otorgan dichos datos.

5.3.2. METODO PARA LA EVALUACION DE LOS PARAMETROS DE UNA VALIDACION ANALITICA.

Para evaluar los parámetros de la validación del método analítico se utilizó estándar de Quercetina con pureza $\geq 95\%$ (Sigma).

Condiciones Cromatográficas:

- Columna Chromolith RPe-18 de 10 cm
- Fase móvil: Metanol: Agua (50:50).
- Sistema: Isocrático.
- Detector UV/Vis, longitud de onda: 254 nm
- Flujo: $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Tiempo total de corrida: 10 min

Preparación de la fase móvil:

En una probeta de 1000 mL se agregó 500 mL de agua ultrapura, 200 uL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y se completó a volumen con metanol grado HPLC, luego la fase móvil se desgasificó con el equipo de desgasificación, de esta solución ya desgasificada, 700 mL se transfirieron a un recipiente de vidrio para las corridas en el HPLC mientras que los 300 mL restantes se reservaron en otro recipiente para las diluciones del estándar y la muestra respectivamente. Ambos recipientes se rotularon y fecharon.

5.3.2.1.LINEALIDAD.^(13,28,29)

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta.

El coeficiente de correlación determina el intervalo comprendido entre la concentración máxima y mínima de analito para el cuál el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una gráfica de calibración.

Preparación de la solución stock de estándar de Quercetina:

Se pesó 2.90 mg de estándar de quercetina y se transfirió a una fiola de 10 mL completada a volumen con metanol para lograr una concentración madre de 290 mg.L⁻¹, luego de esta solución madre se tomó una alícuota de 260 uL llevando a una fiola de 10 mL con metanol obteniendo una solución stock de concentración final de 7.5 mg.L⁻¹ de Quercetina.

Preparación de la Gráfica de Calibración:

Como se observa en la Figura 14, a partir de esta solución stock ya preparada se tomaron alícuotas de 100, 200, 400, 800 y 1000 μ L, llevando a cada una de ellas a fiolas de 5 mL, enrasándolas con fase móvil, obteniendo concentraciones de 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 y 1.50 mg.L⁻¹ de Quercetina. Las soluciones se filtraron y se procedió a inyectar al HPLC por triplicado.

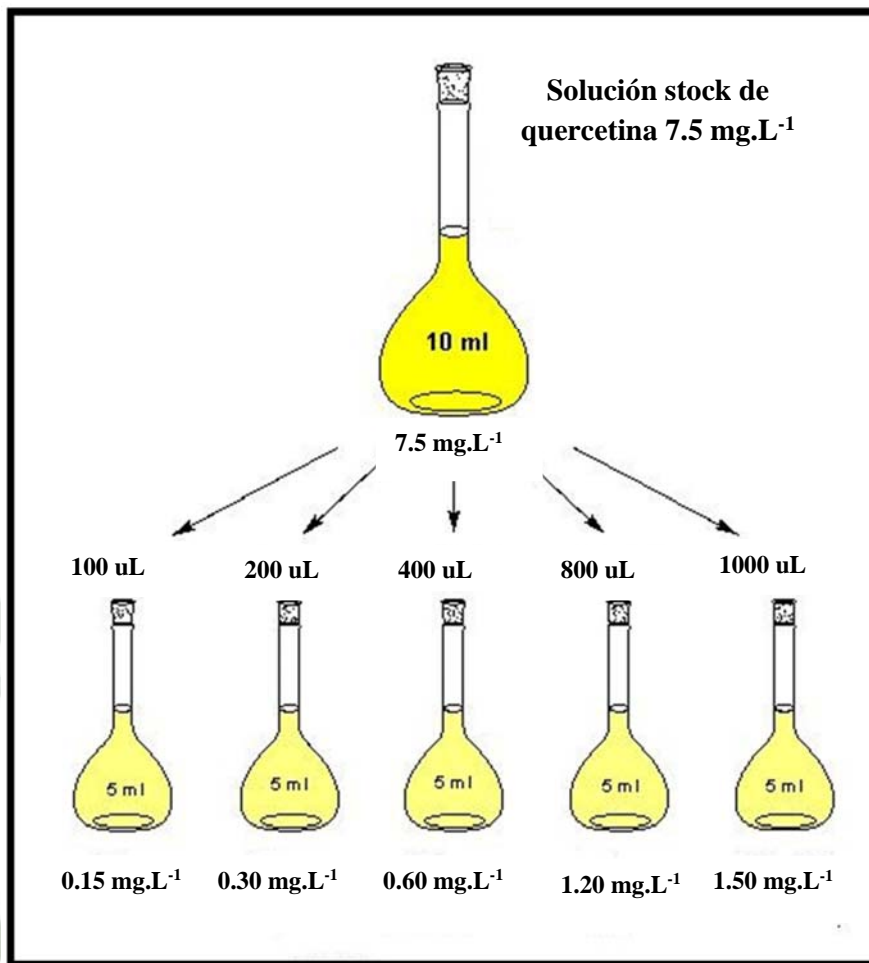


FIGURA N°.14: Preparación de la gráfica de calibración

Estadística:

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una gráfica estándar, y se determina la ecuación de regresión $Y = a + bx$.

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X_i la concentración e Y_i el valor medido en el ensayo, independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de la regresión en un intervalo de confianza dado ($p = 0,05$).

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

Así, el valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre X e Y. En la práctica, r es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con n-2 grados de libertad y se compara con el valor t calculado para el nivel de confianza requerido. Si el valor observado es mayor que el de la tabla, entonces se concluye que la correlación lineal es significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (b) se calcula en función de su varianza.

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y_i^2 - a \sum Y_i - b \sum X_i Y_i}{n-2}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}}$$

Luego, los límites de confianza de la pendiente corresponden

a: Intervalo de confianza para:

b: $b = b \pm t, Sb$

Donde t es para n-1 grados de libertad. Por su parte, el límite de confianza del estimador de la ordenada al origen (a) se calcula en función de:

$$S_a = \sqrt{(Sb)^2 \frac{\sum X_i^2}{n}}$$

Intervalo de confianza para a: $a = a \pm t, Sa$

Para pruebas de Disolución la ICH recomienda un +/- 20% sobre el rango especificado.

5.3.2.2. LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION. ^(13,28,29)

El límite de detección corresponde, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas, mientras que el límite de cuantificación corresponde, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Ambos se expresan en unidades de concentración.

Estadística:

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse a partir de la ecuación de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Se determina la pendiente de la gráfica de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: b

Se obtiene otra gráfica de calibración, leyendo cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl}

Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n medidas individuales como:

Límite de Detección:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

5.3.2.3.PRECISION.^(13,28,29)

La precisión de un método analítico, está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Solamente la precisión se evalúa con los datos obtenidos experimentalmente examinando el coeficiente de variación sin tomar en cuenta los valores reales.

La precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales.

La precisión intermedia es evaluada por determinaciones que se llevan a cabo en el mismo laboratorio pero no simultáneamente, es decir, en diferentes días, con diferentes analistas, con diferentes instrumentos, diferentes gráficas de calibración

Preparación del ensayo:

De la solución stock con estándar de quercetina de 7.5 mg.L^{-1} se tomaron alícuotas de 100, 200, 400, 800 y 1000 μL , llevando a cada una de ellas a fiolas de 5 mL, enrasándolas con fase móvil, obteniendo concentraciones de 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 y 1.50 mg.L^{-1} respectivamente. Filtrar estas soluciones y proceder a inyectar al HPLC por triplicado, realizar el ensayo en tres días distintos.

Estadística:

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ , estimada analíticamente por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV).⁽¹³⁾

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n es el número de medidas, es el valor medido en el ensayo i y el estimador de la medida de la población μ calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida). La precisión de un método deberá estudiarse sobre:

- El sistema: la precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista diferente día, diferente instrumento). Así la AOAC indica un CV del sistema de no más de 2%, leyendo 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores.

Horwitz ha encontrado una ecuación empírica que relaciona la DSR de un método dado con la concentración de analítico en la muestra. Para ello, se recopilaron resultados de unos 150 ensayos ínterlaboratorios de la AOAC comprendiendo, por lo menos, 5 metodologías diferentes (cromatografía, absorción atómica, espectrofotometría, bioensayos) la relación hallada es la siguiente,

$$DSR (\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potencias de 10

Así la concentración de analito es 1 ppm la RSD será:

$$DSR = 2^4 = 16\%$$

Y si la concentración de analito es 1 ppb la DSR será:

$$DSR = 2^{5.5} = 45\%$$

En el mismo trabajo, Horwitz reporto que la DSR entre laboratorios tiende a disminuir al aumentar la experiencia analítica hasta un valor que se aproxima bastante al estimado por cálculo.

Límites de confianza:

En muchos casos debe indicarse el intervalo de confianza de la medida, es decir, el rango en el cual puede definirse la probabilidad de que éste "capture" con la probabilidad indicada el parámetro μ .

Los criterios pueden ser varios, pero deberá dejarse constancia del empleado: la media ± 2 desviaciones estándar (correspondiente al 95% de las medidas en una distribución normal o gaussiana), la media ± 3 desviaciones estándar (99,7% de las medidas para el mismo tipo de distribución) o preferentemente, cuando el número de muestras es pequeño (menor de 30), las medidas independientes, y la distribución normal, puede calcularse de acuerdo a la distribución t de Student según.

$$\bar{X} - \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Donde t es el valor "t de Student", tabulado para n mediciones con $v = n-1$ grados de libertad y para varios niveles de significación (el nivel más empleado es $p = 0,05$, correspondiente a un intervalo de confianza del 95%).

5.3.2.4.EXACTITUD.^(13,28,29)

La exactitud de un método se refiere a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero, pero también puede referirse en este caso a el porcentaje de estándar interno presente inicialmente en la muestra, que llega hasta el final del procedimiento.

Preparación de las soluciones de enriquecimiento

En 2 tubos cónicos se agregó 1 mL de extracto glicólico de *Calendula officinalis* L. (Caléndula), 400 uL de estándar de quercetina y 5 mL de fase móvil, como se aprecia en la Figura 15, se sonicó por 5 minutos y se centrifugó a 60 rpm por 20 minutos, el sobrenadante obtenido se filtró y se inyectó al HPLC por triplicado.



FIGURA N° 15 Muestras preparadas para evaluar el parámetro de exactitud.

Estadística:

La exactitud debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia, Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100%. (HPLC)

Para hallar el porcentaje de recuperación es necesario calcular el dato teórico que está relacionado con la concentración de la solución stock más el volumen adicionado de dicha solución y el volumen final de la mezcla.

$$7.5 \text{ mg.L}^{-1} \times 400 \text{ uL} = [X] \times 6000 \text{ uL}$$

$$[X] = 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$$

Dato teórico: 0.5 mg.L⁻¹

Porcentaje de recuperación:

$$\frac{[Muestra + estandar]}{Muestra + estandar solo} \times 100$$

5.3.3. CUANTIFICACION DE QUERCETINA EN EXTRACTO GLICOLICO DE *Calendula officinalis L.* (CALENDULA) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

Preparación de la muestra:

En 5 tubos cónicos se agregó 1 mL de extracto glicólico de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) y luego se adicionó 5 mL de fase móvil, la muestra se sónico por 5 minutos y se centrifugó a 60 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se filtró y se inyectó al HPLC con las condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente para su lectura respectiva.

Para realizar los cálculos se tomó en cuenta la ecuación de la recta del promedio de las áreas de la gráfica obtenidas en el parámetro de linealidad de la validación del método y las diluciones previamente sonicadas, centrifugadas y filtradas para proceder a la inyección de la muestra al HPLC.

Los resultados se expresaron en mg.kg⁻¹, tomando en consideración los 60 gramos utilizados para la elaboración del extracto.

5.4.PREPARACION DE GELES.

Tomando en cuenta que el disolvente empleado para la elaboración del extracto fue el propilenglicol se desarrolló una formulación del gel (Tabla N° 1) que involucró al carbopol como agente gelificante y al agua destilada como líquido gelificado. Fue necesario además, incorporar parabenos como conservantes y unas gotas de trietanolamina para regular el pH a 6.5 – 7.

TABLA N° 1: Formulación del gel al 5% y al 10% de *Calendula officinalis* L.

INGREDIENTES	CANTIDADES	
	Gel de <i>Calendula officinalis</i> L. al 5%	Gel de <i>Calendula officinalis</i> L. al 10%
CARBOPOL	1%	1%
METILPARABENO	0.40%	0.40%
PROPILPARABENO	0.20%	0.20%
EXTRACTO DE <i>Calendula officinalis</i> L. al 20%	25 g	50 g
AGUA DESTILADA c.s.p.	100 g	100 g
TRITANOLAMINA c.s.p. pH 6.5 - 7		

Fuente: Elaboración propia

El *modus operandi* se desarrolla a continuación:

- a. Se verificó la limpieza y sequedad del material a utilizar.
- b. Se procedió a pesar los ingredientes.
- c. En un recipiente, se agregó el extracto de Caléndula, luego se añadieron los parabenos en agitación constante.
- d. Una vez disueltos los parabenos en el extracto glicólico de Caléndula, se agregó poco a poco el carbopol y se dejó en agitación constante por 24 horas.
- e. Pasadas las 24 horas, se detuvo la agitación y se añadió el agua destilada moviendo constantemente con una bagueta, se adicionó la trietanolamina gota a gota hasta alcanzar el pH indicado obteniendo un gel con color y olor característicos.
- f. Finalmente el gel se envasó y se rotuló.

5.5.METODO PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO CICATRIZANTE.

En 1929 Howeset *al.* realizaron estudios para la determinación de la fuerza de tensión, ⁽²³⁾ el método fue aplicado para determinar el efecto cicatrizante del gel al 5 y 10% elaborados a base de los pétalos de *Calendula officinalis L.*

FUNDAMENTO:

El método de la fuerza de tensión mide la fuerza (en gramos de arena) necesaria para abrir una herida incisa de 1 cm de largo, realizada en el lomo de los animales de experimentación. ⁽²³⁾

La fuerza necesaria para abrir la herida está relacionada directamente con el proceso de cicatrización, así una menor fuerza para abrir la herida será interpretada como una cicatriz mal consolidada, por el contrario una mayor fuerza implica un proceso de cicatrización favorable. ⁽³⁰⁾

5.5.1. PROCEDIMIENTO.

Estandarización de los animales:

Los animales de experimentación se alimentaron *ad libitum* 4 días antes en jaulas individuales, al término del cual se tomó el peso de cada animal.

Distribución aleatoria:

El proceso de muestreo de los animales de experimentación, fue de forma aleatoria, a cada animal se le practicó dos heridas incisas, y se les aplicó un tratamiento distinto a cada herida logrando al final 8 heridas con sus tratamientos respectivos. Este método de muestreo se realizó con el fin de reducir la variabilidad biológica. Este muestreo se realizó conforme a la Tabla N° 2.

Depilación:

Después de los 4 días de estandarización de los animales de experimentación, se procedió a rasurarlos mediante una máquina de afeitar eléctrica en un área de 2 cm² aproximadamente.

Los animales fueron anestesiados con ketamina vía intraperitoneal a una dosis de 75 mg/Kg de peso. ⁽³¹⁾

TABLA N° 2: Diseño aleatorio para los animales de experimentación

Numero de Rata	TRATAMIENTO			
	Gel Base	Gel de <i>Calendula officinalis</i> L. al 5%	Gel de <i>Calendula officinalis</i> L. al 10%	Cicatricure®
1	X	X		
2		X		X
3			X	X
4	X		X	
5	X	X		
6		X		X
7		X		X
8	X	X		
9		X		X
10			X	X
11	X		X	
12	X		X	
13			X	X
14	X	X		
15			X	X
16	X		X	
TOTAL	8	8	8	8

Fuente: Elaboración propia

Incisión a la piel:

Luego de la depilación se colocó al animal a la mesa de trabajo, se practicó la asepsia de la zona a incidir, y con un plumón se marcaron dos puntos equidistantes de 1 cm a ambos lados del lomo de los animales. Se realizó el corte de punto a punto sobre la zona indicada levantando la piel del animal, a una profundidad de 2 mm ^(32,33) Esta etapa debe de realizarse cumpliendo condiciones de asepsia.

Aplicación de tratamientos:

Se administró en forma tópica la primera dosis del tratamiento (0.5 g aproximadamente ^{32,33}) sobre la incisión con la ayuda de un hisopo con el fin de obtener una distribución homogénea sobre la herida procurada.⁽³⁶⁾ Se aplicó a 8 heridas el gel preparado al 5%, a otras 8 el gel preparado al 10%, otras 8 heridas fueron tratadas con el preparado comercial Cicatricure® (comparación) mientras que las últimas 8 heridas estuvieron destinadas al grupo base gel (placebo). Se repitió el tratamiento 2 veces por día en un lapso de 5 días.

Determinación de la fuerza tensil de la cicatriz

Luego de los 5 días de tratamiento se procedió a realizar la fuerza de tensión en el equipo tensiométrico.

Para ello, los animales son previamente anestesiados con la misma dosis de ketamina vía intraperitoneal empleada antes de realizar las incisiones. Luego los animales se coloraron en la mesa de trabajo y con un plumón se marcaron los puntos a 1.5 cm de distancia cada uno a ambos extremos de la incisión con el fin de realizar los puntos de sutura que se unirían a los hilos del equipo de tensión.

Con mucho cuidado se colocó al animal en posición decúbito ventral sobre el equipo de tensión, se unieron los puntos de sutura al punto fijo y al punto móvil del equipo y en el recipiente tarado del punto móvil se agregó arena lentamente hasta conseguir la

apertura de la cicatriz. Finalmente se registraron los gramos de arena requeridos para medir la fuerza tensil de la cicatriz de cada animal de experimentación.

5.5.2. METODOS ESTADISTICOS PARA LA INTERPRETACION DE RESULTADOS.

5.5.2.1.MEDIDAD DE TENDENCIA CENTRAL.

Se calculó media, mediana, desviación estándar, varianza valor mínimo y máximo, rango y cuartiles para analizar la dispersión de los datos obtenidos de la muestra.

5.5.2.2.ESTADISTICA PARA LA COMPARACION DE MEDIAS.

ANOVA.

Es un método estadístico para comparar más de dos medias, es decir para comparar varios grupos a la vez y determinar si existen diferencia significativa entre ellos a lo cual se utiliza el modelo de tabla presentado a continuación en la Tabla N° 3:

TABLA N° 3: ANOVA

FUENTE DE VARIACION	GRADO DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	ESTADISTICO F
ENTRE GRUPOS	$K - 1$	$\sum X_1^2 - \frac{T^2}{N}$	$C.M.E = \frac{S.C.E}{K - 1}$	$F = \frac{C.M.E}{C.M.D}$
DENTRO DE GRUPOS	$N - K$	$\frac{\sum t_1^2}{ni} - \frac{T^2}{N}$	$C.M.D = \frac{S.C.D}{N - K}$	
TOTAL	$N - 1$	S.C.E + S.C.D		

Fuente: Elaboración propia

PRUEBA DE TUKEY.

Esta prueba es empleada cuando se desea realizar una comparación múltiple basada en los intervalos de confianza, comparando la totalidad de todos los pares de medias.

Se expresa de la siguiente manera:

$$HSD = q, \alpha, \kappa, N - \kappa \sqrt{\frac{CM \text{ residual}}{n}}$$



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto cicatrizante de un gel elaborado a base del extracto glicólico de *Calendula officinalis* L. conocida comúnmente como Caléndula. Además se cuantificó la cantidad del flavonoide quercetina en el extracto glicólico, el cual tiene propiedades cicatrizantes. (37,38,39).

1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCION DEL EXTRACTO.

En primer lugar la droga ya desecada se consiguió por medio de la “Asociación Huitco” ubicada en Puquio, provincia de Lucanas en el departamento de Ayacucho. Luego se procedió tal como se describió en el capítulo II, los pétalos fueron separados del cáliz y posteriormente cortados para dar lugar a la percolación.

El extracto glicólico fue obtenido mediante el proceso de percolación, el cual es un método de extracción continuo, el extractante fue propilenglicol elegido dado que

este es un disolvente orgánico no volátil, higroscópico, miscible, adicionando el hecho de que los flavonoides se extraen mejor con este método en este líquido.⁽¹⁾

Se elaboró un percolador artesanal como se observa en la Figura N° 16, y tras la percolación se obtuvo 300 mL de extracto al 20%, las características del extracto se muestran en la Tabla N° 4.



Figura N° 16 Percolador

TABLA N° 4: Características del extracto glicólico de Calendula officinalis L.

CARACTERISTICA	EXTRACTO POR PERCOLACION
DISOLVENTE	PROPILENGLICOL
COLOR	ANARANJADO CARACTERISTICO
ASPECTO	LIMPIDO
OLOR	AROMATICO

Fuente: Elaboración propia

2. VALIDACION DE METODO ANALITICO POR CROMOTOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

La validación es el proceso de demostrar o confirmar las características de rendimiento de un método de análisis, típicamente, la validación de un método químico de análisis resulta en la especificación de varios aspectos de la fiabilidad y aplicabilidad. ⁽²⁹⁾

Las características de rendimiento de un método de análisis son las cualidades funcionales y las medidas estadísticas sobre el grado de fiabilidad que presenta el método bajo condiciones de funcionamiento especificadas. Las cualidades, funcionales son la capacidad de distinguir el analito a partir de otras sustancias; la aplicabilidad, como las matrices y rango de concentración de funcionamiento aceptable; el grado de fiabilidad, la recuperación que se expresa habitualmente en términos de sesgo, y la variabilidad, que es expresada como la desviación estándar o términos equivalentes (coeficiente de variación porcentual y la varianza). ⁽²⁹⁾

La evaluación de cuatro parámetros, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud permitieron evidenciar el cumplimiento de los requerimientos establecidos como valores sugeridos por la AOAC

La técnica utilizada para la cuantificación de quercetina fue la de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un equipo LaChrom con una bomba cuaternaria L-7100, una interfase D-7000, un detector UV L-7400 Merck HITACHI® (Figura 17), diseñando una fase móvil de agua y metanol (50:50), en un sistema isocrático ^(40,41,42,43) a una longitud de onda de 254 nm, lo que la hace una técnica simplificada ya que otros trabajos de investigación muestran fases móviles más complejas utilizando solventes como acetonitrilo, dioxano, tetrahidrofurano, trabajando incluso en sistemas de gradiente con tiempos de corrida extensos. ^(44,45,46,47,48)

El tiempo de retención para la quercetina en el estándar y en el extracto glicólico de Caléndula con las condiciones cromatográficas ya mencionadas fue de 4.7 minutos.



FIGURA N° 17: Equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

La columna utilizada fue una columna Chromolith RPe-18 de 10 cm, una columna monolítica (Figura 18) que consiste en una única pieza (de ahí su nombre) de material poroso con características únicas en cuanto a permeabilidad y eficiencia. Se han desarrollado dos tipos principales de columnas monolíticas, las basadas en polímeros orgánicos y las basadas en monolitos de sílice. Las de tipo orgánico son, en general, más utilizadas para separaciones de macromoléculas como proteínas o anticuerpos utilizando fases móviles mayoritariamente acuosas. Las basadas en sílice tienen una estructura bimodal caracterizada por macro-poros de unos 2 μm y meso-poros de aproximadamente 13 nm.

Las características de estas columnas radican en que poseen mayor velocidad de transferencia de masa y pueden ser utilizadas a caudales entre 3 y 10 veces más elevados que las columnas particuladas, permitiendo reducir significativamente el tiempo de análisis. Otro enfoque que se emplea con estas columnas consiste en utilizar suficiente longitud de columna (hasta el límite de presión provisto por el sistema) con el fin de lograr un gran número de platos teóricos.



FIGURA N° 18: Columna monolítica empleada en el ensayo.

Entre las limitaciones generales de estos monolitos se encuentra el límite de presión que soportan: no mayor a 200 bar, rangos reducidos de pH de fase móvil posibles (entre 2 y 8), incompatibilidad con algunos solventes, poca variedad de fases estacionarias y muy pocos fabricantes por fuertes restricciones en las patentes de su fabricación. ⁽⁴⁹⁾

1.1.LINEALIDAD.

Este parámetro fue evaluado en un rango de concentraciones de 0.15 a 1.5 mg.L⁻¹, en 5 niveles los cuales fueron 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 y 1.50 mg.L⁻¹ procesándose por triplicado.

En la Tabla N° 5 se muestran las áreas obtenidas, y su análisis estadístico correspondiente, además de los datos promedio con los que se procede a realizar una gráfica de calibración(Figura N° 19) obteniéndose un valor para r² de 0.9971. En la práctica, r es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros.

TABLA N° 5.- Datos para determinar la linealidad del método

Concentración mg.L ⁻¹	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	s	%CV
0.15	17802	20108	18031	18647	1270.43	6.81
0.3	53439	49487	55462	52796	3038.95	5.76
0.6	114628	128210	118411	120416	7009.54	5.82
1.2	303310	293374	305290	300658	6385.34	2.12
1.5	378863	404411	383176	388817	13676.18	3.52

Fuente: Elaboración propia.

Con los datos de la Tabla N° 5 se obtiene la siguiente gráfica de calibración.

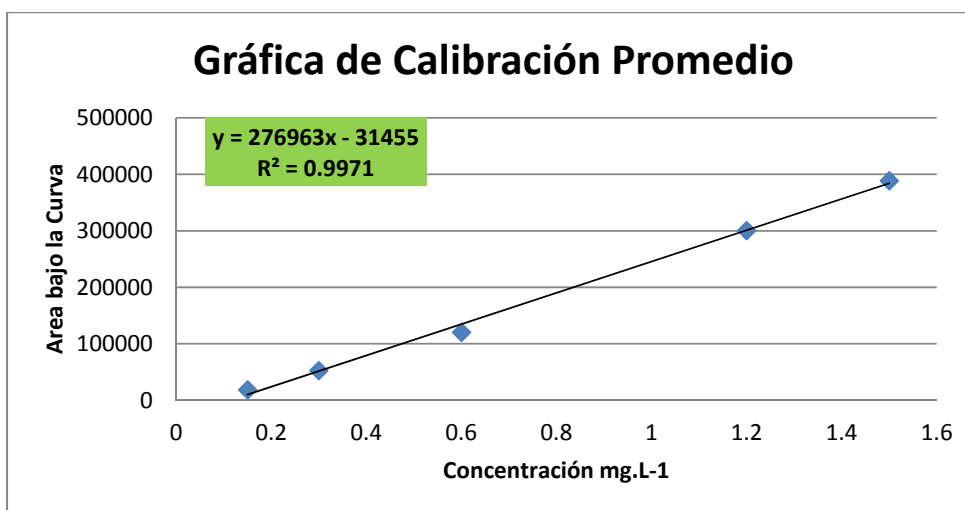


FIGURA N° 19: Gráfica de la linealidad promedio del estándar de quercetina.

La gráfica N° 19 nos permite obtener los valores a, b y r^2 en donde:

a	-31455
b	276963
r^2	0.9971

El valor de r^2 es de 0.9971, dado que este valor es cercano a la unidad se afirma que hay proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta, del mismo modo se observa que los puntos están dentro de una línea recta entonces se puede confirmar que el método es lineal.

1.2. LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION.

El límite de detección corresponde, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas, mientras que el límite de cuantificación corresponde, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Ambos se expresan en unidades de concentración.

Una vez revisado el parámetro de linealidad se procedió a calcular los límites de detección y cuantificación haciendo uso de los datos obtenidos para la linealidad con ayuda de las fórmulas descritas en el capítulo II, resultados que se muestran a continuación.

a. Cálculo de la respuesta a concentración cero:

El valor de Y_{bl} para este caso es igual a la ordenada del origen obtenida en la gráfica concentración vs área

$$y = 276963X - 31455$$
$$Y_{bl} = -31455$$

b. Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

El valor de S_{bl} para este caso es igual a la ordenada del origen obtenida en la gráfica concentración vs desviación estándar.

$$y = 7369.9 X + 748.69$$
$$S_{bl} = 748.69$$

Luego, usando la ecuación de la gráfica de calibración para quercetina

$$y = 276963x - 31455$$

Tomamos como pendiente b: 276963 y los índices a calcular son:

Límite de detección = 0.054 mg.L^{-1}

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación = 0.063 mg.L⁻¹

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Los valores obtenidos muestran que el método es capaz de cuantificar con exactitud y precisión a partir de un valor de 0.063 mg.L⁻¹.

1.3.PRECISION.

La precisión de un método analítico, está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. ⁽¹³⁾ La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Y solamente este parámetro es evaluado con los datos obtenidos experimentalmente examinando el coeficiente de variación porcentual sin tomar en cuenta los valores reales. ⁽²⁹⁾

La precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales.

La precisión intermedia es el parámetro determinado mediante situaciones repetidas llevadas a cabo en un mismo laboratorio pero no simultáneamente, es decir, en días diferentes, con diferentes gráficas de calibración, con diferentes instrumentos, con diferentes analistas etc.

El coeficiente de variación porcentual de la precisión intermedia no debe de exceder al doble del coeficiente de variación porcentual de la precisión propiamente dicha.

La repetibilidad se refiere al grado de concordancia de los resultados cuando las condiciones se mantienen lo más constante posible, con el mismo analista, reactivos, equipos e instrumentos realizados en un corto período de tiempo. ⁽²⁷⁾

De acuerdo a la Tabla N° 7 obtenida de la guía de validación de la AOAC, los valores del coeficiente de variación porcentual de los datos obtenidos para el parámetro de precisión (repetibilidad) no deben de exceder del valor del porcentaje indicado en la Tabla para analitos de concentraciones de hasta 1 mg.L⁻¹ y 10 mg.L⁻¹ respectivamente, por lo que al observar los valores del coeficiente de variación porcentual de la Tabla N° 6 podemos afirmar que el método es preciso.

Tabla N° 6: *Datos obtenidos del coeficiente de variación porcentual para la determinación del parámetro de precisión (Repetibilidad).*

Concentración mg.L ⁻¹	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	s	%CV
0.15	17802	20108	18031	18647	1270.43	6.81
0.3	53439	49487	55462	52796	3038.95	5.76
0.6	114628	128210	118411	120416	7009.54	5.82
1.2	303310	293374	305290	300658	6385.34	2.12
1.5	378863	404411	383176	388817	13676.18	3.52

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 7: *Valores del parámetro de precisión (repetibilidad) de acuerdo a la AOAC.⁽²⁹⁾*

Concentración	Repetibilidad (RSDr)
100%	1%
10%	1.50%
1%	2%
0.10%	3%
0.01%	4%
10 ug/g	6%
1 ug/g	8%
10 ug/kg	15%

En el caso de la precisión intermedia, el coeficiente de variación porcentual no debe de exceder al doble del coeficiente de variación porcentual de la precisión (repetibilidad). Así, al observar los valores del coeficiente de variación porcentual obtenidos en la Tabla N° 8 nos damos cuenta que los valores no exceden del doble de los valores del coeficiente de variación porcentual referente a la precisión, por lo que afirmamos que el método es preciso.

Tabla N° 8: Datos obtenidos del coeficiente de variación porcentual para la determinación del parámetro de precisión intermedia.

Concentración mg.L-1	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Promedio	s	%CV
0.15	18060	17802	20108	18031	18500	1078.03	5.83
0.3	42399	53439	49487	55462	50197	5760.32	11.48
0.6	130972	114628	128210	118411	123055	7785.33	6.33
1.2	272263	303310	293374	305290	293559	15124.51	5.15
1.5	366291	378863	404411	383176	383185	15860.12	4.14

Fuente: Elaboración propia.

1.4.EXACTITUD.

Este parámetro se refiere al valor medido que se obtiene, el cual debe ser muy próximo al de referencia, en otras palabras el porcentaje de recuperación del analito debe acercarse al 100%.

Para evaluar este parámetro se usó el método de porcentaje de recuperación para lo que se agregó una cantidad de estándar conocida de quercetina, 400 uL, a las muestras de extracto glicólico de Caléndula, las cuales se sonicaron por 5 minutos y se centrifugaron a 60 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se filtró y se inyectó al HPLC.

Para obtener el porcentaje de recuperación es necesario el cálculo del dato teórico:

$$[7.5 \text{ mg. L}^{-1}] \times 400 \text{ uL} = [X] \times 6000 \text{ uL}$$

$$[X] = 0.5 \text{ mg. L}^{-1}$$

Al obtener el dato teórico, se calcula el porcentaje de recuperación haciendo referencia a las concentraciones calculadas con la ecuación de la recta obtenida para el parámetro de linealidad, de esta manera:

$$\frac{(Muestra + estandar)}{Muestra + dato teórico} \times 100$$

Como se observa en la Tabla N° 9, el valor del coeficiente de variación porcentual fue de 1.86% y el porcentaje de recuperación fue de 92.37%. La Tabla N° 10 obtenida de la validación de métodos de la AOAC, nos permite evidenciar que el rango establecido para muestras con concentraciones de hasta 1 mg.L⁻¹ y 10 mg. L⁻¹ van de 75% a 120%, y de 80% a 115% por lo que se afirma que el valor para el porcentaje de recuperación de la muestra de extracto glicólico de Caléndula está en el rango establecido, concluyéndose que el método es exacto. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla N° 9: *Datos obtenidos del porcentaje de recuperación para la determinación del parámetro de exactitud.*

Muestra	Área	Concentración mg.L-1	Porcentaje de Recuperación
Muestra 01	25873	0.21	91.65
Muestra 01 + st	148004	0.65	
Muestra 02	18656	0.18	91.13
Muestra02 + st	140408	0.62	
Muestra 03	26977	0.21	94.34
Muestra 03 + st	154306	0.67	
		Promedio	92.37
		s	1.72
		%CV	1.86

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 10: Valores del parámetro de exactitud de acuerdo a la AOAC.⁽²⁹⁾

Concentración	Límite de Recuperación
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0.10%	90-108%
0.01%	85-110%
10 ug/g	80-115%
1 ug/g	75-120%
10 ug/kg	70-125%

1.5. CUANTIFICACION DE QUERCETINA EN EXTRACTO GLICOLICO DE *Calendula officinalis L.* (CALENDULA) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

Se determinó por HPLC la cantidad de quercetina en el extracto glicólico de *Calendula officinalis L.* (Caléndula), los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla N° 11, también en la Figura N° 20 podemos observar el cromatograma obtenido de estándar en rojo y la muestra en azul a un tiempo de retención de 4.7 minutos.

TABLA N° 11: Datos obtenidos para la cuantificación de quercetina en el extracto glicólico de *Calendula officinalis L.* (Caléndula).

Muestra	Área
1	26977
2	25873
3	26544
4	27011
5	27289
PROMEDIO	26738.80
s	552.52
%CV	2.07

Fuente: Elaboración propia

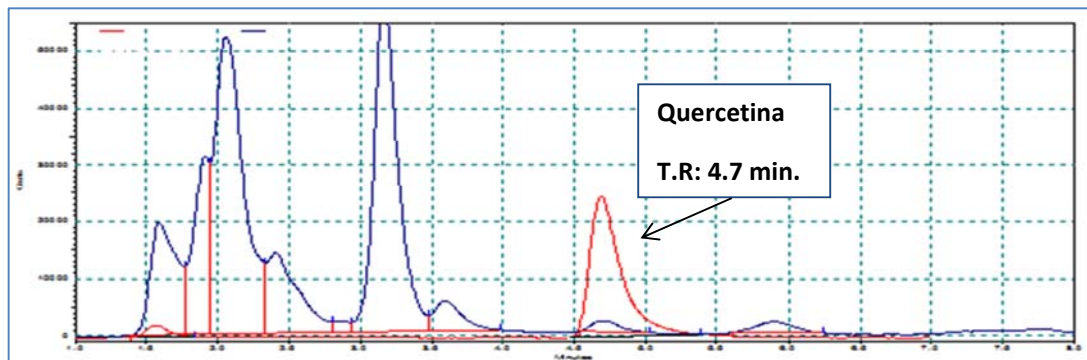


FIGURA N° 20: Cromatograma obtenido.

Para determinar la cantidad de quercetina en la muestra total de los pétalos de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) se procedió a realizar una serie de cálculos que se muestran a continuación:

a. Muestra diluida en 6 mL de fase móvil:

Promedio de áreas: 26738.8

Ecuación de la recta del parámetro de linealidad:

$$y = 276963x - 31455$$

Reemplazamos:

$$y = 276963(x) - 31455$$

$$26738.8 = 276963x - 31455$$

$$x = 0.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

b. Concentración de la muestra:

$$0.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \times 6 \text{ mL} = [x] \times 1 \text{ mL}$$

$$[x] = 1.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

c. Cuantificación de quercetina en 1 kilogramo de muestra:

$$1.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \times 0.3 \text{ L} = 0.378 \text{ mg}$$

$$0.378 \text{ mg} \rightarrow 60 \text{ g}$$

$$x \rightarrow 1000\text{g}$$

$$x = 6.3 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$$

De acuerdo a los cálculos obtenidos, se llega a la conclusión de que la cantidad de quercetina en los 60 gramos de pétalos de Caléndula es de 0.378 mg y la cantidad de quercetina por kilogramo de pétalos de Caléndula es de 6.3 mg.

2. ELABORACION DEL GEL.

Con el extracto glicólico obtenido se prosiguió a elaborar el gel de Caléndula tal como se describió en el capítulo II, se calculó las cantidades necesarias para preparar un lote de 100 gramos de gel al 5 y 10% (Figura 21) y un lote de 100 gramos de la base del gel. Al final, el preparado farmacéutico mostró ausencia de grumos y una buena homogeneidad, y otras características que se muestran en la Tabla N° 12:

TABLA N° 12: Características de los geles al 5 y 10% de extracto glicólico de Calendula officinalis L. (Caléndula).

CARACTERÍSTICA ORGANOLÉPTICA	RESULTADO
Aspecto externo	Uniforme
Color	Anaranjado característico
Olor	Característico al de la planta medicinal
Consistencia	Semisólido

Fuente: Elaboración propia.



FIGURA N° 21 Gel al 10 % de Calendula officinalis L. (Caléndula).

El valor del pH de la formulación desarrollada estuvo en el rango de 6-7, considerado aceptable para evitar el riesgo de irritación al aplicarlo sobre la piel. ^(36,50)

3. DETERMINACION DEL EFECTO CICATRIZANTE.

3.1.REALIZACION DE HERIDAS INCISAS Y APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS.

De acuerdo con el protocolo mencionado en el capítulo II, se procedió a realizar las incisiones en el lomo de los animales de experimentación, tal como se muestran en las Figuras N° 22, 23, 24, 25, 26, y 27. Durante el proceso no se tuvo ningún inconveniente.



FIGURA N° 22: Administración de Anestésico.



FIGURA N° 23: Rasurado de la zona



FIGURA N° 24: Trazado de la zona a incidir



FIGURA N° 25: Realización de heridas



FIGURA N° 26: Aplicación de tratamiento: gel de Calendula officinalis L. al 10%



FIGURA N° 27: Administración del tratamiento con el preparado comercial Cicatricure®.

3.2.PRUEBA TENSIOMETRICA.

Conforme a la continuidad del protocolo, se determinó la fuerza tensiométrica mediante los gramos de arena necesarios para abrir la herida como se muestra en la Figura N° 28.



FIGURA N° 28 Método tensiométrico a través de gramos de arena.

Todos los resultados de los grupos de tratamiento muestran los datos obtenidos producto de la pesada en gramos de arena necesarios para provocar la ruptura de la cicatriz en la herida incisa, luego su análisis estadístico mediante medidas estadísticas descriptivas ANOVA y Tukey.

A continuación se presenta los gramos de arena necesarios para lograr la ruptura de la herida de cada grupo evaluado.

GRUPO TRATADO CON GEL BASE.

Tabla N°13: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel base

N° de Animal	1	14	5	8	16	11	4	12
Resistencia en gramos	203.1	179.4	213.6	198.3	175.6	161.7	199.1	180.1

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 14: Estadísticos descriptivos de la resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel base.

GEL BASE		
VARIABLE	ESTADISTICO	VALOR
Gramos de arena del grupo tratado con gel base.	Conteo total	8
	Media	188.86
	Mediana	189.20
	Desviación estándar	17.27
	Varianza	298.36
	Mínimo	161.70
	Máximo	213.60
	Rango	51.90
	Percentil 25	176.55
	Percentil 50	189.20
	Percentil 75	202.10

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 14 el promedio de g de resistencia a la tensión en el grupo gel base es de 188.86 g, los g necesarios para provocar la ruptura de la herida se dispersa en promedio 17.27 g, el rango es de 51.9 g. En este caso, el gel base es el tratamiento placebo donde el carbopol forma una película que protege a la herida, mientras que el propilenglicol es un antiséptico que evita que ésta se infecte pudiendo alterar así el proceso de cicatrización.

La Figura N° 29 corresponde al gráfico de cajas, un gráfico que describe características importantes como la dispersión y simetría de los datos, también nos brinda información sobre los valores mínimo y máximo, los cuartiles y la existencia de valores atípicos. En el caso del grupo tratado con el gel base el 50% de las mediciones se encuentra sobre 189.20 g y el otro 50% se sitúa por debajo de este dato; el límite máximo del 25% de las mediciones fue de 176.55 g y el límite máximo del 75% de mediciones fue de 202.10 g.

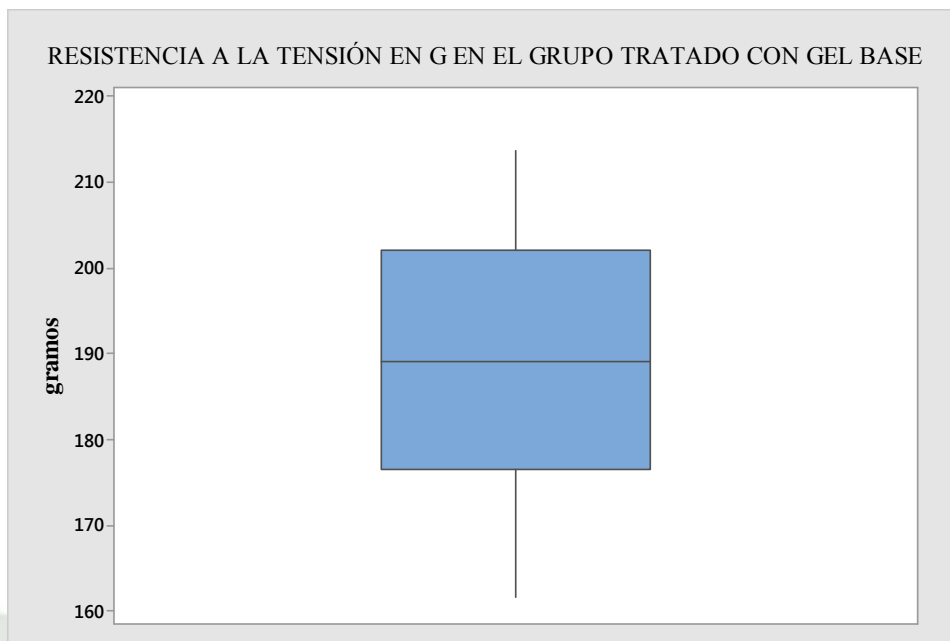


FIGURA N° 29: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel base.

GRUPO TRATADO CON GEL DE *Calendula officinalis* L. (CALENDULA) AL 5%.

Tabla N° 15: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel de *Calendula officinalis* L. (Caléndula) al 5%

N° de Animal	1	14	5	8	6	2	7	9
Resistencia en gramos	251.4	237.5	250.3	240.1	281.4	267.1	258.7	261.1

Fuente: Elaboración propia

En este caso la Tabla N° 16 presenta un valor de 255.95 g de arena para la media, valor muy superior respecto al grupo tratado con el gel base, la dispersión de los datos da un valor de 14.39 g de arena, mientras que la diferencia entre el valor máximo y mínimo – rango – es de 43.9 gramos.

TABLA N° 16: Estadísticos descriptivos de la resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) al 5%.

GEL DE <i>Calendula officinalis L.</i> AL 5%		
VARIABLE	ESTADISTICO	VALOR
Gramos de arena del grupo tratado con gel de extracto de <i>Calendula officinalis L.</i> al 5%	Conteo total	8
	Media	255.95
	Mediana	255.05
	Desviación estándar	14.39
	Varianza	207.19
	Mínimo	237.50
	Máximo	281.40
	Rango	43.90
	Percentil 25	242.65
	Percentil 50	255.05
	Percentil 75	265.60

Fuente: Elaboración propia

La Figura N° 30 correspondiente al gráfico de cajas, describe que para el caso del grupo tratado con el gel de *Calendula officinalis L.* al 5% el 50% de las mediciones se encuentra sobre 255.05 g mientras que el otro 50% está debajo de este dato; el 25% de los datos tienen un valor menor o igual a 242.65 g y el 75% de los datos tienen un valor menor o igual a 265.60 g.

El grupo tratado con el gel al 5% elaborado a base del extracto glicólico al 20% de *Calendula officinalis L.* requirió más gramos de arena en comparación con el grupo tratado con la base del gel (placebo) además de que el aspecto de las heridas tratadas con el gel de Caléndula al 5% era más aceptable en relación al aspecto de las heridas tratadas con la base del gel.

El tratamiento de las heridas conlleva a aliviar el dolor y permitir sin inconvenientes la reparación del tejido; cuando ocurre una lesión, muchos mediadores de la inflamación son liberados iniciándose así el proceso de cicatrización y sus tres etapas: inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

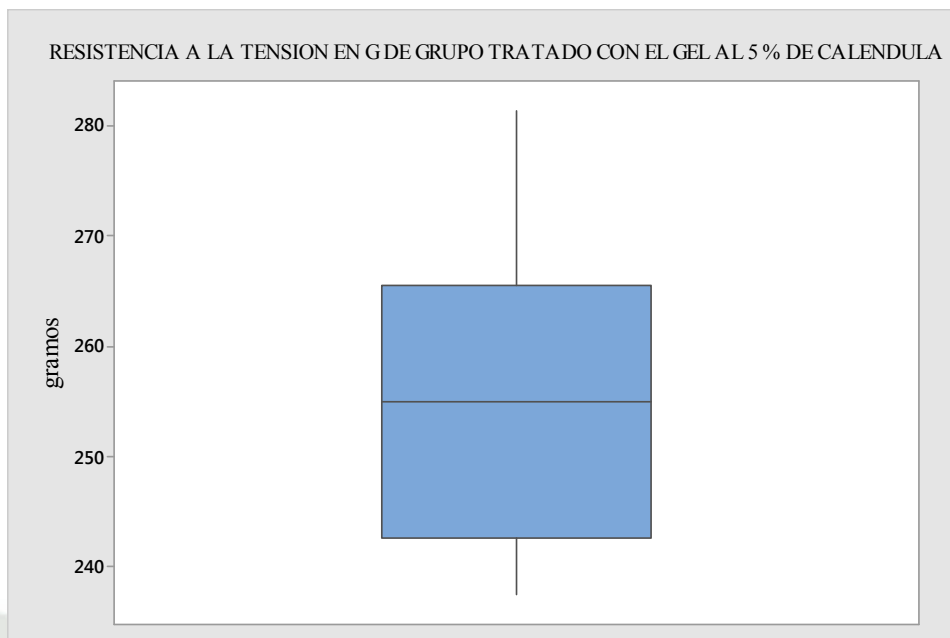


FIGURA N° 30: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con el gel al 5% de *Calendula officinalis L.*

Calendula officinalis L. posee dentro de su composición química una gran variedad de metabolitos secundarios que posiblemente junto con los flavonoides, y sobre todo con la quercetina originan sinergismo logrando así una cicatrización favorable para el individuo.

GRUPO TRATADO CON GEL DE *Calendula officinalis L.* (CALENDULA) AL 10%.

TABLA N°:17 Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) al 10%

N° de Animal	16	11	4	12	3	15	10	13
Resistencia en gramos	301.8	298.3	326.4	293.6	297.2	282.2	269.9	289.1

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 18: Estadísticos descriptivos de la resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con gel de *Calendula officinalis* L. (Caléndula) al 10%.

GEL DE EXTRACTO DE <i>Calendula officinalis</i> L. AL 10%		
VARIABLE	ESTADISTICO	VALOR
Gramos de arena del grupo tratado con gel de extracto de <i>Calendula officinalis</i> L. al 10%	Conteo total	8
	Media	294.81
	Mediana	295.40
	Desviación estándar	16.38
	Varianza	268.32
	Mínimo	269.90
	Máximo	326.40
	Rango	56.50
	Percentil 25	283.92
	Percentil 50	295.40
	Percentil 75	300.93

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 18 se observa que la media es de 294.81 g, un valor mucho mayor que la media del grupo tratado con el gel al 5% de Caléndula que fue de 255.95 g, lo que puede deberse que si se emplea más extracto de Caléndula los valores de los gramos de arena necesarios para abrir una herida procurada pueden mayores a éstos, pero se debe de tomar en cuenta el costo de elaboración del preparado farmacéutico, que demanda más cantidad de materia prima y de principio activo.

La dispersión de los datos es de 16.38 g, un dato más elevado que la desviación estándar del grupo tratado con el gel de Caléndula al 5% y que puede deberse a la respuesta fisiológica de cada animal de experimentación ante las incisiones provocadas. La diferencia entre el valor mínimo y máximo es de 56.5 g, lo cual indica que los datos están más dispersos en comparación con el rango de la base gel y del gel de Caléndula al 5%.

La Figura N° 31 nos muestra la gráfica que representa a los estadígrafos que describen que el valor mínimo es de 269.90 g y el valor máximo es de 326.40 g, el

50% de la mediciones se encuentra por encima de 295.40 y el otro 50% está por debajo de dicho valor, el 25% de los datos son menores o iguales a 283.92 g y el 75% de los datos son menores o iguales a 300.93 g.

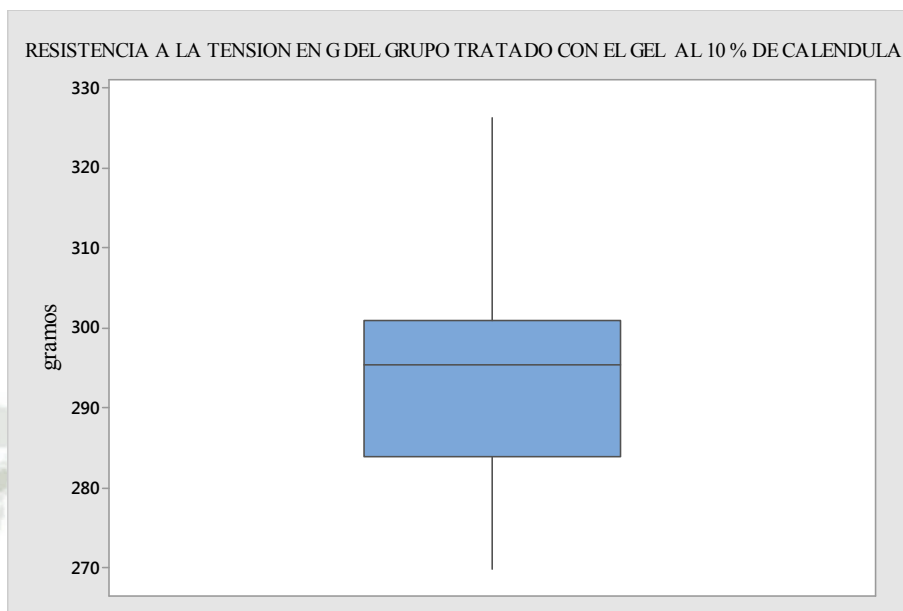


FIGURA N° 31: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con el gel al 10% de *Calendula officinalis L.*

**GRUPO TRATADO CON EL PREPARADO COMERCIAL
CICATRICURE®.**

TABLA N° 19: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con el preparado comercial *Cicatricure®*

N° de Animal	6	2	7	9	3	15	10	13
Resistencia en gramos	329.2	290.1	283.8	262.5	294.3	296.2	297.9	303.2

Fuente: Elaboración propia

La Tabla N° 20 indica que el grupo tratado con el preparado comercial *Cicatricure®* necesitó en promedio 294.65 g de arena para poder abrir las heridas producidas en los 8 animales de experimentación, un valor más elevado que el valor de las medias

de los grupo tratados con base gel y con el gel de *Calendula officinalis L.* al 5% pero un valor similar a la media del grupo tratado con el gel de *Calendula officinalis L.* al 10%. En cambio la desviación estándar para este grupo es de 18.72 g, el mayor valor en este estudio.

TABLA N° 20: Estadísticos descriptivos de la resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con el preparado comercial Cicatricure®.

PREPARADO COMERCIAL		
VARIABLE	ESTADISTICOS	VALOR
Gramos de arena del grupo tratado con preparado comercial.	Conteo total	8
	Media	294.65
	Mediana	295.25
	Desviación estándar	18.72
	Varianza	350.28
	Mínimo	295.25
	Máximo	329.20
	Rango	66.70
	Percentil 25	285.38
	Percentil 50	295.25
	Percentil 75	301.88

Fuente: Elaboración propia

Mostrando la gráfica de cajas en la Figura N° 32 el valor mínimo es de 295.25 g, el valor máximo es de 329.20 que en este caso viene a ser el valor atípico, es un dato que es distante del resto de los otros datos y que no se encuentra dentro del diagrama ya que si se toma en cuenta los resultados podrían ser engañosos. La dispersión de los datos tiene el mayor valor de todos los grupos y puede deberse al valor atípico ya descrito en este grupo. El producto comercial Cicatricure® está compuesto por extractos naturales que ayudan a activar el proceso de cicatrización y regeneración de la piel, tales como extracto de cebolla, nogal, tomillo, concha de nácar, manzanilla, sábila, centella asiática; además contiene aceite esencial de bergamota y vitamina K la cual es necesaria para la formación de coágulos sanguíneos que van a permitir que una herida deje de sangrar y cierre.

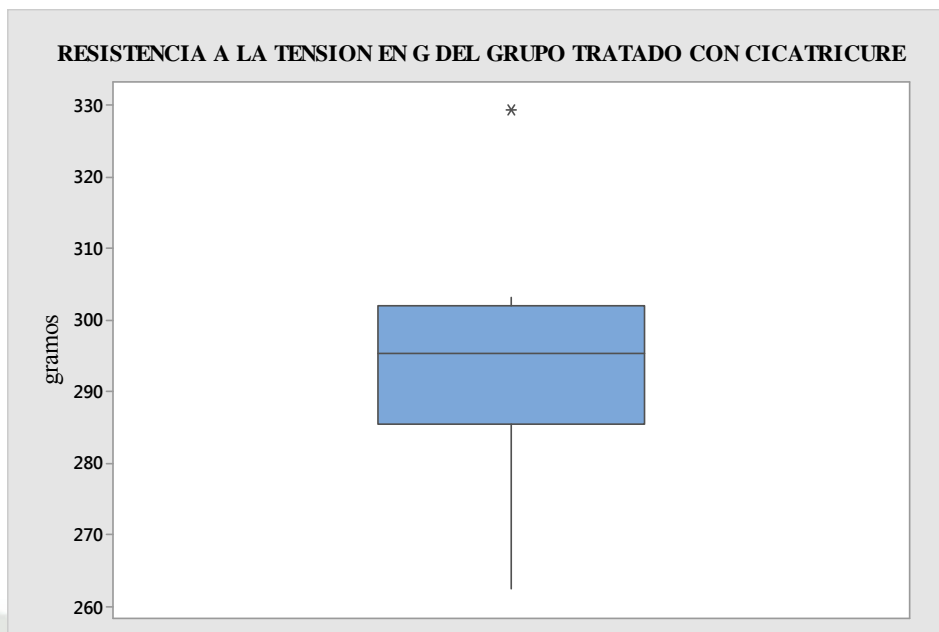


FIGURA N° 32: Resistencia a la tensión en gramos del grupo tratado con el preparado comercial Cicatricure®

A continuación se mostrará un resumen que aglutinan los resultados de cada grupo en conjunto:

TABLA N° 21: Estadísticos descriptivos de la resistencia a la tensión en g de todos los grupos de tratamiento.

VARIABLE	ESTADISTICO	VALORES			
		Gel Base	Gel al 5% de Caléndula	Gel al 10% de Caléndula	Preparado Comercial
Gramos de arena empleados para la fuerza tensil.	Conteo total	8	8	8	8
	Media	188.86	255.95	294.81	294.65
	Mediana	189.2	255.05	295.4	295.25
	Desviación estándar	17.27	14.39	16.38	18.72
	Varianza	298.36	207.19	268.32	350.28
	Mínimo	161.7	237.5	269.9	295.25
	Máximo	213.6	281.4	326.4	329.2
	Rango	51.9	43.9	56.5	66.7
	Percentil 25	176.55	242.65	283.92	285.38
	Percentil 50	189.20	255.05	295.40	295.25
	Percentil 75	202.10	265.60	300.93	301.88

Fuente: Elaboración propia

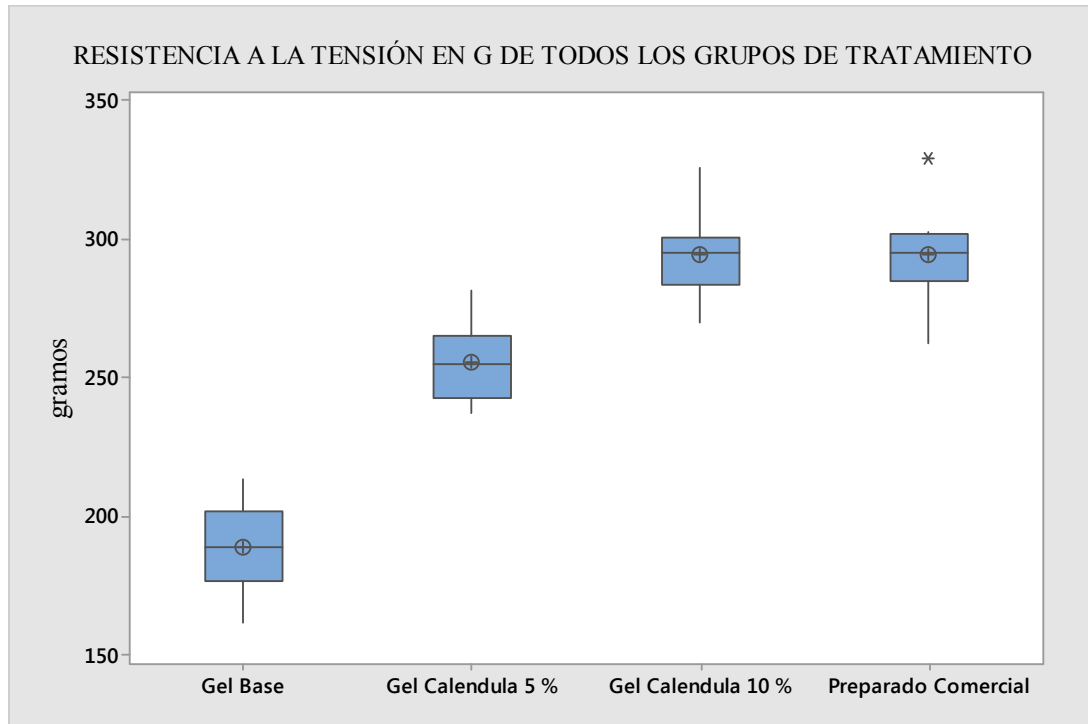


FIGURA N° 33: Resistencia a la tensión en gramos de todos los grupos de tratamiento.

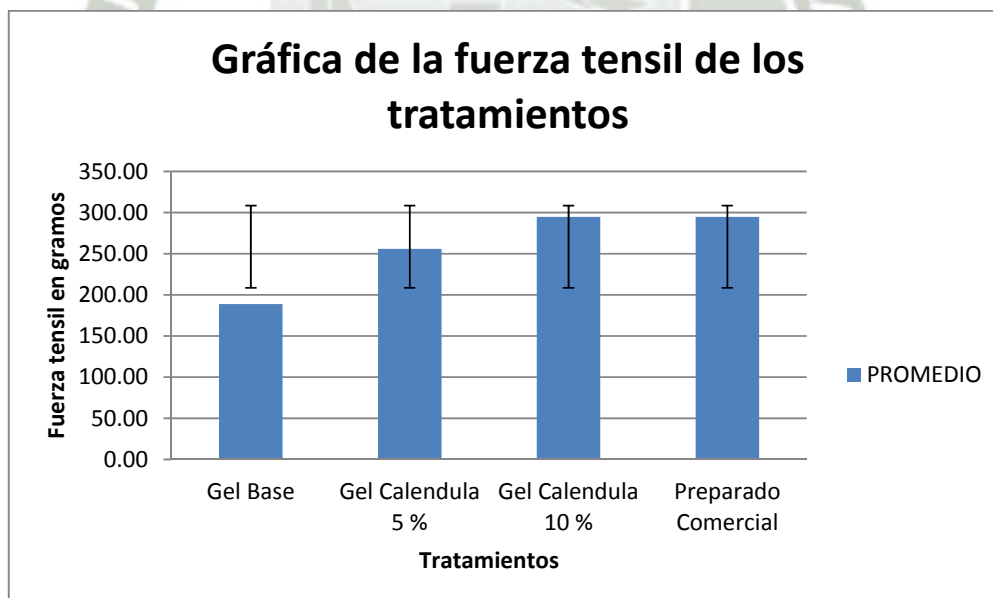


FIGURA N° 34: Fuerza tensil de los tratamientos con su error estándar.

3.3. ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA).

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. Si al realizar la prueba ANOVA se obtiene una significancia (probabilidad) baja, es decir, menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que quiere decir que todos los grupos evaluados tienen diferencia significativa.

Las Tablas N° 22 y N° 23 describen el resumen de los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza de un solo factor y notamos que los 4 grupos de estudio difieren entre sí, ya que el valor de la significancia es de $3.34907E-13$ y además es menor a 0.05, entonces se rechaza la hipótesis nula que asume que los grupos no difieren entre sí y se acepta la hipótesis estadística de investigación que supone que los grupos difieren entre sí (hipótesis alterna).

Del mismo modo el valor F es de 70.99, mayor al valor encontrado en la tabla de distribución a 4 y 31 grados libertad que es de 2.94 (valor crítico para F).

TABLA N° 22: Resumen de los datos de los tratamientos evaluados (ANOVA)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Gel Base	8	1510.90	188.86	298.36
Gel Caléndula 5%	8	2047.60	255.95	207.19
Gel Caléndula 10%	8	2358.50	294.81	268.32
Comercial	8	2357.20	294.65	350.28

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 23: Análisis de varianza de los tratamientos evaluados

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	59850.28	3	19950.09	70.99	3.34907E-13	2.95
Dentro de los grupos	7869.11	28	281.04			
Total	67719.39	31				

Fuente: Elaboración propia.

3.4. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY (HSD).

La prueba de Tukey sirve para probar todas las diferencias entre medias de grupos en una misma experiencia siempre y cuando el número de repeticiones sea constante en todos los grupos.

Se utilizó el programa Minitab versión 17 para realizar esta prueba obteniendo los siguientes resultados:

TABLA N° 24: Test de Tukey (Minitab versión 17)

COMPARACION DE TUKEY			
FACTOR	N	MEDIA	AGRUPACION
COMERCIAL	8	294.65	A
GEL CALENDULA 10%	8	294.81	A
GEL CALENDULA 5%	8	255.95	B
GEL BASE	8	188.86	C
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes			

Al aplicar el Test de Tukey (Tabla N° 24) para los distintos grupos experimentales observamos que existen diferencias significativas entre los grupos tratados con el gel base y con el gel de *Calendula officinalis L.* al 5% ya que sus medias difieren considerablemente; en cambio los grupos experimentales tratados con el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% y con el preparado comercial Cicatricure® no presentan diferencia significativa entre ellos y a su vez son significativamente diferentes con los dos grupos anteriores.

Por lo tanto se deduce que los tratamientos que involucran el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% y el preparado comercial Cicatricure® tiene una similar eficacia siendo las medias de ambos grupos casi iguales.

Anteriormente se presentaron trabajos en los que se evaluó el efecto cicatrizante de otras plantas tales como *Aloysia spathulata* conocida comúnmente como Chiqchilla y *Calceolaria lobata* con el nombre común de Borrágilla en los que se trabajó con las mismas condiciones que se realizaron en este trabajo, como el tamaño y profundidad del corte, la cantidad de dosis aplicada y los horarios de tratamiento.

Para la evaluación del efecto cicatrizante de *Aloysia spathulata* (Chiqchilla) las medias obtenidas al realizar la fuerza de tensión fueron 160.43 g para el grupo tratado con la base del gel, 239.71g para el grupo tratado con crema con extracto etanólico, 248.08g para el grupo tratado con crema con extracto con propilenglicol y el grupo tratado con el medicamento de referencia fue de 247.24g por lo que se concluyó que no se encontró diferencia significativa al 0.05 mediante pruebas de hipótesis entre los grupos tratados con las cremas con extracto etanólico y de propilenglicol y el grupo tratado con el preparado comercial denominado Mucovit®.⁽³⁰⁾

En el caso de *Calceolaria lobata* (Borrágilla) las medias obtenidas al realizar la fuerza tensil fueron 101.15 g para el grupo tratado con la base del gel, 191,35 g para el grupo tratado con el gel de *Calceolaria lobata* (Borrágilla) y 172.96 g para el grupo tratado con el preparado comercial Cicatricure®, por lo que se concluyó que no existen diferencias significativas entre el gel de *Calceolaria lobata* y el Cicatricure®, pero si estos difieren del grupo tratado con extracto con el gel base, es decir que el gel con extracto con propilenglicol de *Calceolaria lobata* muestra un efecto que favorece el proceso de cicatrización similar al Cicatricure®.⁽³⁶⁾

Comparando las medias de la fuerza tensil obtenidas en el presente trabajo nos damos cuenta que tiene valores mayores que las medias de los dos trabajos realizados anteriormente por lo que se concluye también que *Calendula officinalis L.*(Caléndula) es

mejor en cuanto a eficacia respecto al efecto cicatrizante que *Aloisia spathulata* (Chiqchilla) y *Calceolaria lobata* (Borragilla).





CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

CONCLUSIONES

1. El preparado farmacéutico (gel) elaborado a base del extracto glicólico de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) muestra un efecto positivo en el proceso de cicatrización de heridas en animales de experimentación de especie *Rattusnorvegicus*.
2. Se logró cuantificar la quercetina en el extracto glicólico de *Calendula officinalis L.* (Caléndula) por cromatografía líquida de alta resolución HPLC con una fase móvil (50:50) de metanol y agua, a una longitud de onda de 254 nm con una velocidad de flujo de 1 mL/min, obteniendo un tiempo de retención de 4.7 minutos y una cantidad de 6.3 mg .Kg⁻¹ de muestra, el método analítico propuesto fue lineal, preciso, exacto con un límite de detección de 0.054 mg.L-1 y un límite de cuantificación de 0.063 mg.L-1.

3. Se formuló un lote de 100 g de hidrogel conteniendo el 5% y el 10% de extracto glicólico al 20% de *Calendula officinalis L.* (Caléndula).
4. Al comparar los promedios de la fuerza tensil entre todos los grupos de tratamiento se determinó que el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% y el preparado comercial Cicatricure®, presentan la misma eficacia y que es mayor a la del gel base y a la del gel de *Calendula officinalis L.* al 5% ya que estos presentan promedios con valores menores. Al realizar la prueba de ANOVA y de Tukey se deduce que no existen diferencias significativas entre el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% (Caléndula) y el producto comercial Cicatricure® pero si hay diferencia significativa al 0.05 entre el grupo tratado con el gel base y el grupo tratado con el gel de *Calendula officinalis L.* al 5% (Caléndula) por lo que concluimos que el gel de *Calendula officinalis L.* al 10% es tan buen cicatrizante como el producto comercial Cicatricure® pudiendo ser una buena alternativa para el tratamiento de heridas.



SUGERENCIAS

1. Realizar estudios de control de calidad y estabilidad controlados a los geles con extracto de propilenglicol de *Calendula officinalis L.* (Caléndula).
2. Formular y evaluar un gel de *Calendula officinalis L.* asociado a otros extractos vegetales o principios activos con reconocidos estudios de eficacia sobre el proceso de cicatrización.



BIBLIOGRAFIA

1. LASTRA VALDEZ HUMBERTO; PIQUET GARCIA ROSARIO; “*Calendula officinalis L.*”; Revista Cubana de Farmacia 1999; 33(3): 188-94.
2. PERALTA LOPEZ, KATISSA CONSUELO; “EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LA *Calendula officinalis L.* CALENDULA SOBRE *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*” Tesis del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa 2005.
3. PROVITAL GROUP; “*Calendula*”; Eco; V 02-11/11
4. BP, MULEY; SS, KHADABADI; NB, BANARASE; “Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae)”; A review; Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2009; 8(5); 455-465.
5. CARTAYA O., REINALDO I.; “Flavonoides: Características químicas y aplicaciones”; Cultivos Tropicales, 2001, vol. 22, no. 2, p. 5-14.
6. MARTINEZ, ALEJANDRO; Flavonoides; 2005; disponible en: farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001, consultado en Marzo 2014.
7. BRUNETON J.; Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª Edición. 2001, pág.: 306-349.
8. KUKLLINSKI C.: “Farmacognosia, Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural”, 1ª Edición, 2000.pag: 33-109.

9. QUERCETIN, disponible en http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280343&loc=ec_rcs, consultado en Marzo 2014.
10. FLAVONOLES, disponible en www.es.calameo.com/read/00175228104e8b13035f6, consultado en Mayo 2014.
11. KOO HUI MIEAN y SUHAILA NOHAMED; “Flavonoid (Myceretin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of edible Tropical Plants”; Faculty of Food Science and Biotechnology, University Putra Malaysia, 43400 Serdang Selangor, Malaysia.
12. CH. R. PHANI, CH. VINAYKUMAR, K. UMAMAHESWARA RAO AND G.SINDHUJA; “Quantitative Analysis of Quercetin in Natural Sources by RP-HPLC”; International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. Vol. 1 (1) Jul – Sep 2010; 19-22.
13. QUATTROCCHI OA; ABELARIA SI; LABA EF. Introducción a la HPLC aplicación y practica; primera edición, 1992.
14. HPLC, http://mundorespuestas.blogspot.com/2013_07_01_archive.html, consultado en Mayo 2014.
15. VILA JATO JOSÉ LUIS; Tecnología Farmacéutica. 1ª Edición 2001.
16. BIOLOGIA DE LA PIEL, disponible en: www.med.unne.edu.ar/catedras/dermato/clases/00109.pdf, consultado en Marzo 2014.
17. LIGTH DOUGLAS; “Cells, tissues, and skin”. 1ª Edition. 2004. Editorial Chelsea House.

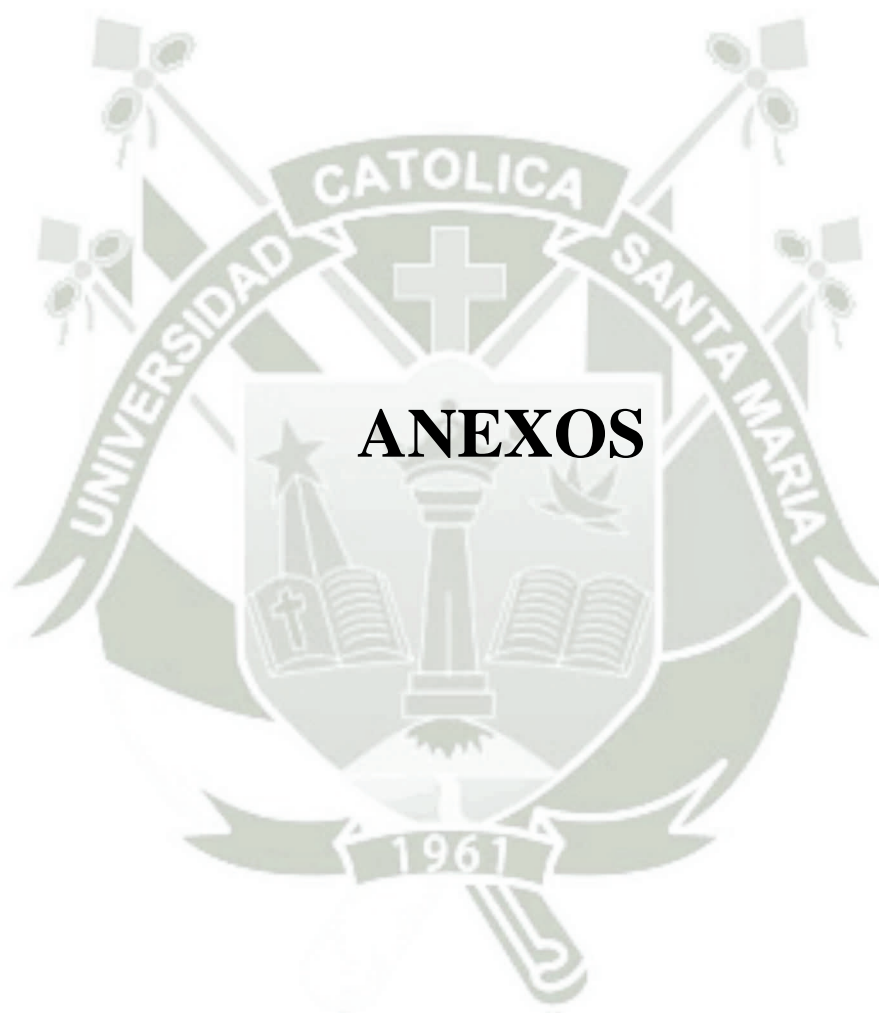
18. MERINO PEREZ, JESUS; NORIEGA BORGE, MARIA JOSE; La Piel: Estructura y Funciones, disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2011-Bloque%20II-La%20Piel.%20Estructura%20y%20Funciones.pdf>; consultado en Marzo 2014.
19. RAMIREZ HERNANDEZ, GERMAN ALFREDO; “Physiology of cutaneous cicatrization”; Revista Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana Vol. 2 Nro. 2 - 2010: 69-78.
20. SALEM Z. C.; PÉREZ P JUAN ANTONIO, HENNING L ENRIQUE, Y COMPAÑIA; “Heridas: Conceptos generales”; Artículo docente, Cuad. Cir. 2000; 14: 90-99.
21. CORNEJO LOLA, FERNANDEZ PEDRO, CORNEJO JULIAN, “Manual de Dermatología” pag 561-568.
22. BRUNICARDI CHARLES, “Schwartz Principios de Cirugía”, 8ª Edición. 2005. Editorial McGraw Hill.
23. GARCIA Z. TEONILA, ROCA O. JOHANA; “Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante”; Revista de la facultad de Ingeniería Industrial UNMSM, 2008 Vol 11 (2) 24-32.
24. CORNEJO RODRIGUEZ, CHRISTIAN PAUL, PINTO ARRIETA, ANA CECILIA; “Efecto cicatrizante de un gel a base de Gamochaeta americana (*Cketo-Cketo*) en animales de experimentación”; Tesis del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa -2011
25. FERNÁNDEZ SERRET A., AGUILERA CABRERA Y., MORALES LACARRERE I., ALONSOJIMÉNEZ E.; “Validación de los Métodos Analíticos

- Para la Identificación y Cuantificación del Dextrometorfano Jarabe”; Revista Cubana de Farmacia, 2002;36(1):28-34.
26. ALZATEROS ALBA; “Validación de Método Analíticos”; consultado en:
1 de 83 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS disponible en:
www.who.int/medicines/publications/pharmprep/en; consultado en Abril 2014.
27. MORENO R. CARMEN A., PLAZAS B. CLAUDIA E; “Validación de una Metodología Analítica para la Cuantificación por HPLC de Quercetina en una Matriz Vegetal”; Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas, Vol 34 N° 1, 2005: 58-68.
28. RANJIT SINGH; “HPLC Method development and validation – an overview”; J. Pharm Educ Res Vol. 4 Issue N° 1, 2013.
29. AOAC “Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals”; 2002, disponible en:http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf; consultado en Abril 2014.
30. LAZO B. FERNANDA, HUAMAN J. ELIZABETH; “Evaluación del efecto cicatrizante de los extractos (fluido y glicólico) y la crema de *Aloysia spathulata* (Chiqchilla) en heridas incisas inducidas en animales de experimentación”, Tesis del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa-2012.
31. TERRANCE HAWK C., LEARY S; “Formulary for laboratory animals” pag 18-19.
32. DNYANESHWAR D. KOKANE, RAHUL Y. MORE, MANDAR B. KALE, MINAKSHI N. NEHETE, PRACHI C. MEHENDALE, CHHAYA H. GADGOLI;

- “Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*”; Journal of Ethnopharmacology 124 (2009) 311–315.
33. MITHUN VISHWANATH K PATIL, AMIT D KANDHARE, SUCHETA D BHISE; “Pharmacological evaluation of ethanolic extract of *Daucuscarota* Linn root formulated cream on wound healing using excision and incision wound model”; Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012) S646-S655.
34. SANTRAM LODHI, SINGHAI AK; “Preliminary pharmacological evaluation of *Martynia annua* Linn leaves for wound healing”; Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2011) 421-427.
35. YOGESH SHIVHARE, PRADEEP K. SINGOUR, U.K. PATIL, R.S. PAWAR; “Wound healing potential of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb (fruits) in rats”; Journal of Ethnopharmacology 127 (2010) 614–619.
36. FLORES O. MARÍA DEL PILAR, MANRIQUE R., SARA; “Evaluación del efecto cicatrizante del extracto y gel de *Calceolaria lobata* (BORRAGILLA) en animales de experimentación”; Tesis del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa 2009.
37. GOMATHI K., GOPINATH D., RAFIUDDIN AHMED, JAYAKUMAR R.; “Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat”; Biomaterials 24 (2003) 2767-2772.
38. MANIVANNAN, RAJAMANICKAM, PRABAKARAN KALAIVANAN, ILAYARAJA SIVAGNANAM; “Antibacterial and Wound Healing Activities of Quercetin-3-O-A-L-Rhamnopyranosyl-(1 • 6)- β -D-Glucopyranoside Isolated from *Salvia leucantha*”; Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 22(1), 2013; 48, 264-268.

39. KARINA FERNANDA REDROBÁN VARGAS; “Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de Berro (*Nasturtiumofficinale*) y Llantén (*Plantagomajor*) en ratones *Mus musculus*”; Tesis de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba – Ecuador, 2012.
40. DONGSHENG FAN, XIN ZHOU, CHAO ZHAO, HUAGUO CHEN, YANG ZHAO, XIAOJIAN GONG; “Anti.inflammatory, antivial and quantitativestudy of quercetin-3-O-β-D-glucoronide in *Polygonumperfoliatum L.*”; Fitoterapia 82 (2011) 805-810.
41. HUBER, UDO; “Analysis of Quercetin and Kaempferol in Gingko extract and tablets (*Gingko biloba*) by HPLC; Pharmaceutical”, ----
42. MOTHIBEDI KEDIEMETSE, MOKGADI JANES, TORTO NELSON; “Determiration of flavonoids in Ginkgo biloba using bond plexa solid phase extraction sorbent for cleanup and HPLC-DAD- analysis”; Dietary Supplemet, 2011.
43. DIAZ CLAUDIA, HEINZEN HORACIO; “Variaciones en el Perfil de Flavonoides y en la cantidad de Quercetina libre en diferentes extractos de *Achyroclinesatureoides*”; Acta Farm. Bonaerense 2006 25 (4) 574-7.
44. GEVRENONA RENETA; “Determiration of natural colorants in plant extracts by high-performance liquid chromatography”; Journal of the Serbian Chemical Society 75 (7) 903-915 (2010).
45. PEMP E., REZNICEK G., KRENN L.; “Fast quantification of flavonoids in *Filipendulaeulmariaeflos* by HPLC/ESI-MS using a nonporous stationary phase”; Journal of Analytical Chemistry, 2007, Vol 62, N° 7, 669-673.

46. LOMBARD KEVIN A., GEOFFRIAU EMMANUEL, PEFFLEY ELLEN; “Flavonoid quantification in onion by spectrophotometric and HPLC analysis”; Hort Science 37 (4) 682-685. 2002.
47. BHARTI JAIN, RASHMI RAGHUVANSHI; “Quantitative analysis of Quercetin in *Puerariatuberosa* by using HPLC”; Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, Vol 2, N° 4, 2012, 1688-1692.
48. CH. R. S. PHANI, CH. VINAYKUMAR, K. UMAMAHESWARA RAO, G. SINDHUJA; “Quantitative analysis of Quercetin in natural sources by RP-HPLC”; International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences; Vol 1 (1) 2010, 19-22.
49. FILGUEIRA MARCELO R; “Cromatografía líquida bi-dimensional. Aplicación a la separación de mezclas complejas”; Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata; Argentina, 2012.
50. DOAA A. HELAL, DALIA ABD EL-RHMAN, SALLY A. ABDEL-HALIM, MOHAMED A. EL-NABARAWI; “Formulation and evaluation of fluconazole topical gel”; International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences; Vol 4, Suppl 5, 2012.
51. ROWE R.; SHESKEY P. & OWEN S., “Handbook of Pharmaceutical Excipients”. 5ª Edición. 2006. Pharmaceutical Press.



EXCIPIENTES UTILIZADOS EN LA FORMULACIÓN. ⁽⁵¹⁾

CARBÓMERO

a. Nombre genérico

Formulario Británico, Farmacopea Europea, Formulario Nacional y Farmacopea de los Estados Unidos: Carbomer

b. Sinónimos

Acrytamer, Polímero del ácido acrílico, Carbopol, carboxivinil polímero, Ultrez, Ácido poliacrílico, Pemulen.

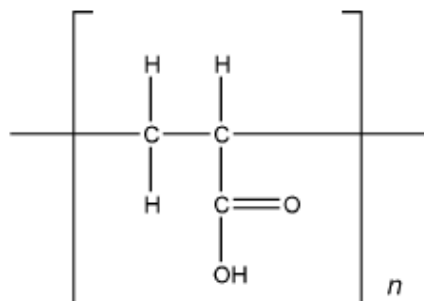
c. Nombre químico y número de registro CAS:

Carbomer [9003-01-4]

Los carbómeros 910, 934, 934P, 940, 941, 971P y las resinas del 974P comparten el número CAS [9003-01-4] común. Carbomer 1342 es un copolímero y tiene a un CAS diferente.

d. Fórmula empírica y peso molecular

Los carbómeros son polímeros de alto peso molecular del ácido acrílico unidos con alilsucrosa o alil éteres del pentaeritrol, contienen entre 56 a 68% de grupos de ácidos carboxílicos (COOH), calculado como base seca, existen diferentes tipos de carbómeros éstos clasificados según su peso molecular aproximado, el cual también variará su viscosidad en medio acuoso.

e. Fórmula estructural

Los polímeros de carbómero están formados por unidades repetidas del ácido acrílico – la que se muestra arriba – las cadenas del polímero forma enlaces cruzados con sucrosa o pentaeritrol de alilo.

f. Categoría funcional

Agente emulsificante, agente para suspensiones, agente ligante para tabletas, agente incrementador de la viscosidad.

g. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.

Los carbómeros son usados en la formulación de líquidos y semisólidos es usado en la formulación de cremas, geles y pomadas y puede ser usado en preparaciones oftálmicas tópicas y rectales.

Algunos grados de carbómeros con bajo contenido de benceno residual como carbómero 934P o 974P pueden ser usados en formulaciones de administración oral (suspensiones, tabletas o formulaciones de tabletas de liberación prolongada), en formulaciones de tabletas los carbómeros pueden ser usados como ligante en el proceso de compresión directa o granulación húmeda (aquí el agua es usada como líquido granulante).

Los carbómeros son usados como emulsificantes en la preparación de emulsiones aceite /agua para uso externo. Para este propósito, el carbómero es neutralizado parcialmente

con hidróxido de sodio y con una amina de cadena larga como estearilamina, también son usados en cosméticos.

h. Descripción

Polvo blanco, de aspecto esponjoso, ácido, higroscópico con un leve olor a característico.

i. Propiedades físicas

- *Acidez alcalinidad:*
 - 2,7-3,5 para dispersión acuosa al 0.5% p/v
 - 2,5-3,0 para dispersión acuosa al 1% p/v
- *Punto de fusión:* 260°C.
- *Contenido de humedad:* El contenido de humedad normal es superior al 2% p/p, sin embargo, los carbómeros son higroscópicos y el típico equilibrio de humedad a 25°C y 50% de humedad relativa ambiental es 10%; el contenido de humedad no afecta su acción y eficiencia, pero en incremento del porcentaje de humedad dificulta mucho su manipulación y es más difícil de dispersar.
- *Distribución del tamaño de partícula:* El tamaño de partícula promedio es 2 a 7 μm .
- *Solubilidad:* Soluble en agua y después de ser neutralizado en etanol 95% y glicerina.
- *Gravedad específica:* 1,41g/ml
- *Viscosidad (dinámica):* Carbomer disperso en agua forma soluciones coloidales ácidas con poca viscosidad, la cual es incrementada enormemente cuando es neutralizada. El carbomer polvo debe ser dispersado en agua con agitación vigorosa, teniendo cuidado con la formación de grupos no dispersables, luego

debe ser neutralizado con adición de una base, los agentes que pueden ser usados para la neutralización del carbomer incluyen: aminoácidos, bórax, hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, aminas orgánicas polares como trietanolamina y lauril o estearil aminas los cuales son usados como agentes gelificantes en sistemas no polares.

Durante la preparación del gel la solución debe ser agitada suavemente para evitar la inclusión de burbujas de aires. Los geles acuosos de carbomer neutralizados son mas viscosos a pH 6 a 11, la viscosidad se ve reducida considerablemente a menos de pH 3 y a mas de pH 12, la viscosidad también se ve reducida en presencia de electrolitos fuertes, el gel pierde rápidamente su viscosidad cuando es expuesto a la luz, pero esto es solucionado con la adición de algún antioxidante.

j. Estabilidad

Los carbómeros son estables, es un material higroscópico puede ser calentado a temperaturas menores a 104°C por dos horas sin que se afecte su eficiencia espesante, sin embargo la exposición a excesivas temperaturas pueden resultar en decoloración y reducir su estabilidad, la completa descomposición ocurre a 260°C por 30 minutos.

Los polvos secos de carbomer no promueven el crecimiento de hongos y levaduras, sin embargo los microorganismos crecen bien en dispersiones acuosas de carbomer sin preservantes, algunos preservantes pueden añadirse como clorocresol 0,1% p/v, metilparabeno 0,1% p/v o timerosal 0,1% p/v, también se añaden otros conservadores como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, y benzoato de sodio; concentraciones altas de conservadores en general pueden causar la disminución de la viscosidad, geles acuosos pueden esterilizarse por autoclavado.

A temperatura ambiente, las dispersiones de carbomer mantienen su viscosidad durante el almacenado por prolongados periodos, de la misma forma la viscosidad se mantiene o se ve ligeramente disminuida a elevadas temperaturas ambientales, si hay un

antioxidante en la formulación y si la formulación está protegida de la luz. La exposición a la luz causa oxidación la cual se ve reflejada en la disminución de la viscosidad, sin embargo la sensibilidad a la luz puede ser mejorada con la adición de 0,05 a 0,1% de algún protector UV soluble en agua como 2-benzofenona o 4-benzofenona en combinación de 0,05 a 0,1% de EDTA. La estabilidad a los rayos UV en los geles puede ser mejorada en los geles con el uso de trietanolamina como base neutralizante.

k. Incompatibilidades

Los carbómeros decoloran el resorcinol y son incompatibles con fenol, polímeros catiónicos, ácidos fuertes y por altas concentraciones de electrolitos, trazas de hierro y otros metales de transición pueden degradar catalíticamente dispersiones de carbomer. Calor intenso puede ser generado si el carbomer está en contacto con materiales fuertemente básicos como amoníaco, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio o aminas fuertemente básicas.

l. Método de manufactura

Carbómeros son polímeros sintéticos de alto peso molecular del ácido acrílico copolimerizados con aproximadamente 0,75-2% w/w de alilsucrosa, el solvente usado para la polimerización es normalmente benceno, sin embargo algunos nuevos grados de carbomer comercializados son manufacturados usando acetato de etilo o una mezcla de ciclohexano/ acetato de etilo como solvente.

m. Seguridad

Los carbómeros son usados ampliamente en formulaciones no parenterales, particularmente líquidos tópicos y preparaciones semisólidas, algunos carbómeros pueden ser utilizados en formulaciones pero de ciertos tipos y con bajo contenido de benceno; no hay evidencia de hipersensibilidad o de reacciones alérgicas para

formulaciones tópicas en humanos (DL_{50} oral en ratas de carbomer 910 es de 10,25 g/kg).

n. Categoría regulatoria

Incluidos en la lista de ingredientes inactivos por la FDA (suspensiones orales y tabletas, preparaciones rectales, oftálmicas y tópicas) autorizada como excipiente no parenteral en el Reino Unido

METILPARABENO

a. Nombre genérico

- BP: Metil hidroxibenzoato
- JP: Metil parahidroxibenzoato
- PhEur: Methilsparahidroxibenzoas
- USPNF: Methilparabeno

b. Sinónimos

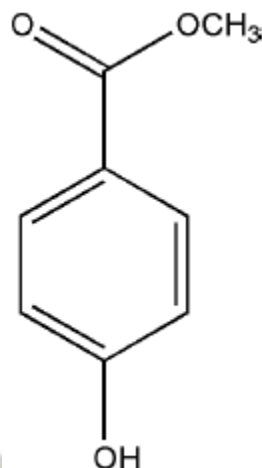
E218; ácido 4-hidroxibenzoico metil ester; metil p-hidroxibenzoato; *Nipagin M*; *Uniphen P-23*.

c. Nombre químico y número de registro CAS:

Metil-4-hidroxibenzoato [99-76-3]

d. Fórmula empírica y peso molecular

$C_8H_8O_3$ 152.15

e. Fórmula estructural**f. Categoría funcional**

Preservante antimicrobiano.

g. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.

Metilparabeno es ampliamente usado como un preservante antimicrobiano en cosméticos, productos alimenticios, y formulaciones farmacéuticas; ya sea solo o en combinación con otros parabenos o con otros agentes antimicrobianos. En cosméticos, el metilparabeno es el mayor agente antimicrobiano utilizado. Los parabenos son efectivos sobre un amplio margen de pH y tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque es más efectivo contra levaduras y hongos.

La eficacia preservante es mejorada por la adición de propilenglicol (2--5%), o usando parabenos en combinación con otros agentes antimicrobianos.

A causa de la solubilidad pobre de los parabenos, sus sales (en particular la sal sódica) son más seguidas usadas en formulaciones. El metilparabeno (0.18%) conjuntamente con propilparabeno (0.02%) ha servido para la preservación de diversas formulaciones

farmacéuticas parenterales. El rango de pH donde es estable el metilparabeno es de 4 a 8.

h. Descripción

En forma de cristales incoloros o un polvo cristalino blanco. Es inodoro o casi inodoro y tiene un sabor leve a quemado.

i. Propiedades físicas

- *Punto de fusión:* 125-128°C.
- *Constante de disociación:* $pK_a = 8,4$ a 22°C.
- *Solubilidad:* Soluble en agua (1 en 400 a 25°C), propilenglicol (1 en 5 a 25°C); etanol (1 en 2 a 25°C); glicerina (1 en 60 a 25°C)
- *Gravedad específica:* 1,352 g/cm³

j. Incompatibilidades

Similares al propilparabeno, presenta incompatibilidad con polisorbato 80, la cual se ve disminuida con la adición de 10% de propilenglicol para evitar micelización. Se ha reportado incompatibilidades con bentonita, trisilicato de magnesio, talco, goma tragacanto, alginato de sodio, aceites esenciales, sorbitol y atropina, se recomienda el uso de polietileno de alta densidad en los envases que sirvan para contener formulaciones que contengan metilparabeno, el rango de pH donde es estable metilparabeno es de 4-8.

k. Método de manufactura

Metilparabeno es preparado por esterificación del ácido p-hidroxibenzoico con metanol.

I. Seguridad

Prácticamente no es tóxico, no es irritante de la piel (DL₅₀ ratón 8g/kg).

PROPILPARABENO

a. Nombre genérico

- BP: Propilhidroxibenzoato
- JP: Propilparahidroxibenzoato
- PhEur: Propilisparahidroxibenzoas
- USPNF: Propilparabeno

b. Sinónimos

E216; Ácido 4-hidroxibenzoico propil éster; Nipasol M; propagin; propil p-hidroxibenzoato; *Propilparasept*; *Solbrol P*; *Uniphen P-23*.

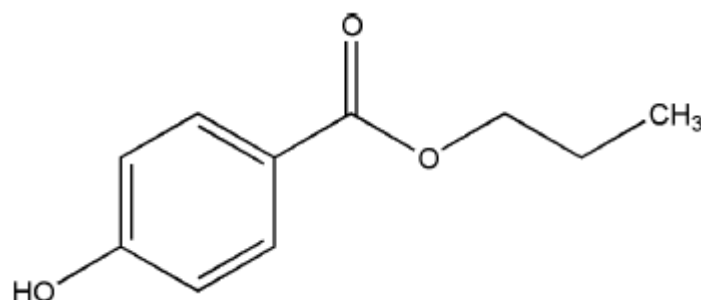
c. Nombre químico y número de registro CAS:

Propil 4-hidroxibenzoato [94-13-3]

d. Fórmula empírica y peso molecular

C₁₀H₁₂O₃ 180.20

e. Fórmula estructural

**f. Categoría funcional**

Preservante antimicrobiano.

g. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.

Propilparabeno al igual que metilparabeno es ampliamente usado como un preservante antimicrobiano en cosméticos, productos alimenticios, y formulaciones farmacéuticas; ya sea solo o en combinación con otros parabenos o con otros agentes antimicrobianos. En cosméticos, el metilparabeno es el mayor agente antimicrobiano utilizado. Los parabenos son efectivos sobre un amplio margen de pH y tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque es más efectivo contra levaduras y hongos.

A causa de la solubilidad pobre de los parabenos, sus sales (en particular la sal sódica) son más seguidas usadas en formulaciones. El metilparabeno (0.18%) conjuntamente con propilparabeno (0.02%) ha servido para la preservación de diversas formulaciones farmacéuticas parenterales.

h. Descripción

En forma de polvo blanco, cristalino, inodoro e insípido.

i. Propiedades físicas

- *Punto de fusión:* 295°C.
- *Constante de disociación:* $pK_a = 8,4$ a 22°C.
- *Solubilidad:* Soluble en agua (1 en 2500 a 20°C), propilenglicol (1 en 3,9 a 20°C); etanol 95° (1 en 1,1 a 20°C); glicerina (1 en 250 a 20°C)
- *Gravedad específica:* 1,288 g/cm³

j. Incompatibilidades

La actividad antimicrobiana de propilparabeno se ve considerablemente reducida en presencia de surfactantes no iónicos como resultado de la miscelización, la absorción de propilparabeno por los plásticos ha sido reportada, la cual es dependiente del tipo de plástico del envase y de los vehículos. El silicato de magnesio y aluminio, trisilicato de magnesio, óxido de hierro amarillo y azul ultramarino también han sido reportados como absorbentes de propilparabeno reduciendo su eficacia. Propilparabeno es degradado en presencia de hierro y es sujeto a hidrólisis por bases débiles y ácidos fuertes. Es estable a pH 3-6 y puede ser autoclavado, las soluciones a este pH son estables hasta por 4 años a temperatura ambiente, a un pH de 8 es rápidamente hidrolizado en aproximadamente 60 días a temperatura ambiente.

k. Método de manufactura

Propilparabeno es preparado por esterificación del ácido p-hidroxibenzoico con n-propanol.

l. Seguridad

Material no tóxico, no es irritante de la piel (DL₅₀ ratón 9g/kg).

PROPILENGLICOL

a. Nombre genérico

- BP: Propilenglicol
- JP: Propilenglicol
- PhEur: Propylenglyolum
- USP: Propilenglicol

b. Sinónimos

1,2-dihidroxiopropano, 2-hidroxiopropanol, metilenglicol, propanol 1,2-diol, metiletilenglicol.

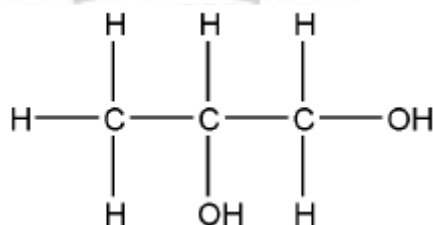
c. Nombre químico y número de registro CAS:

1,2-Propanodiol [57-55-6]

d. Fórmula empírica y peso molecular

$C_3H_8O_2$ 76.09

e. Fórmula estructural



f. Categoría funcional

Preservante antimicrobiano, desinfectante, humectante, plastificante, solvente, estabilizante de vitaminas, codisolvente miscible en agua.

g. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.

Propilenglicol es comúnmente usado como solvente, líquido extractante y preservante en una variedad de formulaciones parenterales y no parenterales. En general es mejor solvente que la glicerina y disuelve una gran variedad de materiales como corticosteroides, fenoles, sulfas, barbitúricos, vitamina A y D, la mayoría de los alcaloides y muchos anestésicos locales. Es un antiséptico semejante al etanol, también es usado en cosméticos y en industria alimentaria como transporte de emulsificantes y como vehículo de esencias teniendo como ventaja sobre el etanol que su falta de volatilidad produce un sabor más uniforme.

h. Descripción

Líquido claro viscoso, inodoro.

i. Propiedades físicas

- *Punto de ebullición:* 188°C.
- *Punto de fusión:* -59°C
- *Solubilidad:* miscible con agua, cloroformo, etanol y glicerina. No es soluble en aceite mineral u otros aceites, pero puede disolver aceites esenciales.
- *Densidad:* 1,038 g/cm³ a 20°C

j. Incompatibilidades

Propilenglicol es incompatible con agentes oxidantes como permanganato de potasio.

k. Método de manufactura

El propileno es convertido a clorhidrina por agua clorada e hidrolizado a 1,2-óxido de propileno. Con más hidrólisis el 1,2-óxido de propileno es convertido a propilenglicol.

l. Seguridad

Este ingrediente se utiliza en alimentos y en formulaciones farmacéuticas, es considerado como material no tóxico (DL_{50} por vía oral en ratas 21-33g/kg).

TRIETANOLAMINA**a. Nombre genérico**

- BP: Triethanolamine
- PhEur: Trolaminum
- USPNF: Trolamine

b. Sinónimos

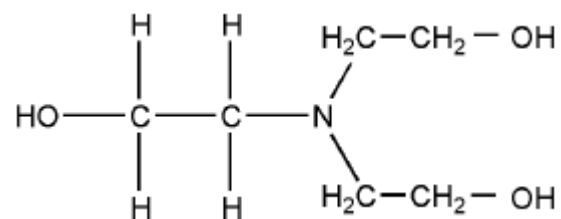
TEA; *Tealan*; trietilolamina; trihidroxitrietilamina; tris (hidroxietil)amina.

c. Nombre químico y número de registro CAS:

2,2',2''-Nitrilotrietanol [102-71-6]

d. Fórmula empírica y peso molecular

$C_6H_{15}NO_3$ 149.19

e. Fórmula estructural**f. Categoría funcional**

Agente alcalinizante y emulsificante.

g. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.

Ampliamente usado en formulaciones farmacéuticas tópicas para la formación de emulsiones, cuando es mezclado en proporciones equimoleculares con ácidos grasos como esteárico u oleico, trietanolamina forma jabones aniónicos los cuales son usados como agentes emulsificantes para producir partículas finas y estables en emulsiones aceite/agua con un pH alrededor de 8. Los jabones de trietanolamina producen emulsiones más estables que las producidas con un jabón alcalino, sin embargo, ambos se descomponen en presencia de ácidos y altas concentraciones de sales ionizadas.

Las concentraciones que se usan típicamente para la emulsificación de aceites fijos es 2-4% y 2 a 5 veces la cantidad de ácido graso, para aceites minerales la cantidad de trietanolamina debe ser incrementada en un 5% con el apropiado incremento del ácido graso usado. Las preparaciones que contienen jabones de trietanolamina tienden a oscurecerse cuando están almacenadas. Sin embargo, la coloración puede reducirse cuidando de no ser expuesto el producto a la luz y evitando el contacto del mismo con metales e iones metálicos. También es utilizada en la formación de sales para inyecciones, en preparaciones analgésicas tópicas. Otros usos generales son como agente tampón, solvente, plastificante de polímeros y humectante.

h. Descripción

Líquido ligeramente amarillento, viscoso, olor amoniacal poco pronunciado.

i. Propiedades físicas

- *Acidez/alcalinidad:* pH=10.5
- *Punto de ebullición:* 335°C.
- *Punto de fusión:* 20-21°C
- *Solubilidad:* miscible con agua, acetona, metanol y tetracloruro de carbono. Soluble en benceno (1:24), éter etílico (1:63).

j. Incompatibilidades

Trietanolamina es una amina terciaria la cual contiene grupos hidróxilo así que es capaz de sufrir reacciones típicas de las aminas terciarias y alcoholes. El grupo amino usualmente exhibe una gran actividad cada vez que es posible una reacción con el grupo amino y hidroxilo. Trietanolamina puede reaccionar con el cobre formando sales complejas, decoloración y precipitación puede suceder en presencia de sales de metales pesados, también puede reaccionar con reactivos como cloruro de tionilo por el reemplazo de los grupos hidroxilo con halógenos, los productos de esta reacción son muy tóxicos, pueden parecerse a mostazas nitrogenadas.

k. Método de manufactura

Trietanolamina se prepara comercialmente por la amonólisis de óxido de etileno, la reacción produce monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina, los que son separados para obtener los productos puros.

I. Seguridad

Considerado como material no tóxico, puede causar hipersensibilidad o ser irritante a la piel (DL_{50} piel de conejo $>20g/kg$).



CICATRICURE: GEL HIDRATANTE Y HUMECTANTE PARA CICATRICES

Componentes:

- Agua.
- Propilenglicol.
- Glicerina.
- Polietilenglicol.
- Carbómero.
- Extracto de cebolla.
- Extracto de tomillo.
- Extracto de concha de nácar.
- Extracto de nogal.
- Extracto de sábila.
- Extracto de centella asiática.
- Aceite esencial de bergamota.
- Vitamina K.
- Alantoína.
- Benzoato de sodio.
- Trietanolamina.
- Metilparabeno.
- Propilparabeno.
- Polisorbato 20.
- Diazolidinil urea.
- Regenerare® Complex.