



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“ELABORACIÓN, CONTROL DE CALIDAD Y EVALUACIÓN
“*IN VIVO*” DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN GEL
OBTENIDO DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DEL CHOCHO”

TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

ELSA ESTELA MÉNDEZ LEMA
RIOBAMBA – ECUADOR

2008

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado con mucho amor y respeto a mis padres Carlos y Bachita por brindarme siempre su inmenso cariño y fortaleza, a mis hermanos Lupita desde el cielo ha sido el angelito que ha estado siempre a mi lado, a Carlos Enrique y a Patricia. A ellos va dedicado este trabajo ya que han sido mi apoyo y pilar fundamental en todo instante de mi vida enseñándome que con perseverancia y fé todo es posible.

AGRADECIMIENTO

Mi más Profundo agradecimiento a Dios por permitirme estar aquí, darme la capacidad de cumplir una mas de mis metas y terminar con éxito esta carrera, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrirme las puertas y contribuir a mi formación profesional.

Al INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) y SENACYT (Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología) por el auspicio y financiamiento para la ejecución de este proyecto de investigación.

Al Dr. Pablo Naveda por su ayuda en la dirección de la tesis.

A la Dra. Susana Abdo miembro del tribunal por su inquebrantable ayuda

A Javier Cruz por su constante y desinteresado apoyo.

Al Dr. Francisco Portero y al Bioquímico Farmacéutico. Diego Vinuesa por su valiosa colaboración.

Y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la culminación de este trabajo mil gracias de corazón.

	FIRMA	FECHA
Dr. Edmundo Caluña. DECANO FAC. CIENCIAS	_____	_____
Dr. Carlos Donoso. DIRECTOR ESC. BIOQUÍMICA Y FARMACIA	_____	_____
Dr. Pablo Naveda. DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
Dra. Susana Abdo. MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Dra. Lourdes Cuadrado. MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Tlgo. Carlos Rodríguez. DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACION	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo Elsa Estela Méndez Lema, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos de esta Tesis; y el patrimonio intelectual de esta Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO.

ELSA ESTELA MÉNDEZ LEMA

INTRODUCCIÓN

La Medicina Alternativa constituye una valiosa contribución en la solución de problemas de Salud Pública, los cuales son tan críticos como la falta de medicamentos, los altos precios en el mercado nacional e internacional que los hace inalcanzables para aquellas personas de menores recursos económicos. Además la gran diversidad de manifestaciones adversas y el incremento de interacciones medicamentosas de los medicamentos de origen sintético.

Actualmente se están realizando estudios para evaluar los efectos de las diferentes plantas de acuerdo al uso popular que se les atribuye, e investigando los principios activos responsables de una determinada acción farmacológica. También se está tratando de aprovechar algunos subproductos que comúnmente se desechan, para elaborar fitomedicamentos que contribuyan positivamente a la salud.

La planta de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) por su gran contenido de alcaloides tóxicos limita el uso directo de la semilla cruda en la alimentación humana y animal. Con un tratamiento adecuado se logra reutilizar esta leguminosa obteniendo los alcaloides que con el subproducto del proceso hídrico de desamargado se desecha, eliminándose un alto porcentaje de alcaloides, siendo su contenido más alto en el agua de cocción (el 72%). El agua residual del proceso de cocción, al ser eliminado indiscriminadamente, provoca la contaminación ambiental y consecuentemente daños al ecosistema. (46)

Pruebas preliminares realizadas “*in vitro*” permitieron comprobar la actividad antibacteriana de los extractos alcaloidales del chocho sobre cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Mediante tecnologías adecuadas se consigue dar uso a las propiedades farmacológicas de los alcaloides quinolizidínicos. (34)

El desarrollo de un producto antibacteriano que cumpla con las normas de calidad y eficacia terapéutica es una alternativa válida de bajo costo (pues se aprovecha un subproducto que actualmente se desecha), para combatir las infecciones bacterianas en la piel, que se han constituido en un foco de diseminación en el hombre y en los animales, siendo los responsables del desarrollo posterior de lesiones, problema que obliga a buscar estrategias de solución que permitan un control de los agentes implicados y causales de estas enfermedades a través de la utilización de esta planta.

Esta propuesta cuenta con el auspicio y financiamiento de SENACYT e INIAP, al constituirse parte del proyecto de investigación “Evaluación y aprovechamiento de la actividad antibacteriana y antifúngica de los alcaloides presentes en el agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) sobre cepas ATCC”, el objetivo es elaborar, controlar la calidad y evaluar “*in vivo*” la actividad antibacteriana de un gel obtenido del extracto alcaloidal del chocho. Se probará sobre dos cepas puras de *Staphylococcus aureus* ATCC 13709 y *Escherichia coli* ATCC 9637 en ratones de laboratorio inducidos la enfermedad.

Por lo tanto se comprobara la hipótesis que el gel elaborado del extracto alcaloidal del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) cumple con los requisitos de calidad y eficacia terapéutica.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

π	Pi
%	Porcentaje
A	Área
AOAC	Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods
ATCC	American Type Culture Collection
cm	Centímetro
cp	Centipois
DMSO	Dimetil sulfoxido
EMB	Agar eosina azul de metileno
F1	Formulación uno
F2	Formulación dos
g	Gramos
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramos
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
N	Normalidad
N°	Número
°C	Grados Celsius
OMS	Organización mundial de la salud
PCA	Plate count agar
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
r ²	Radio al cuadrado
SAB	Agar sabouraud dextrosa
T1	Tratamiento gel hojas
T2	Tratamiento gel grano
T3	Tratamiento crema Silvadin
T4	Sin tratamiento
T5	Tratamiento gel placebo
TEA	Trietanolamina
TSA	Tripticasa soya agar
TSB	Tripticasa soya caldo
UFC	Unidades formadoras de colonias
uL	Microlitros
um	Micrómetros
USP	United States Pharmacopeial

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRAFICOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I	1
1. PARTE TEÓRICA	1
1.1 Fitoterapia.....	1
1.1.2 Fitomedicamento.....	2
1.2 Terapia tópica.....	2
1.3 <i>Lupinus</i>	3
1.3.1 <i>Lupinus mutabilis sweet</i>	4
1.3.2 Composición química de <i>lupinus mutabilis sweet</i>	4
1.3.3 Toxicidad de los alcaloides del chocho.....	7
1.3.4 Actividad antimicrobiana de los flavonoides y alcaloides del <i>Lupinus ballianus c.p.</i>	7
1.4 La piel.....	8
1.4.1 Estructura de la piel.....	8
1.4.2 Infecciones bacterianas en la piel.....	9
1.4.3 Clasificación de las infecciones bacterianas.....	10
1.5 Bacterias.....	11
1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.5.1.1 Principales patologías.....	12
1.5.1.2 Enfermedades estafilococicas.....	12
1.5.2 <i>Escherichia coli</i>	13
1.5.2.1 Principales patologías.....	14
1.6 Geles.....	14
1.6.1 Definiciones.....	14
1.6.2 Ventajas y desventajas de los geles.....	14
1.6.3 Mecanismo de formación de un gel.....	15
1.6.4 Clasificación de los geles.....	15
1.7 Excipientes	17
1.7.1 Propilenglicol.....	17
1.7.2 Propil parabeno.....	18
1.7.3 Metil parabeno.....	18
1.7.4 Carbopol	19
1.7.5 Trietanolamina	19
CAPÍTULO II	20

2. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
2.1 Lugar de investigación.....	20
2.2 Materiales, equipos y reactivos.....	20
2.2.1 Material biológico.....	20
2.2.2 Materia prima.....	21
2.2.3 Materiales de laboratorio.....	21
2.2.4 Equipos de laboratorio.....	22
2.2.5 Reactivos.....	22
2.3 Metodología.....	23
2.3.1 Obtención de los extractos.....	23
2.3.1.1 Obtención del extracto alcohólico de las hojas de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	23
2.3.1.2 Obtención del extracto etéreo del grano de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	24
2.4 Control de calidad de lo extractos.....	24
2.4.1 Determinación organoléptica del extracto.....	24
2.4.2 Análisis cromatográfico.....	25
2.4.3 Análisis microbiológico.....	25
2.5 Control de calidad de los excipientes.....	26
2.5.1 Carbopol 940.....	26
2.5.2 Metil parabeno.....	27
2.5.3 Propil parabeno.....	28
2.5.4 Propilenglicol.....	28
2.5.5 Trietanolamina.....	29
2.6 Procedimiento.....	30
2.6.1 Formulación establecida.....	30
2.6.2 Procedimiento de elaboración.....	31
2.7 Control de calidad del gel.....	31
2.7.1 Parámetros organolépticos.....	31
2.7.2 Parámetros físicos.....	32
2.7.2.1 Determinación de la untuosidad.....	32
2.7.2.2 Determinación de la extensibilidad.....	32
2.7.2.3 Determinación de la viscosidad.....	33
2.7.2.4 Determinación de pH.....	33
2.7.3 Análisis microbiológico.....	33
2.8 Análisis “ <i>in vivo</i> ” de la actividad antibacteriana del gel obtenido del extracto alcaloidal del chocho.....	34
2.8.1 Reactivación e inoculación de las bacterias en la herida.....	35
2.8.2 Prueba confirmativa de inoculación en la herida.....	36
2.8.3 Tratamiento y cicatrización de la herida.....	36
CAPÍTULO III	37
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
3.1 Extractos.....	37
3.2 Control de calidad de los extractos.....	37
3.2.1 Determinación del pH.....	37
3.2.2 Parámetros organoléptico.....	38
3.2.3 Control microbiológico.....	39

3.2.4	Perfil cromatográfico.....	39
3.3	Control de calidad de los excipientes.....	42
3.3.1	Carbopol.....	42
3.3.2	Metil parabeno.....	43
3.3.3	Propil parabeno.....	43
3.3.4	Propilenglicol.....	44
3.3.5	Trietanolamina.....	45
3.4	Control de calidad del producto terminado.....	45
3.4.1	Control organoléptico.....	46
3.4.1	Control físico.....	46
3.4.1.2	Determinación del pH.....	46
3.4.2.2	Determinación de la extensibilidad.....	47
3.4.2.3	Determinación de la viscosidad.....	48
3.4.2.4	Determinación de la consistencia.....	48
3.4.3	Control microbiológico.....	49
3.5.2	Determinación de actividad antibacteriana de los geles en heridas infectadas con <i>E. coli</i> ATCC 9637 y <i>S. aureus</i> ATCC 13709.....	49
3.5.2.1	Determinación del porcentaje de inhibición bacteriana de las formulaciones F1 y F2 al 1% sobre <i>E. coli</i> ATCC 9637.....	50
3.5.2.2	Determinación del porcentaje de inhibición bacteriana de las formulaciones F1 y F2 al 1% sobre <i>S. aureus</i> ATCC 13709.....	51
CAPÍTULO IV		53
4. CONCLUSIONES.....		53
CAPÍTULO V		54
5. RECOMENDACIONES.....		54
CAPÍTULO VI		55
6. RESUMEN.....		55
SUMARY.....		56
CAPÍTULO VII		57
7. BIBLIOGRAFÍA.....		57
7.1	General.....	57
7.2	Específica.....	59
CAPÍTULO VIII		64
8. ANEXOS.....		64

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	Determinación de los valores del pH del extracto alcohólico de las hojas de chocho y del extracto etéreo de los alcaloides totales del chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	37
CUADRO N° 2	Control organoléptico del extracto alcohólico de las hojas de chocho y del extracto etéreo de los alcaloides totales del chocho.....	38
CUADRO N° 3	Control microbiológico del extracto alcohólico de las hojas de chocho y del extracto etéreo de los alcaloides totales del chocho.....	39
CUADRO N° 4	Determinación del Rf de los alcaloides contenidos en el extracto alcohólico de las hojas de chocho y en el extracto etéreo del grano de chocho.....	41
CUADRO N° 5	Control de calidad del carbopol 940 (USP XXVIII).....	42
CUADRO N° 6	Control de calidad del metil parabeno (USP XXIII).....	43
CUADRO N° 7	Control de calidad del propil parabeno (USP XXIII).	43
CUADRO N° 8	Control de calidad del propilenglicol (USP XXIII).....	44
CUADRO N° 9	Control de calidad de la trietanolamina TEA (USP XXIII).....	45
CUADRO N° 10	Control organoléptico de las formulaciones en producto terminado.....	46
CUADRO N° 11	Valores de pH de las formulaciones en producto terminado....	46
CUADRO N° 12	Valores de extensibilidad de las formulaciones en producto terminado.....	47
CUADRO N° 13	Valores de viscosidad de las formulaciones en producto terminado.....	48
CUADRO N° 14	Valores de consistencia de las formulaciones en producto terminado.....	48
CUADRO N° 15	Resultados obtenidos de los ensayos microbiológicos realizados en las formulaciones del producto terminado.....	49
CUADRO N° 16	Test de Tukey para la determinación del porcentaje de inhibición bacteriana de las formulaciones F1 y F2 al 1% en heridas causadas por cepas de <i>E. coli</i>	50
CUADRO N° 17	Test de Tukey para la determinación del porcentaje de inhibición bacteriana de las formulaciones F1 y F2 al 1% en heridas causadas por cepas de <i>S.aureus</i>	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1	Curva del porcentaje de cicatrización de las heridas, mediante la aplicación de los diferentes tratamientos sobre <i>E. coli</i> . ATCC 9637.....	50
GRÁFICO N° 2	Curva del porcentaje de cicatrización de las heridas, mediante la aplicación de los diferentes tratamientos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 13709.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1	Estructura molecular de la lupanina.....	5
FIGURA N° 2	Estructura molecular de la esparteína.....	5
FIGURA N° 3	Estructura molecular de la 4- hidroxilupanina.....	6
FIGURA N° 4	Estructura molecular de la 13- hidroxilupanina.....	6
FIGURA N° 5	Estructura de la piel.....	8
FIGURA N° 6	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
FIGURA N° 7	<i>Escherichia coli</i>	13
FIGURA N° 8	Hidrogel.....	16
FIGURA N° 9	Fórmula estructural del propilenglicol.....	17
FIGURA N° 10	Fórmula estructural del propilparabeno.....	18
FIGURA N° 11	Fórmula estructural metil parabeno.....	18

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1	Planta de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	4
FOTOGRAFÍA N° 2	Placa cromatografica de los alcaloides contenidos en el extracto alcohólico de las hojas de chocho.....	40
FOTOGRAFÍA N° 3	Placa cromatografica de los alcaloides contenidos en el extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho.....	41
FOTOGRAFÍA N° 4	Obtención del extracto alcohólico de las hojas de chocho.....	67
FOTOGRAFÍA N° 5	Obtención del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano.....	67
FOTOGRAFÍA N° 6	Geles antibacterianos de uso tópico al 1%.....	68
FOTOGRAFÍA N° 7	Heridas en ratones <i>Mus musculus</i> con infección epidérmica inducida por cepas de <i>S. aureus</i>	68
FOTOGRAFÍA N° 8	Efecto de los tratamientos aplicados sobre heridas con infección epidérmica provocada por <i>E. coli</i>	69
FOTOGRAFÍA N° 9	Efecto de los tratamientos aplicados sobre heridas con infección epidérmica provocada por <i>S. aureus</i> ...	70

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1	Unidades de estudio para determinar el porcentaje de inhibición bacteriana, causada por <i>E. coli</i> . ATCC 9637.....	65
ANEXO N° 2	Unidades de estudio para establecer el porcentaje de inhibición bacteriana causada por <i>S. aureus</i> . ATCC 13709.....	65
ANEXO N° 3	Determinación de los valores de pH de los extractos.....	66
ANEXO N° 4	Determinación de los valores de pH de las formulaciones.....	66
ANEXO N° 5	Determinación de los valores de extensibilidad de las formulaciones.....	66
ANEXO N° 6	Determinación de los valores de viscosidad de las formulaciones.....	66
ANEXO N° 7	Obtención del extracto alcohólico de las hojas de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	67
ANEXO N° 8	Obtención del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	67
ANEXO N° 9	Presentación de los geles antibacterianos de uso tópico.....	68
ANEXO N° 10	Herida en ratones <i>Mus musculus</i> con infección epidérmica causada por <i>S. aureus</i> . ATCC 13709 y <i>E. coli</i> ATCC 9637.....	68
ANEXO N° 11	Efecto de los tratamientos aplicados sobre heridas con infección epidérmica causada por <i>E. coli</i>	69
ANEXO N° 12	Efecto de los tratamientos aplicados sobre heridas con infección epidérmica causada por <i>S. aureus</i>	70

CAPÍTULO I

1. PARTE TEÓRICA

1.1. FITOTERAPIA

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y las plantas medicinales, fueron el principal y el único recurso de que disponían los médicos. Esto provocó que se ahondara en el conocimiento de las especies vegetales que tienen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que se obtienen de ellas.

La fitoterapia es el uso medicinal de las plantas, que no ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus propiedades curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del nuevo mundo. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que no se acumulen en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados.

Las plantas constituyen un verdadero laboratorio donde se producen metabolitos primarios y es a partir de ellos que las plantas por medio de su metabolismo generan los metabolitos secundarios, estos metabolitos reciben el nombre de principios activos de las plantas y entre ellos tenemos: aceites volátiles, ácidos grasos esenciales, ácidos orgánicos, alcaloides, azúcares, flavonoides, entre otros. Estas sustancias son verdaderas moléculas químicas que tienen sobre el organismo diferentes acciones, las cuales si son bien usadas, nos ayudan a prevenir y solucionar grandes problemas de nuestra salud. (12,15)

1.1.2 FITOMEDICAMENTO

Según el criterio de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los medicamentos herbarios o fitomedicamentos se definen como: “productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de estos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales.”(40)

1.2 TERAPIA TÓPICA

"Es la parte de la terapéutica dermatológica que aplica sustancias sobre la piel o las mucosas con el fin de lograr alivio o curación". En la terapia tópica a diferencia de la sistémica, el uso de sustancias farmacológicamente no activas, además de actuar como sistema dispensador de drogas cuando son combinados con ellas, van a ejercer un efecto físico tan importante, que su uso adecuado va a permitir resolver un gran número de dermatosis. Cuando se aplica en la piel una droga activa, la selección del vehículo debe hacerse tan cuidadosamente como la de la droga. Después de la aplicación tópica de una droga activa, la droga entra en la piel que es el órgano diana, se distribuye luego en todo el organismo para ser después eliminado.(36)

Cuando la administración es sistémica la droga primero es diluida en todo el organismo, llegando sólo una porción de la misma a la piel. En consecuencia, para una misma concentración de la droga en la piel, la carga de ella en todo el organismo es mucho mayor después de la administración sistémica.

Por otra parte, la concentración de la droga en la piel disminuye desde la superficie hasta el subcutis después de la administración tópica mientras que lo contrario sucede con la sistémica. (48)

1.3 LUPINOS

Se emplean con fines medicinales las semillas de diferentes especies del género *Lupinus* familia Fabaceae, representada por más de 300 especies distribuidas por toda el área mediterránea, África y América. Esta planta presenta una gran variabilidad morfológica y de adaptación ecológica en los Andes, por lo cual se ha sugerido que puede incluirse a tres subespecies (28)

- *Lupinus mutabilis*, chocho (norte de Perú y Ecuador), de mayor ramificación, muy tardío, mayor pilosidad en hojas y tallos, algunos ecotipos se comportan como bianuales, tolerantes a la antracnosis.(9,7)
- *Lupinus mutabilis*, tarwi (centro y sur de Perú), de escasa ramificación, medianamente tardío, algo tolerante a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tauri (altiplano de Perú y Bolivia), de menor tamaño (1-1,40 m) con un tallo principal desarrollado, muy precoz, susceptible a la antracnosis.

Muchas especies del género *Lupinus* (Figura N° 1) se ha utilizado para consumo animal y humano desde tiempos remotos, debido a su elevado poder nutritivo y a su resistencia a condiciones extremas. Sin embargo, su uso se ha visto restringido debido a la presencia de alcaloides tóxicos. (27,8)

Los alcaloides son heterociclos procedentes del metabolismo secundario y juegan un papel muy importante para las plantas, ya que estos actúan como defensa contra las infecciones por bacterias y hongos y contra la predación por herbívoros.

La gran diversidad estructural de los alcaloides, reduce la posibilidad de los herbívoros para desarrollar resistencia a todos ellos, aumentando de este modo su toxicidad. La concentración de alcaloides va desde el 1-2% de las variedades amargas, hasta el 0.001-0.003% en las variedades dulces.

1.3.1 Lupinus mutabilis Sweet



FOTOGRAFÍA N°. 1 *Lupinus mutabilis Sweet*

Nomenclatura Botánica

Nombre científico: *Lupinus mutabilis Sweet.*

Nombres comunes: Ullush, talwish, tauri, talhue, chuchs muti, chocho, chochos,

Familia: Fabáceas (Leguminosas)

Registro de identificación en Herbarios reconocidos (Index Herbarium): Andean *Lupinus mutabilis*. The Herbarium Sheet. (3,54)

Dentro de la familia de los alcaloides quinolizidínicos, son lupanina y lupinina los dos que mayoritariamente se acumulan en el género del *Lupinus*; se diferencian en el número de ciclos y así la lupanina es tetracíclica y la lupinina es bicíclica.

1.3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL *Lupinus mutabilis Sweet*

Los principales alcaloides quinolizidínicos presentes en el chocho son: Lupanina (46%), esparteína (14%), 4- hidroxilupanina (10%), isolupanina (3%), n-metilangustifolina (3%), 13- hidroxilupanina (1%). (6) Son compuestos que biogenéticamente derivan de la lisina y que poseen en su estructura simplemente una o dos quinolizidinas. (33)

Poseen propiedades alcalinas debido a la presencia de nitrógeno básico formando por lo general núcleos heterocíclicos. Estos en forma libre son insolubles en el agua, poco solubles en alcohol e insolubles en éter y cloroformo, la mayoría poseen oxígeno en su

estructura y son sólidos no volátiles, sin embargo algunos no contienen oxígeno como la esparteína siendo esta líquida a temperatura ambiente. (19)

LUPANINA.

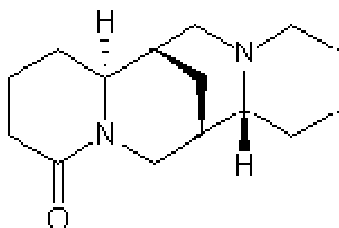


FIGURA N° 2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA LUPANINA.

La forma racémica de la Lupanina fue sintetizada por Becheleide en 1951.

Fórmula estructural: $C_{15}H_{24}N_2O$ (Figura N° 2) formas racemicas: l-lupanina y d-lupanina.

Peso molecular: 248.36g/mol,

Solubilidad: en agua, cloroformo, éter y alcohol e insoluble en éter de petróleo.

Actividad: antibacteriana, antinematicida contra lepidopteros y coleópteros, produce inhibición de las actividades moduladoras, inhibe la síntesis de proteínas (54).

ESPARTEÍNA.

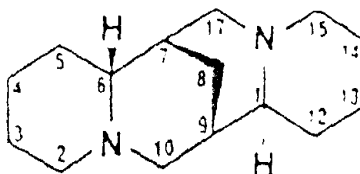


FIGURA N° 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ESPARTEÍNA

Fórmula estructural: $C_{15}H_{26}N_2$, los átomos de nitrógeno de la esparteína están unidos en forma terciaria. (Figura N° 3)

Peso molecular: 234g/mol

Características organolépticas: Es un líquido oleoso, espeso, incoloro con olor débil a anilina y sabor sumamente amargo.(10)

Solubilidad: Es insoluble en agua, alcohol, éter, y cloroformo, con reacción alcalina.

Actividad: Es un gangliopléjico poco potente, bloquea la transmisión por impedir la despolarización de la membrana postsináptica. Tiene sus efectos tóxicos al inhibir los canales de K⁺, además inhibe la síntesis y formación del RNAt, es un depresor del sistema nervioso central, posee actividad, antiaritmica, diurética, hipoglicemiante, estimulante respiratorio. (12)

HIDROXILUPANINA.

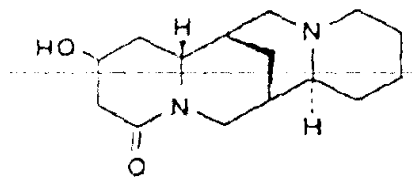


FIGURA Nº 4. 4- HIDROXILUPANINA

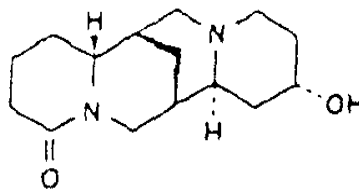


FIGURA Nº 5. 13- HIDROXILUPANINA

Fórmula estructural: C₁₅H₂₄N₂O₂

Peso molecular: 264 g/mol. (11)

Hay 2 formas isómeras de la hidroxilupanina como unidades químicas representativas, dependiendo de la localización del grupo hidroxilo en la estructura básica de la molécula, estas son: 4-hidroxilupanina (Figura Nº 4) y la 13-hidroxilupanina (Figura Nº 5).

ANGUSTIFOLINA.

Actividad: La angustifolina inhibe el crecimiento bacteriano de *Bacilo subtilis*, *Bacilo thuriensis* y *E. coli*, participa en la inhibición de las actividades moduladoras y el la biosíntesis de las proteínas. (19)

1.3.3 TOXICIDAD DE LOS ALCALOIDES DEL CHOCHO.

La toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada a dosis muy altas tanto en animales como en seres humanos. Dosis comprendidas entre 11- a 25 mg/Kg de peso corporal en niños y dosis de 25 a 46 mg/Kg de peso corporal en adultos producen graves intoxicaciones. Los síntomas de envenenamiento son: midriasis, calambres, cianosis, parálisis respiratoria, violentos dolores estomacales, vómitos e incluso coma. El efecto nematocida del extracto de chochos crudos tiene una tasa de mortalidad del 93% sobre larvas de *Meledoigyne incognita* del de tomate de árbol y naranjilla. (22, 1)

1.3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS FLAVONOIDES Y ALCALOIDES DEL *LUPINUS BALLIANUS* C.P. SMIT

En cuanto a la actividad antimicrobiana, la presencia de flavonoides y alcaloides, les confiere la actividad antibacteriana, y actividad antifúngica en el caso de los alcaloides. La mayor resolución de inhibición se debe al extracto alcohólico, al flavonoide y al alcaloide; con similar o igual poder de inhibición contra los Grampositivas (*S. aureus* ATCC 6538,) y Gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*), la acción antimicrobiana se debería a que los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos. La acción antibacteriana y antifúngica de los alcaloides se podría deber a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida. (27)

Los resultados obtenidos de los ensayos antimicrobianos de los eluatos de flavonoides y alcaloides, muestran una resolución de inhibición menor a los extractos de flavonoides y alcaloides, estos resultados se deben probablemente que además de contener sustancias activas de propiedades químicas semejantes, existen otras sustancias como los taninos que incrementan en cierta forma esta actividad, también los resultados observados, podrían ser causados por un sinergismo de los constituyentes. (15)

1.4 LA PIEL

La piel es el órgano sensitivo más grande del cuerpo humano, constituye aproximadamente el 15% del peso total corporal, recoge información a través de una extensa red de neuronas y terminales nerviosas. Aportan información sobre presión, vibración, dolor y temperatura.

1.4.1 ESTRUCTURA DE LA PIEL Y SUS FUNCIONES

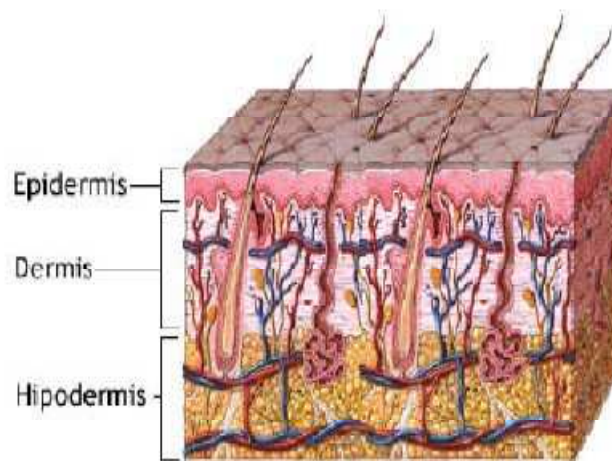


FIGURA Nº 6. ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel cumple diversas funciones:

- Protección.

- Regulación térmica.
- Percepción sensitiva.
- Respuestas inmunitarias.
- Evita la pérdida de fluidos hacia el exterior
- Participa en la síntesis de vitamina D.

Es un órgano en permanente estado de actividad, consta de tres capas (Figura N° 6.): la epidermis, dermis, hipodermis.(14)

La epidermis es la capa superficial, consta de queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Tiene varios estratos: basal, espinoso, granuloso y corneo. La dermis consta de dermis papilar y dermis reticular, se compone de tejido conectivo se encuentran fibroblastos, mastocitos, macrófagos, dendrocitos. (18)

1.4.2 INFECCIONES BACTERIANAS EN LA PIEL

Las infecciones causadas por bacterias pueden afectar una zona específica o propagarse por una zona extensa de la piel, así como producir la infección a nivel de la dermis, epidermis y tejido subcutáneo.

Dependiendo de tres factores:

- Propiedades patógenas de los agentes bacterianos
- Integridad de la puerta de entrada.
- Capacidad de defensa del organismo frente a la invasión bacteriana (17)

La flora de las heridas depende del sitio anatómico, del modo en que se produjo (traumática o quirúrgica), del ambiente donde se produjo y del grado de contaminación de las áreas adyacentes que fueron lesionadas al producirse la herida. Las heridas traumáticas generalmente se infectan con microorganismos aeróbicos nativos, especialmente *S. aureus*, *Streptococcus grupo A*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Flavobacterium* spp. y *Acinetobacter* spp. Las infecciones que complican las heridas quirúrgicas pueden ser producidas de dos formas:

Primera clase de infección.- La infección quirúrgica, generalmente es una complicación de un procedimiento de cirugía limpia. Estas heridas dan cultivos positivos para *S. aureus*, *Enterococcus* o bacilos Gramnegativos.

Segunda clase de infección.- Ocurre cuando el cirujano interviene en un área contaminada. Generalmente las bacterias que complican este tipo de cirugía son *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp*, *Providencia spp*. (18)

Hasta antes del nacimiento la piel se encuentra estéril. Al nacimiento comienza a ser colonizada por microorganismos, principalmente bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas. En el adulto existen $10^2 - 10^4$ UFC/m². Este número no es más alto porque la piel presenta mecanismos que regulan el número de microorganismos, principalmente sequedad y exfoliación; a esto contribuye la higiene, el que la piel no tenga un pH adecuado para el desarrollo de microorganismos (5 - 5,5), su temperatura y composición química, ya que a través de ella se eliminan sustancias incluso antibacterianas. (45)

Sin embargo hay microorganismos que pueden producir infecciones a nivel de la piel: Las infecciones de los tejidos pueden aparecer por efecto de un descenso de la capacidad de defensa local y con menos frecuencia de la sistémica. Las primeras barreras del huésped frente a la infección son la piel y la mucosa indemne y sus productos de secreción-excreción. La lesión que producen las bacterias en los tejidos depende de su capacidad de adherirse y penetrar en las células huésped y producir toxinas bacterianas. La inflamación supurativa se caracteriza por aumento de la permeabilidad vascular e infiltración leucocitaria fundamentalmente con neutrófilos. La concentración bacteriana es un factor que determina la aparición de infección en individuos inmunocompetentes. *Bergamini* en 1984 utilizó un inóculo de $1,5 \cdot 10^8$ UFC de *S. aureus* en un modelo experimental de herida infectada. (45)

1.4.3 CLASIFICACIÓN DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS

Se clasifican en:

- a. Infecciones primarias.-** estas se producen cuando el agente bacteriano invade la piel previamente sana, causadas principalmente por un microorganismo simple. Ejemplo: impétigo, foliculitis, forúnculo, hidrosadenitis, paroniquia, erisipela, celulitis.
- b. Infecciones bacterianas secundarias.-** son infecciones polimicrobianas que se producen en una piel previamente dañada, causada principalmente por quemaduras, contusiones, picaduras. ejemplo: dermatitis atópica, dermatitis de contacto, entre otras.
- c. Infecciones bacterianas sistémicas.-** resultan de una infección bacteriana sistémica, ejemplo: síndrome de piel escaldada estafilocócica, síndrome de shock tóxico estafilocócico y estreptocócico. (45)

1.5 BACTERIAS

Existen relativamente pocas especies de bacterias que causan enfermedades en relación con la enorme cantidad de bacterias que tienen vida libre. A la mayoría se les conoce bien y están bien estudiadas, pero, sin embargo, continúan apareciendo patógenos nuevos y esta claro que la aparición de las infecciones nuevas son siempre importantes. (46)

1.5.1 *Staphylococcus aureus*

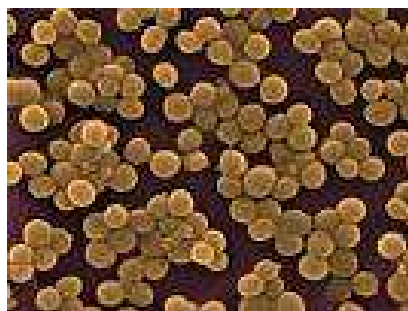


FIGURA Nº 7. *Staphylococcus aureus*

S. aureus (Figura Nº 7) es un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales y extremadamente difíciles de erradicar. Pese a que no es esporulado,

soporta bien condiciones extremas aunque se inactiva a temperatura de congelación y puede eliminarse con una cocción correcta. Produce toxinas filtrables cuando crece en condiciones adecuadas, especialmente en una atmósfera de alto contenido en dióxido de carbono. (43,47)

***Staphylococcus aureus* ATCC 13709.**

CLASIFICACIÓN.

Orden : Eubacteriales.
Familia : Micrococaceae.
Género : *Staphylococcus*.
Especie : *aureus*.

MORFOLOGÍA.

Se presentan en forma de cocos de aproximadamente de 0.5-1.5 μm de diámetro agrupados en racimos. Son positivos en la tinción de Gram. Son microorganismos inmóviles (no flagelados) y no forman esporas. (38,37)

1.5.1.1 PRINCIPALES PATOLOGÍAS

La acción patógena de *S. aureus* se manifiesta por la capacidad de invasión del microorganismo y las sustancias que puede elaborar, que ayudan en el proceso infeccioso local y pueden causar lesión en lugares más distantes. Generalmente son infecciones con gran supuración y necrosis tisular que tienden a la formación de abscesos. Entre los principales cuadros clínicos tenemos: lesiones en piel y mucosas, infecciones generalizadas, bacteriemia, infecciones localizadas en vísceras, lesiones por acción principalmente exotóxica. (37)

1.5.1.2 ENFERMEDADES ESTAFILOCOCICAS

S. aureus es responsable de más del 80 % de las enfermedades supurativas que se encuentran en la práctica médica. Se asocian a enfermedades bronquiales adquiridas y genéticas, provocan la mayoría de las infecciones purulentas de la piel, pero también pueden invadir y producir infecciones severas en cualquier otro órgano del cuerpo, y ocasionar bacteriemia e infecciones graves en pacientes hospitalizados.

En el ámbito de la medicina militar, la infección de las heridas se incluye dentro de los temas de interés médico-militar donde se presenta *S. aureus* como un frecuente contaminante de heridas tanto en tiempo de guerra como en la paz. El Impétigo ampolloso es una infección cutánea superficial causada por *S. aureus*, actualmente 80% por estafilococo. (18,2)

1.5.2 *Escherichia coli*

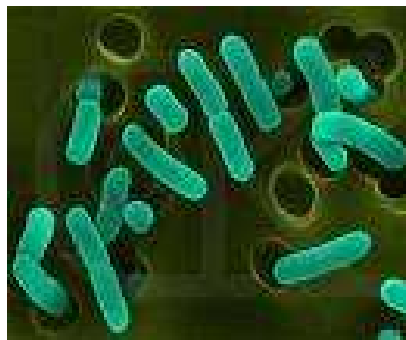


FIGURA Nº 8. *Escherichia coli*

Escherichia coli ATCC 9637

CLASIFICACIÓN

Orden : Eubacteriales.
Familia : Enterobacteriaceae.
Género : *Escherichia*.
Especie : *coli*.

MORFOLOGÍA

Son bacilos Gramnegativos que poseen un tamaño de alrededor de 1.1-1.5 x 2.0-6.0 μm aerobios y anaerobios facultativos, fermentan la lactosa y son oxidasa negativa; las especies móviles tienen flagelos de localización peritrica (Figura N° 8).

1.5.2.1 PRINCIPALES PATOLOGÍAS

E. coli es la especie comensal involucrada con mayor frecuencia de las infecciones oportunistas. Sin embargo algunas cepas de *E. coli* poseen capacidad patógena primaria, pudiendo causar infecciones en personas previamente sanas, sin factores predisponentes. Las principales patologías causadas por *E. coli* de determinados serotipos son: Infecciones urinarias, enteritis, enteritis hemorrágica, diarrea secretora.

1.6 GELES

1.6.1 DEFINICIONES

- Son lociones acuosas semiplásticas, gelificadas con polímeros de alto peso molecular que se licúan en contacto con la piel, secándose como una capa delgada no grasa, oclusiva. Son miscibles en agua, fáciles de aplicar y de remover. (35)
- Son sistemas de dispersión habitualmente transparentes, uniformes, fácilmente deformados, constan como mínimo de dos componentes, un líquido (actúa como agente dispersante) y un componente generador (de materia coloidal sólida).(37, 3)
- Desde el punto de vista farmacéutico los geles son formas farmacéuticas de consistencia semisólida, generalmente no tienen aceites grasos, destinados a aplicarse sobre las membranas mucosas, se utilizan para ejercer acción tópica.(35)

1.6.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS GELES

Ventajas:

- Son bien tolerados
- Fácilmente lavables
- Producen frescor

Desventajas

- Incompatibilidad con numerosos principios activos
- Tendencia a la desecación
- Bajo poder de penetración (indicados para tratamientos superficiales).

1.6.3 MECANISMO DE FORMACIÓN DE UN GEL

Los productos gelificantes se pueden agrupar del siguiente modo:

Polímeros que dan lugar a un gel dependiente del pH del medio.- dan lugar a soluciones ácidas que al neutralizar con las bases adecuadas, aumentan la viscosidad y disminuyen la turbidez del medio. Mecanismo de formación: a bajos valores de pH se disocia una pequeña proporción de grupos carboxílicos del polímero, formando una espiral flexible. La adición de una base produce la disociación de grupos carboxílicos, ionizándose, creando repulsión electrostática entre las regiones cargadas, expandiéndose la molécula, haciendo más rígido el sistema. Se pasa de una estructura espiralada a una desenrollada o extendida, ejemplo Carbomer. Si se agrega un exceso de base puede producir una pérdida de viscosidad al neutralizarse los grupos carboxílicos. (28,5)

Polímeros que dan lugar a un gel por sí mismo, independiente del pH del medio.- no precisan ser neutralizados para la formación del gel, gelifican por sí mismo, forman puentes de hidrógeno entre el solvente y los grupos carboxílicos del polímero. (35)

1.6.4 CLASIFICACIÓN DE LOS GELES

a. Dependiendo de su comportamiento frente al agua

Geles hidrófilos o hidrogeles (Figura N° 9). Son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos. Forman estructuras de largas cadenas, la flexibilidad esto hace posible que se deformen permitiendo la entrada de moléculas de disolvente dentro de su estructura tridimensional. (35)

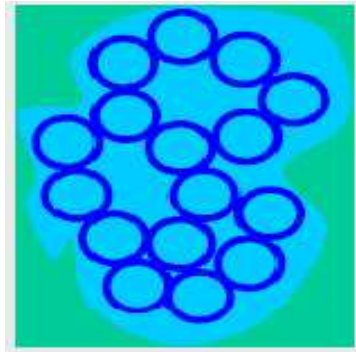


FIGURA N° 9. HIDROGEL

Geles hidrófobos, lipogeles, oleogeles: Estan constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno o por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico coloidal o por jabones de aluminio y zinc, son vehículos oleosos oclusivos, aptos para el tratamiento de dermatosis crónica, utilizados en los preparados oftálmicos.(16)

b. Según el número de fases en que están constituidos

Geles monofásicos: el medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles; agua-alcohol, solución hidroalcohólica, aceite, etc.

Geles bifásicos: constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido.

c. Clasificación de los geles por su viscosidad

- Geles fluidos
- Geles semisólidos
- Geles sólidos (formulación de los sticks desodorantes y colonias sólidas)

d. Clasificación de los geles por su estructura

Geles elásticos: Un gel típico elástico es el de gelatina, se obtiene por enfriamiento del sol liófilo que resulta cuando se calienta esta sustancia con agua. Otros soles dan geles elásticos, por ejemplo: agar, almidón, pectina.

Geles no elásticos: El más conocido es el del ácido silícico o gel de sílice. Los geles no elásticos no tienen hinchamiento, pueden tomar líquido sin cambio de volumen. (35)

1.7 EXCIPIENTES

Es un componente, distinto del principio o principios activos, presentes en un medicamento o utilizado en su fabricación. La función de un excipiente es servir como soporte o como componente del soporte del principio activo contribuyendo así a propiedades tales como estabilidad, perfil biofarmacéutico, aspecto y aceptación por el paciente, y para facilitar su fabricación. Los geles que están formados en gran medida por excipientes, estas formas farmacéuticas pueden tener estructura de emulsión, de gel o de crema, pero la característica común es que suelen estar compuestas por fases acuosas o fases oleosas que debido a emulgentes se interponen de manera estable.

Los excipientes de la mayoría de geles y pomadas sufren un proceso parecido. La liberación del principio activo depende de la fase predominante, las fases acuosas predominan cuando queremos que el fármaco actúe a nivel externo, es decir en las capas superficiales de la piel. Si necesitamos que el fármaco penetre bien o actúe largo rato, se buscan excipientes grasos que formen una película oclusiva sobre la piel. (28)

1.7.1 PROPILENGLICOL

El propilenglicol, producido comercialmente a partir del propileno y el carbonato.

Formula estructural: (Figura N° 10)

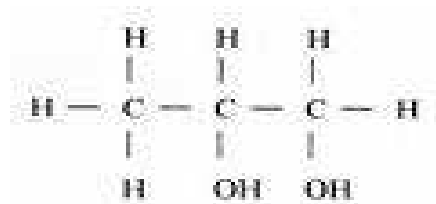


FIGURA N° 10. FORMULA ESTRUCTURAL PROPILENGLICOL

Nombre sistemático: propane-1,2-diol (propano-1,2-diol)

Fórmula química: $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$

Masa molecular: 76,09 g/mol

Densidad: 1,036 g/cm³

Características organolépticas: insípido, inodoro, e incoloro líquido aceitoso claro.

Solubilidad: miscible con **agua**, **acetona**, y **cloroformo**.

Descripción: humectante y disolvente. (49).

1.7.2 PROPILPARABENO

Formula estructural (Figura N° 11)

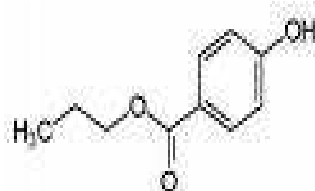


FIGURA N° 11. FÓRMULA ESTRUCTURAL PROPILPARABENO

Sinónimos: Propilparahi-Droxibenzoato, nipasol, protaben, paseptol.

Fórmula química: $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{C}_3\text{H}_7$

Masa molecular: 180 g/ mol

Punto de fusión: 95 - 98

Características organolépticas: polvo cristalino blanco inodoro o con olor característico.

Descripción: Preservante, antimicrobiano

1.7.3 METIL PARABENO

Fórmula estructural (Figura N° 12)

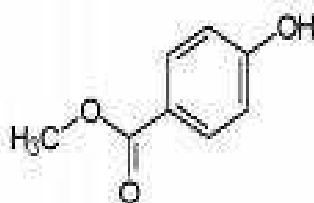


FIGURA N° 12. FORMULA ESTRUCTURAL METIL PARABENO

Nombre sistemático: Metilparabeno Hidroxibenzoato

Fórmula química: HO-C₆H₄-CO₂CH₃

Masa molecular: 152g/mol

Punto de fusión: 125 – 128 °C

Características organolépticas: polvo cristalino blanco, inodoro, girosκόpico.

Solubilidad: soluble en agua, alcohol, éter.

Descripción: preservante utilizado en la Ind. farmacéutica, alimentaria y cosmética.(53)

1.7.4 CARBOPOL

Descripción: Es un polímero del ácido acrílico, de alto peso molecular y carácter aniónico. En solución acuosa, hidroalcohólica y con distintos solventes orgánicos.

Características organolépticas: polvo blanco fino incoloro.

Solubilidad: En agua tiene excelentes propiedades de suspensión, espesamiento y formación de geles.

Descripción: agente gelificante. (35)

1.7.5 TRIETANOLAMINA (TEA)

Nombre sistemático: 2,2',2'' nitritrietanol

Nombre común: Trietanolamina.

Estado Físico: Líquido.

Características organolépticas: líquido incoloro o amarillo pálido viscoso e giroscópico, con ligero olor amoniacal

Peso específico: 1,12 g/cc a 20 °C

Solubilidad: En agua y alcohol, cloroformo y ligeramente soluble en éter o benceno.

Descripción: agente gelificante. (28)

CAPITULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en los siguientes laboratorios:

- Laboratorios de control de calidad de Neo-Fármaco de la ciudad de Ambato
- Laboratorio de farmacia
- Laboratorio de microbiología de alimentos
- Bioterio

Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.2 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas puras de bacterias facilitadas por el Laboratorio de microbiología del Instituto Leopoldo Izquieta Pérez de la ciudad de Guayaquil.

- *S. aureus* ATCC 13709
- *E. coli* ATCC 9637

Ratones blancos *Mus musculus* de ambos sexos de dos meses de edad de 25 a 30 g de peso corporal promedio.

2.2.2 MATERIA PRIMA

Hojas de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), en etapa de maduración y grano de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) en etapa de recolección del proyecto “PIC-05-2006-003” obtenidas de las plantaciones del INIAP, para la obtención de los extractos.

Para la elaboración del gel se utilizó los siguientes excipientes: carbopol, metil parabeno, propil parabeno, propilenglicol, trietanolamina (TEA) y dimetil sulfóxido (MDSO) como solvente de los extractos.

2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO

Erlenmeyer de 250, 500 mL

Balón esmerilado de 250 mL

Embudo

Probetas de 10, 25, 100 mL

Embudo de separación de 500 mL

Pipetas de 1, 10 mL

Vasos de precipitación de 50, 100, 250, 1000 mL

Vidrio reloj

Tubos de 125x12 mm con tapa rosca

Gradilla

Trípode

Asa de inoculación

Pipetas serológicas

Cajas petri de plástico (140x15)

Caja de guantes

Papel filtro

Caja mascarillas

Rollo de algodón

Rollo de papel aluminio

Rollo de gasa

Jeringuillas de 5, 1 cm

Papel de empaque

Cinta adhesiva

Frascos de plástico con tapa rosca de 25 g de capacidad.

2.2.4 EQUIPOS DE LABORATORIO

Rota vapor

Balanza de precisión

Ultrasonido

Molino

Desecador

Estufa a 35-37°C

Baño María

pHmetro

Autoclave

Refrigeradora

Cámara de esterilización UV

2.2.5 REACTIVOS

Éter

Alcohol potable al 96%

Hexano

Dietilamina

Acetato de sodio

Sulfato de sodio

Dimetil sulfoxido.(DMSO)

NaCl (Cloruro de sodio) al 0.85%

Medios: caldo peptona, caldo soya tripticasa (TSB), caldo lauril, agar eosina azul de metileno (EMB), agar soya tripticasa (TSA), agar muller hinton, agar sabouraud dextrosa cloranfenicol, agar plate count (PCA), agar chapman manitol, pruebas bioquímicas.

2.3 METODOLOGÍA

Las metodologías empleadas en este trabajo se encuentran vigentes en algunos países de Latinoamérica, y fueron consultadas de diversas fuentes como las Normas de la OMS (1998), USP 25, USP XXVIII (2002), Miranda (1999), Manuales publicados por la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos, etc., debido a que en nuestro país aún no existe una normativa vigente para el control de calidad de las drogas. (13, 5, 15)

2.3.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.3.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*)

El extracto alcohólico de las hojas secas de chocho fue obtenido por el método de maceración

PROCEDIMIENTO:

- a. Someter a un proceso de secado en una estufa con circulación de aire a 35 ± 2 °C, durante varios días.
- b. Pulverizar la muestra seca.
- c. Colocar las hojas en un recipiente herméticamente cerrado y se adiciona una cierta cantidad de alcohol potable al 96 % hasta que cubra completamente.

- d. Colocar el recipiente en el equipo de ultrasonido.
- e. Una vez transcurrido este tiempo adicionar al extracto alcohólico sulfato de sodio.
- f. Dejar macerar 24 horas.
- g. Filtrar el extracto obtenido.
- h. Concentrar hasta sequedad el extracto alcohólico en el rotavapor a una temperatura de 85°C.
- i. Pesarse la cantidad obtenida de extracto.

2.3.1.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO DEL GRANO DE CHOCHO *(Lupinus mutabilis Sweet)*

PROCEDIMIENTO:

- a. Someter a cocción las semillas enteras de chocho.
- b. Medir el pH del agua de cocción de los chochos.
- c. Ajustar el valor del pH hasta alcalinidad.
- d. Extraer con éter los alcaloides presentes en el agua de cocción.
- e. Evaporar hasta sequedad el extracto etéreo en el rotavapor a una temperatura de 35°C.
- f. Pesarse la cantidad obtenida de extracto.

2.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

2.4.1 DETERMINACIÓN ORGANOLÉPTICA DEL EXTRACTO

Se procede a analizar los siguientes parámetros organolépticos del extracto alcohólico de las hojas, así como del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).

DETERMINACIÓN DE OLOR.-Tomar una tira de papel secante de aproximadamente 1cm. De ancho por 10 cm. de largo e introducir un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

DETERMINACIÓN DEL COLOR.- Tomar un vidrio reloj bien limpio y seco, colocar la muestra de ensayo y observar el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. Se informa los resultados.

DETERMINACIÓN DEL SABOR.- Se determina con procedimientos de degustación, introduciendo una tira de papel secante de aproximadamente 1cm. de ancho por 10cm. de largo en un extremo de la muestra de ensayo.

2.4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

El análisis cromatográfico es una referencia para saber en forma general que compuestos están presentes en determinada muestra. (53)

MATERIALES Y REACTIVOS

- Lámpara UV 365nm
- Cuba cromatografica
- Capilares
- Placas de silicagel
- Solvente: acetato de etilo – hexano–dietilamina (77,5:17,5:5)
- Revelador: reactivo de Wagner -solución de yodo-yoduro de potasio

PROCEDIMIENTO:

- Aplicar 10uL del extracto a una placa cromatografica de silica gel con la ayuda de un capilar, dejar secar después de cada aplicación.
- Introducir la placa en una cuba cromatografica, hasta que el solvente recorra las tres cuartas partes de la placa
- Retirar de la cuba y dejar secar para luego observar a la lámpara UV
- Revelar la placa y dejar secar.
- Observar la placa y valorar los Rf.

2.4.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

- TEST PARA EL CONTAJE DE AEROBIOS INVERTIDO EN PLACA

PROCEDIMIENTO:

1. Diluir 1g del extracto en 10 mL de DMSO al 10%
2. Tomar 1mL de (1) y trasvasar a un tubo que contiene 9 mL de Tween – peptona.
3. Realizar diluciones hasta una concentración de 10^{-3} en tubos que respectivamente contienen 9 mL de Tween – peptona.
4. Tomar 1mL de cada una de las diluciones, colocar en la caja de agar e incorporar 15 mL de soya tripticasa agar.
5. Dejar ambientar por 15 min.
6. Incubar las placas invertidas por 3 días de 29 – 31 °C
7. Observar si existe crecimiento.

- TEST PARA EL RECUENTO DE COLIFORMES MÉTODO NORTEAMERICANO UTILIZANDO LA TÉCNICA NMP

PROCEDIMIENTO:

1. Diluir 1g del extracto en 10 mL de DMSO al 10%
2. Tomar 1mL de (1) y trasvasar a un tubo que contiene 9 mL de Tween – peptona.
3. Realizar diluciones hasta una concentración de 10^{-3} en tubos que respectivamente contienen 9 mL de Tween – peptona.
4. Tomar 1mL de cada una de las diluciones, colocar en los tubos invertidos que contienen 9 mL de calo lauril, colocar tapones.
5. Incubar de 35 – 37 °C; pasadas las 24 horas anotar los tubos con producción de gas, volver a la estufa los tubos negativos por 24 horas mas.
6. Pasadas las 48 horas anotar los tubos que muestran producción de gas.
7. En caso positivo: Transferir una asa de cada tubo sembrando por estriado en EMB, incubar de 24 – 48 horas a 35 – 37 °C.

8. Anotar los resultados obtenidos.

2.5 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXCIPIENTES

2.5.1 CARBOPOL 940 (USP/ XXVIII)

DESCRIPCIÓN.- polvo blanco fino, inodoro

IDENTIFICACIÓN:

- a. Preparar una dispersión de 1:100 con NaOH para producir gel viscoso de pH 7,5.
- b. Prepare una dispersión de 1:100, a una porción añada azul de timol TS produciéndose una coloración naranja. A la otra porción se le añade rojo cresol TS y se produce una coloración amarilla.

VISCOSIDAD.- entre 40.000 y 60.000 centipoises.

PERDIDA POR SECADO.-secar al vacio a 80°C por 1H, del 2% de su peso inicial.

METALES PESADOS.- máximo 0.002%

LIMITE DE BENCENO.- máximo 0.5%

VALORACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS.- 56.0 – 68.0 %.

Pesar 400 mg previamente secos y adicionar 400 mL de agua con agitación constante a 1000 rpm, en un ángulo de 60°. Continuar agitando por 15 min. Reduzca la velocidad de la agitación y titule potenciométricamente con NaOH 0.25N, usando un electrodo de calomel. Después de 1 min. De mezcla, luego de cada adición de NaOH registre el pH. Calcular el contenido de acido carboxílico como porcentaje para la formula.

$\% = 100(45.02 \text{ VP}/\text{peso de muestra})$.

ENSAYO MICROBIOLÓGICO.- ausencia de Salmonella y E. coli.

2.5.2 METIL PARABENO BASE (USP XXIII-FARMACIA REMINGTON 17^a Edición)

DESCRIPCIÓN.- polvo cristalino blanco, inodoro con olor característico, giroscópico.

SOLUBILIDAD.- soluble 1 g en 400 mL de agua en 3 mL de alcohol, y 10 mL de éter.

Soluble en glicerina aceites y grasas, tetracloruro de carbono, benceno.

PUNTO DE FUSIÓN.- entre 125 – 128 °C.

IDENTIFICACIÓN.-En espectro infrarrojo absorbe a la misma λ que la de referencia.

ÍNDICE DE ACIDEZ.- El filtrado neutralizado y enfriado de la solución de 750mg de muestra, al añadir NaOH 0.1 N y 2 gotas de rojo de metilo. La solución es amarilla.

RESIDUO DE IGNICIÓN.- MGA 0671 pierde no mas del 0.05%.

PERDIDA POR SECADO.- Secado sobre el gel de sílice por 5 H, no mas del 5%.

2.5.3 PROPIL PARABENO BASE (USP XXIII --FARMACIA REMINGTON 17ª Edición)

DESCRIPCIÓN.- polvo blanco cristalino, inodoro, con olor característico, higroscópico.

IDENTIFICACIÓN:

- a. Disolver 0.5 g de muestra en 5 mL de agua, acidificar con HCl y filtrar el precipitado resultante. Lavar este con agua y secarlo sobre silica gel durante 5 horas: la absorción en el espectro Ir de una dispersión en aceite mineral exhibe un máximo a la misma λ que lo hace el estándar USP de metil parabeno básico.
- b. Llevar a ignición cerca de 3g de muestra, enfriar y disolver el residuo en 3 mL de HCl 3 N. esta solución impregnada en un asa de platino imparte un intenso y persistente color amarillo a la llama.

pH.- entre 9.5 y 10.5 en una solución 1: 1000

AGUA.- no más del 5%.

CLORUROS.- una porción de 0.2g presenta no mas cloruros que los presentes en 0.1 mL de HCl 0.02N (0.035%).

SULFATOS.- una porción de 0.25g presenta no mas sulfatos que los presentes en 0.3 mL de H₂SO₄ 0.02N (0.12%).

VALORACIÓN.- contiene no menos del 98.5 y no más de 101.5 % de C₁₀H₁₁ NaO₃.

2.5.4 PROPILENGLICOL (USP/XXIII)

DESCRIPCIÓN.- líquido claro incoloro, viscoso y prácticamente inodoro que tiene un sabor ligeramente acre.

SOLUBILIDAD.- miscible con agua, alcohol, acetona y cloroformo, soluble en éter, disuelve a muchos aceites volátiles, no miscible con aceites fijos.

IDENTIFICACIÓN.- identificación IR.

DENSIDAD.- entre 1.035 – 1.037.

ACIDEZ.- no más de 0.20mL de NaOH 0.10N se requieren para neutralizar.

AGUA.- no más del 0.2 %.

RESIDUO DE IGNICIÓN.- no excede de 0.5mg por cada 50g de muestra.

CLORUROS.- no mas cloruros que el correspondiente a 0.007%

SULFATOS.- no mas sulfatos que el correspondiente a 0.006%.

ARSÉNICO.- máximo 3 ppm.

METALES PESADOS.- el limite es 5 ppm.

ENSAYO.-El propilenglicol contiene no menos del 99.05% de $C_3H_8O_2$ método por cromatografía de gas: inyectar 10uL de propilenglicol y registrar el cromatograma. Calcular el % de $C_3H_8O_2$ dividiendo el área bajo la curva del propilenglicol por la suma de las áreas bajo todos los picos, excluyendo aquellas del aire y H_2O , multiplicar por 100.

LIMITES MICROBIOLÓGICOS.- ausencia de Salmonella y E. coli.

2.5.5 TRIETANOLAMINA TEA (FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS V EDICIÓN)

DESCRIPCIÓN.- líquido incoloro o amarillo pálido, viscoso e giroscópico que tiene un ligero olor amoniacal. Se torna café por exposición a la luz y aire.

SOLUBILIDAD.- miscible con agua y alcohol, soluble en cloroformo y ligeramente soluble en éter y benceno.

IDENTIFICACIÓN:

- a. Calentar 1 mL de la muestra lentamente en un tubo de ensayo, los vapores cambian el color del papel tornasol de rojo a azul.
- b. Mezclar 1mL de la muestra con 1mL de HCl; la T° de fusión del precipitado obtenido después de lavarlo con alcohol y secarlo es de $178^\circ C$ aproximadamente.
- c. En una solución al 10% P/V de la muestra en solución de HCl 2N da un precipitado copioso con ácido fosfotungstácico, un precipitado ligero con yodo.

GRAVEDAD ESPECÍFICA.- entre 1.1209.5 y 1.128.

ÍNDICE DE REFRACCIÓN.- entre 1,482 y 1.485.

VALORACIÓN.-para trietanolamina $C_6H_{15}NO_3$, mezclar 500mg de la muestra con 5mL de solución 2M de HCl, evaporar a sequedad en baño maría, agitar el residuo de 2 propanol pasar a un crisol de vidrio tarado y lavar el disco y residuo con 3 porciones de 5mL de 2 propanol. Secar el residuo del crisol aplicando succión después de cada lavado. Secar el residuo a 105°C hasta peso constante y agregar una corrección de 0,2 mg por mL de propanol empleado. Cada gramo es equivalente a 803,5 mg de $C_6H_{15}NO_3$.

LIMITES MICROBIOLÓGICOS.- no procede.

2.6 PROCEDIMIENTO

2.6.1 FORMULACIÓN ESTABLECIDA

Una vez obtenidos los excipientes de la formulación y realizado el control de calidad, se procede a elaborar el lote final.

Cada frasco contiene 25 g de gel, se preparó un lote de 100 g de gel al 1% partiendo de los siguientes excipientes.

- Carbopol
- Trietanolamina
- Propilenglicol
- Metil parabeno
- Propil parabeno
- Dimetilsulfoxido
- Extracto alcaloidal

Fórmula farmacéutica F1:

Cada 100 gramos de gel contiene:

Extracto alcohólico de las hojas de chocho:.....1g

Excipientes.....c.s.p 100g

Fórmula farmacéutica F2:

Cada 100 gramos de gel contiene:

Extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho:.....1g

Excipientes.....c.s.p 100g

2.6.2 PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN

1. Colocar agua destilada en un recipiente adecuado para la formulación del gel.
2. Disolver el carbopol poco a poco en el agua destilada con agitación constante, dejar reposar.
3. Diluir el metil parabeno y el propil parabeno en el propilenglicol.
4. Incorporar el metil y propil parabeno disueltos en propilenglicol al carbopol.
5. Adicionar en DMSO el extracto (alcohólico de las hojas de chocho para la fórmula F1, y etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho para la fórmula F2) y disolver.
6. Agregar la suspensión formada con el DMSO y agitar hasta lograr una mezcla completa.
7. Adicionar poco a poco TEA hasta la formación homogénea del gel.
8. Pesar
9. Envasar el gel.

2.7 CONTROL DE CALIDAD DEL GEL

PARÁMETROS ANALIZADOS

- parámetros organolépticos
- parámetros físicos
- parámetros microbiológicos

2.7.1 PARAMETROS ORGANOLÉPTICOS

PROCEDIMIENTO:

OLOR.- Con una tira de papel secante se introduce en un extremo de la muestra, se percibe y se determina las características de olor presente en el producto.

COLOR.- Se toma una pequeña cantidad de muestra en un vaso de vidrio bien limpio y seco y se observa el color, se informa los resultados.

ASPECTO.- Se determina observando contra luz la presencia de partículas y/o turbidez se analizada mediante visualización directa.

2.7.2 PARAMETROS FÍSICOS

2.7.2.1 DETERMINACIÓN DE LA CONSISTENCIA

Permite determinar las características lipofílicas o hidrofílicas que presenta un producto farmacéutico de uso tópico.

PROCEDIMIENTO:

Se toma una pequeña cantidad de gel con los dedos y se aplica suavemente en el dorso de la mano, se observa firmeza que presenta el gel.

2.7.2.2 DETERMINACIÓN DE LA EXTENSIBILIDAD

Es la capacidad que tiene el gel para ser aplicado y distribuido uniformemente sobre la piel.

PROCEDIMIENTO:

Pesar 2g de muestra, presionar entre 2 superficies de vidrio; se adiciona un peso de 2 Kg, se espera durante 3 min., se mide 8 radios y se calcula el radio promedio, Se halla el área de extensibilidad, con la fórmula $A = \pi * r^2$

2.7.2.3 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

PROCEDIMIENTO:

1. Tomar una muestra representativa del producto e introducir en el viscosímetro.
2. Someter a la acción de una temperatura de 25 °C baño maría.
3. Tomar el tiempo desde el punto de partida hasta la señal indicada en el viscosímetro.

2.7.2.4 DETERMINACIÓN DEL pH

En la práctica, la medición de pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

PROCEDIMIENTO:

Ajuste el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

Los resultados se darán apreciando hasta la décima.

2.7.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

- TEST PARA CONTAJE DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

DILUCIONES

Asépticamente transferir 10g de la muestra en un contenedor adecuado que contiene 90 mL de Tween-peptona.

Realizar diluciones hasta una concentración de 10^{-3} en tubos que respectivamente contienen 9 mL de Tween – peptona.

a. CONTAJE DE BACTERIAS

Transferir 1mL de cada dilución a una caja petri por separado, entonces añadir 15 mL de agar PCA a cada caja, mover la caja con movimientos de rotación para obtener una buena mezcla de la muestra con el agar.

Dejar solidificar e invertir las cajas, incubar de 30-35°C por 24 – 48 horas.

b. CONTAJE DE HONGOS

Proceder como en el punto anterior pero en lugar de utilizar PCA (plate count agar) añadir SAB (sabouraud dextrosa agar) e incubar de 20-25°C por 5 días.

Nota: por separado añadir al medio SAB 0.4 mL de una solución de cloranfenicol (0.005g de cloranfenicol + 10mL de agua).

Al final del periodo de incubación contar el número de colonias y reportar el promedio de bacterias u hongos encontrados por gramo de muestra.

2.8 ANÁLISIS “IN VIVO” DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS GELES

Se tomo la técnica establecida por *Bergamini* (1984), quien utilizó un inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC de *S. aureus* en un modelo experimental de herida infectada. (58)

Se trabajo con ratones blancos *Mus musculus* de ambos sexos, de dos meses de edad de 25 a 30 g de peso corporal promedio, a los que se les realizó una herida epidérmica de 1cm. de diámetro en la parte posterior de la pierna.

Se probó la actividad antibacteriana de los geles de formulación F1 y F2 sobre cepas puras de dos tipos de bacterias:

S. aureus ATCC 13709

E. coli ATCC 9637

Estableciéndose tres unidades de estudio. Los grupos de estudio para cada formulación son los siguientes:

1. **Grupo control negativo:** herida sin tratamiento, gel placebo
2. **Grupo control positivo:** herida tratada con medicamento comercial crema Silvadin (sulfadiazina de platal 1%).
3. **Grupo de estudio:**
 - a. herida tratada con formulación F1 (gel extracto alcohólico de las hojas de chocho).
 - b. herida tratada con formulación F2 (gel extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho).

Se controla a cada animal de la unidad de estudio cada día durante 4 semanas periodo en el cual se produjo la inhibición bacteriana y consecuentemente la cicatrización de la herida.

2.8.1 REACTIVACIÓN E INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS

Los microorganismos no deben tener más de 5 traspasos desde el cultivo ATCC original. Para propósitos del test, una transferencia es definida como el paso de un microorganismo desde el cultivo establecido, a un medio fresco. Los microorganismos recibidos de la ATCC deberán ser resucitados de acuerdo a sus directrices.

PREPARACIÓN DE INÓCULO

Usar una solución salina estéril para la preparación del inóculo de las bacterias.

PROCEDIMIENTO:

- Transferir desde los cultivos stock de los microorganismos a medios de cultivo frescos en tubos inclinados. Trasvasar a dos tubos cada microorganismo.
- Preparar caldo cerebro corazón o TSB para reactivar las bacterias, para lo cual se toma con un hisopo estéril o con asa una muestra del tubo inclinado y se suspende en el caldo el cual actúa como un medio nutritivo para reactivar las bacterias por el lapso de 18 a 24 horas a una temperatura de 35- 37 °C.
- Sembrar en TSA con un hisopo estéril e incubar a 35°C por 18 -24 horas.
- Tomar de 1 a 2 colonias y suspender en 10 mL de suero fisiológico al 0,85%, comparar con la escala de Mc Farland, y a partir de ella llegar a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.
- Inocular 50 uL de la suspensión en la herida provocada en el ratón.

2.8.2 PRUEBA CONFIRMATIVA DE INOCULACIÓN EN LA HERIDA.

PROCEDIMIENTO:

- Una vez que se inoculó las bacterias, en la herida de cada grupo de ratones, hisopar las herida a los 2 días, suspendiendo la muestra en una solución salina al 0.85%.
- Estriar en medios selectivos para cada cepa, e incubar a 35°C por 18 -24 horas.

2.8.3 TRATAMIENTO DE LAS HERIDAS CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA CAUSADA POR LAS BACTERIAS.

PROCEDIMIENTO:

- Limpiar la herida.
- Medir el diámetro de la herida.
- Aplicar el gel.
- El tratamiento se aplica una vez al día, a la misma hora, durante 28 días.

- Hisopar la herida para confirmar la presencia o ausencia de las bacterias.
- Estriar las muestras en medios selectivos e incubar de 35 -37°C de 18-24 horas.
- Como un ensayo confirmativo realizar las pruebas bioquímicas para *E. coli*, y la prueba de manitol para *S. aureus*.

CAPITULO III

3. RESULTADO Y DISCUSIONES

3.1 EXTRACTOS

Para elaborar los fitomedicamentos se realizaron dos extractos:

1. Un extracto alcohólico de las hojas secas de chocho obtenido por maceración.
2. Un extracto de alcaloides totales obtenido de la decocción de la semilla del chocho y una posterior extracción líquido-líquido con éter en medio alcalino.

3.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

El control de calidad de los extractos son parámetros que establecen los requisitos de calidad. La metodología aquí aplicada se realizó de acuerdo a los Métodos de Análisis de Drogas y Extractos de Miranda .M. (1999), Normas de la OMS (1998), Manuales publicados por la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos. (15,5)

3.2.1 DETERMINACIÓN DEL pH

CUADRO Nº 1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DEL pH DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO Y DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES

DEL GRANO DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRA	VALORES DE pH
Extracto alcohólico de las hojas de chocho	5,3

En

Extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho	11
---	----

 el Cuadro N°1 se puede observar que el pH del extracto alcohólico de las hojas de chocho es de 5.3 considerándolo como ligeramente ácido, lo que le confiere solubilidad en agua y en solventes polares. Hay que considerar que en su estado natural, los alcaloides se encuentran en forma de sales solubles en soluciones acuosas, alcohólicas o hidroalcohólicas. (21), mientras que el extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho, para asegurar la extracción etérea de los de los alcaloides totales, tiene un pH alcalino. Este último dato concuerda con la Técnica de extracción de alcaloides con solvente orgánico apolar en medio alcalino, indicando que a un pH de 11 el solvente orgánico aísla los alcaloides totales de otras sustancias que se encuentren en el extracto como pigmentos, compuestos fenólicos y otras impurezas quedando estas retenidas en la fase orgánica. (35)

3.2.2 PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS

CUADRO N° 2. CONTROL ORGANOLÉPTICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO Y DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2008.

EXTRACTO	OLOR	COLOR	SABOR
Extracto alcohólico de las hojas de chocho	Pungente	Verde	Amargo
Extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho	Dulzón	Amarillo claro	Amargo

En el Cuadro N° 2 se aprecia que el extracto alcohólico de las hojas de chocho tiene un olor pungente característico de la planta, mientras que el extracto etéreo de los alcaloides

totales del grano de chocho presenta un olor dulzon, esto se debe a los componentes que poseen los mismos.

El color que presenta el extracto alcohólico de las hojas de chocho es verde oscuro debido a sus pigmentos vegetales tales como la clorofila, mientras que el extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho es de color amarillo.

En lo referente al sabor los dos extractos resultan ser amargos debido a la gran cantidad de alcaloides quinolizidinicos presentes. (51)

3.2.3 CONTROL MICROBIOLÓGICO

CUADRO N° 3. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO Y DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO (*Lupinus Mutabilis Sweet*). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2008.

MUESTRA	MICROOR-GANISMO	MÉTODO	RESULTADO	LIMITE MÁXIMO ACEPTADO UFC/g
Extracto alcohólico de las hojas de chocho	Aerobios mesofilos	Siembra en profundidad	Ausencia	10.000
Extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho	Coliformes totales	Norteamericano utilizando la técnica del NMP	Ausencia	Menos de 100

Límites microbiológicos para hierbas WHO/PHARM (1998)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Cuadro N° 3 se puede observar que en presencia de los dos extractos no existe ningún crecimiento microbiano en los ensayos realizados de aerobios y coliformes totales. (15)

3.2.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO

El análisis cromatográfico es una referencia para saber en forma general que compuestos están presentes en una determinada muestra.

Tanto para extracto alcohólico de las hojas de chocho como para el extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho, se utilizó el sistema de solventes: Acetato de etilo–hexano–dietilamina (77,5:17,5:5), de acuerdo a R. Verpoorte en Chromatography of alkaloids 1983, este solvente permite una mejor separación de los componentes, los mismos que se pueden apreciar mediante la aparición de manchas mas claras que permiten realizar los cálculos del Rf para su identificación.

SISTEMA:

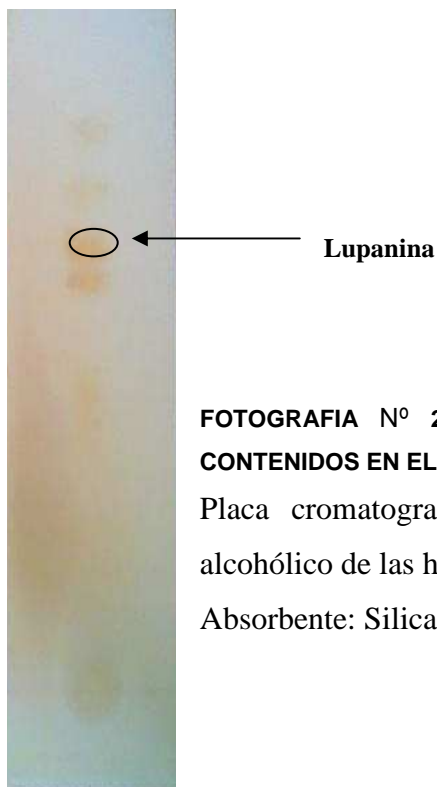
Absorbente : Silica gel 60 F 254

Eluyente : Acetato de etilo – hexano–dietilamina (77,5:17,5:5)

Revelador : Reactivo de Wagner (solución de yodo-yoduro de potasio)

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \rightarrow$$

Según los resultados expresados en el Cuadro N°3 observamos que en la cromatografía de capa fina en base a los cálculos del Rf se identificó a Rf de 0.42 la lupanina, con una mancha naranja característica del compuesto.(53)



FOTOGRAFIA N° 2. PLACA CROMATOGRAFICA DE LOS ALCALOIDES CONTENIDOS EN EL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO

Placa cromatografica de los alcaloides contenidos en el extracto alcohólico de las hojas de chocho,

Absorbente: Silica gel 60 F 254 (Merck).

Eluyente: Acetato de etilo–hexano–dietilamina (77,5:17,5:5)

Revelador: Reactivo de Wagner

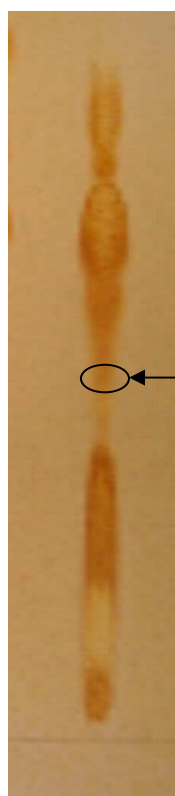
Rf: Lupanina 0.42

CUADRO N° 4. DETERMINACION DEL Rf DE LOS ALCALOIDES CONTENIDOS EN EL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO Y EN EL EXTRACTO ETÉREO DEL GRANO DE CHOCHO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2008.

MANCHA OBSERVADA	CALCULO Rf	COMPUESTO IDENTIFICADO	COLOR
1	$Rf = 2.3/8 = 0.29$	-	-
2	$Rf = 3.35/8 = 0.42$	lupanine	naranja
3	$Rf = 3.9/8 = 0.48$	-	-
4	$Rf = 4.4/8 = 0.55$	-	-
5	$Rf = 5.1/8 = 0.63$	-	-

CHROMATOGRAPHY OF ALKALOIDS R. VERPOORTE (1983)

Según los resultados expresados en el Cuadro N° 4 observamos los cálculos del Rf que se identificaron por cromatografía de capa fina de los compuestos presentes en la muestra del extracto etéreo del grano de chocho, encontrando un Rf de 0.42 correspondiente a la lupanina, con una mancha naranja característica del compuesto. (52)



Lupanina

FOTOGRAFIA N°3. PLACA CROMATOGRAFICA DE LOS ALCALOIDES CONTENIDOS EN EL EXTRACTO ETÉREO DEL GRANO DE CHOCHO

Placa cromatográfica de los alcaloides contenidos en el extracto etéreo del grano de chocho

Absorbente: Silica gel 60 F 254 (Merck).

Eluyente: Acetato de etilo–hexano–dietilamina (77,5:17,5:5)

Revelador: Reactivo de Wagner

Rf: Lupanina 0.42

Al determinar el perfil cromatográfico de los alcaloides totales del extracto etéreo del grano de chocho y del extracto alcohólico de las hojas de chocho, por el método de cromatografía en capa fina, se identificó la Lupanina con un Rf de 0.42, este dato concuerda con los análisis de espectrofotometría de masas realizados en los laboratorios del INIAP en los cuales se identificó y cuantificó a los alcaloides totales del chocho, encontrándose: Lupanina el 2,5 % (en el grano crudo) y el 11,5% (en el extracto).(53)

3.3 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXCIPIENTES

Para el control de calidad de los excipientes se sigue parámetros validados por la USP, los mismos que permiten establecer si cumple o no con los requisitos de calidad en los procesos de elaboración.

Para la elaboración de los geles se requieren los excipientes:

- Carbopol 940
- Metil parbeno
- Propil parabeno
- Propilenglicol
- Trietanolamina. (5)

3.3.1 CARBOPOL 940

CUADRO N° 5. CONTROL DE CALIDAD DEL CARBOPOL 940 (USP XXVIII). DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD. LABORATORIO FARMACEÚTICO NEO-FARMACO. AMBATO. AGOSTO DEL 2008

TIPO DE ANALISIS	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Descripción	Polvo blanco fino, inodoro libre de partículas extrañas	Cumple
Identificación	Pasa las pruebas A y B.	Cumple
Viscosidad	30 500 – 39 400 cp	32 000
Limite de benceno	Máximo 0.5%	Cumple
Perdida por secado	Máximo 2.0%	1.3 %
Metales pesados	Máximo 0.002%	0.0017%
Ensayo grupo carboxilo	56.0 – 68.0 % en base seca	60.8 %

En el cuadro N° 5 se puede ver que se cumple con la especificación establecida por la USP XXVIII.

3.3.2 METIL PARABENO

CUADRO N° 6. CONTROL DE CALIDAD DEL METIL PARABENO (USP XXIII). DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD. LABORATORIO FARMACEÚTICO NEO-FARMACO. AMBATO. AGOSTO DEL 2008.

TIPO DE ANALISIS	ESPECIFICACION	RESULTADO
Descripción	Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, libre de partículas extrañas	Cumple
Solubilidad	Soluble en alcohol, éter, glicerina aceites y grasas, tetracloruro de carbono, benceno	Cumple
Identificación	Pasas las prueba A	Cumple
Acidez	No más de 0.01 de NAOH mL es requerido	Cumple
Residuo de ignición	No más de 0.05%	Certificado de análisis
Punto de fusión	125°C – 128°C	126°C
Ensayo	99.0 – 100.5%	99.06%
Perdida por secado	No más del 5%	4 %

En el cuadro N° 6 se observa que se cumple con la especificación establecida por la USP XXIII.

3.3.3 PROPIL PARABENO

CUADRO N° 7. CONTROL DE CALIDAD DEL PROPIL PARABENO (USP XXIII). DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD. LABORATORIO FARMACEÚTICO NEO-FARMACO. AMBATO.

AGOSTO DEL 2008.

TIPO DE ANALISIS	ESPECIFICACION	RESULTADO
Descripción	Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, libre de partículas extrañas	Cumple
Solubilidad	Soluble en alcohol, éter	Cumple
Identificación	Espectro IR de la muestra es comparable al del St	Cumple
pH	Entre 9.5 – 10.5	9.7
Agua sulfatos	No mas del 5 % pasa la prueba	0.08 % Cumple

En el cuadro N° 7 se muestra que se cumple con la especificación establecida por la USP XXIII.

3.3.4 PROPILENGLICOL

CUADRO N° 8. CONTROL DE CALIDAD DEL PROPILENGLICOL (USP XXIII). DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD. LABORATORIO FARMACEÚTICO NEO-FARMACO. AMBATO. AGOSTO DEL 2008.

TIPO DE ANALISIS	ESPECIFICACION	RESULTADO
Descripción	Líquido claro incoloro viscoso y prácticamente inodoro que tiene un sabor ligeramente acre	Cumple
Solubilidad	Miscible en agua alcohol acetona y cloroformo soluble en éter, disuelve a muchos aceites volátiles, no miscible con aceites fijos.	Cumple
Identificación	Espectro IR de la muestra es comparable al St	Cumple
Densidad	Entre 1.035 – 1.037	1.037
Acidez	No más de 0.20mL de de NaOH 0.10N se requiere para neutralizar	Cumple
Agua	No más del 0.2 %	0.05 %
Residuo de ignición	Máximo 3.5 mg	Cumple
Cloruros	No mas de 0.007 %	Cumple
Sulfatos	No mas del 0.006 %	Cumple
Arsénico	Máximo 3ppm	Cumple
Metales pesados	El limite es 5 ppm	Cumple

En el cuadro N° 8 se observa que se cumple con la especificación establecida por la USP XXIII.

3.3.5 TRIETANOLAMINA

**CUADRO N° 9. CONTROL DE CALIDAD DE LA TRIETANOLAMINA TEA (USP XXIII).
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD. LABORATORIO FARMACEÚTICO
NEO-FARMACO. AMBATO.
AGOSTO DEL 2008.**

TIPO DE ANALISIS	ESPECIFICACION	RESULTADO
Descripción	Líquido claro, incoloro, viscoso, libre de partículas extrañas	Cumple
Identificación	Pasa la prueba A, B, C	Cumple
Gravedad específica a 20°C	1.120 – 1.128	1.126
Índice de refracción	1.481 – 1.486	1.484
Residuo de ignición	No más del 0.1 %	0.03%

En el cuadro N° 9 se muestra que se cumple con la especificación establecida por la USP XXIII.

3.4 CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

El control de calidad del producto terminado tiene como propósito determinar si un producto cumple con las características de calidad previamente establecidos.

Los mismos que conseguirán en última instancia que el medicamento cumpla con el objetivo para el cual fue elaborado.

Para la determinación de los parámetros físicos de los geles:

- Formulación F1 (gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho)

- Formulación F2 (gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho)
Se utilizó como herramienta la media que es una medida de tendencia central y nos permite obtener datos confiables para valorar la calidad del producto terminado.

3.4.1 CONTROL ORGANOLÉPTICO

CUADRO N° 10. CONTROL ORGANOLÉPTICO DE LAS FORMULACIONES EN PRODUCTO TERMINADO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRA	COLOR	OLOR	ASPECTO
F1*	Verde oscuro	Pungente	Buena consistencia
F2**	Amarillo claro	Dulzón	Buena consistencia

F1* gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho

F2** gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho

En el Cuadro N° 10 se observa que el gel de la formulación F1 presenta un color verde oscuro debido a los pigmentos naturales de clorofila presentes en el extracto, mientras que el gel de la formulación F2 es de color amarillo claro, manteniendo así el matiz inicial de los extractos. El olor que presenta la formulación F1 es pungente, mientras que la F2 tiene un olor dulce. Los dos geles poseen una buena consistencia ofreciendo una presentación homogénea en su aspecto.

3.4.2 CONTROL FÍSICO

3.4.2.1 DETERMINACIÓN DEL pH

CUADRO N° 11. VALORES DE pH DE LAS FORMULACIONES EN PRODUCTO TERMINADO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA.

SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRA	RESULTADO	RANGO ACEPTABLE (USP 25)
F1*	6,015	5,5 – 7
F2**	6,69	

F1* gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho

F2** gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho

En los resultados expresados en el Cuadro N° 11 observamos que el pH de las dos formulaciones son ligeramente ácidos y tienden hacia la neutralidad, estos valores resultan ser adecuados para la aplicación en las heridas implicando menos irritación en la piel y por tanto menos molestias físicas por su compatibilidad con el pH de la piel (5 - 5,5). (42), impidiendo el desarrollo de microorganismos patógenos. Al mismo tiempo se encuentran dentro del rango permitido por la USP 25 que es de 5,5 – 7. Fue necesario reajustar los valores iniciales del pH ya que estos eran demasiado básicos, provocando efectos contraproducentes al momento de su uso. Ver anexo N° 1

3.4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA EXTENSIBILIDAD

CUADRO N° 12. VALORES DE EXTENSIBILIDAD DE LAS FORMULACIONES EN PRODUCTO TERMINADO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA.

SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRA	RESULTADO (mm)
F1*	69.44
F2**	65.36

F1* gel extracto alcohólico de las hojas de chocho

F2** gel extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho

En el cuadro N° 12 se puede observar que el promedio de extensibilidad mas alto se obtuvo en el gel de la formulación F1, permitiendo que el gel alcance mejores propiedades de extensibilidad, mientras que el gel de la formulación F2 posee menor extensibilidad.

Estos valores pueden tomarse como referencia para el control de calidad de estos fitomedicamentos. Ver anexo 2

3.4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

CUADRO N° 13. VALORES DE VISCOSIDAD DE LAS FORMULACIONES EN PRODUCTO TERMINADO. LABORATORIO FLUIDOS. FACULTAD DE MECANICA. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRAS	RESULTADO (cp)
F1*	58.70
F2**	55.58

F1* gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho

F2** gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho

Como se puede apreciar en el Cuadro N° 13 los valores de viscosidad concuerdan con los valores obtenidos de extensibilidad en las dos formulaciones, apreciándose que la formulación F1 presenta mayor viscosidad y extensibilidad, mientras que en la formulación F2 posee menor diámetro de extensibilidad y viscosidad además se pueden tomar como referencia para el control de calidad del producto terminado. Ver anexo 3.

3.4.2.4 DETERMINACION DE LA CONSISTENCIA

CUADRO N° 14. VALORES DE CONSISTENCIA DE LAS FORMULACIONES EN PRODUCTO TERMINADO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRAS	RESULTADO
----------	-----------

F1*	Hidrofílico, homogéneo ligeramente untuoso al tacto libre de grumos
F2**	Hidrofílico, homogéneo ligeramente untuoso al tacto libre de grumos
F1* gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho	
F2** gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho	

Como se aprecia en el Cuadro N° 14 las características observadas en los dos geles son muy similares y se pueden tomar como referencia para el control de calidad.

3.4.3 CONTROL MICROBIOLÓGICO

CUADRO N° 15. RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EN LAS FORMULACIONES DEL PRODUCTO TERMINADO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE DEL 2008.

MUESTRA	MICROORGANISMO	MÉTODO	RESULTADO	LIMITE MÁXIMO ACEPTADO UFC/g
F1*	Aerobios mesofilos	Siembra en profundidad	Ausencia	10.000
F2**	Hongos y levaduras	placa en extensión	Ausencia	< 100

F1* gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho

F2** gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chochos

En el cuadro N° 15 se expresa los resultados obtenidos del control microbiológico de los geles, se realizó en base a parámetros establecidos por la USP25 para el recuento de aerobios mesofilos, hongos y levaduras, observándose que no existe crecimiento microbiano, por lo tanto resultan aptos para la aplicación, este parámetro es muy importante para certificar la inocuidad de los geles obtenidos.

3.5.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS GELES DE LA FORMULACIÓN F1 Y FORMULACIÓN F2 EN HERIDAS INFECTADAS CON *E. coli* ATCC 9637 y *S. aureus* ATCC 13709.

El extracto alcohólico de las hojas de chocho y el extracto etéreo del grano de chocho a una concentración de 10 mg/mL, se incorporaron respectivamente como principio activo en la formulación de un gel, el mismo que fue aplicado en la piel de ratones *Mus musculus* (25 g de peso corporal), con infección epidérmica inducida por *E. coli* y *S. aureus*. En este ensayo como control positivo se utilizó la crema silvadin (sulfadiazina de plata al 1%), mientras que los controles negativos lo constituyeron: el gel placebo y un grupo experimental de animales infectados sin tratamiento.

3.5.2.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA DE LAS FORMULACIONES F1 Y F2 AL 1% EN HERIDAS INFECTADAS POR CEPAS DE *E. coli* ATCC 9637

CUADRO N° 16. TEST DE TUKEY PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA DE LAS FORMULACIONES F1 Y F2 AL 1% EN HERIDAS CON INFECCION EPIDÉRMICA CAUSADA POR CEPAS DE *E. coli*. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008.

Categorías	Diferencia	Significativo
T3 ~ T4	5,433	Sí
T3 ~ T5	3,367	Sí
T3 ~ T2	0,767	Sí
T3 ~ T1	0,733	No
T1 ~ T4	4,700	Sí
T1 ~ T5	2,633	Sí
T1 ~ T2	0,033	No
T2 ~ T4	4,667	Sí
T2 ~ T5	2,600	Sí
T5 ~ T4	2,067	Sí

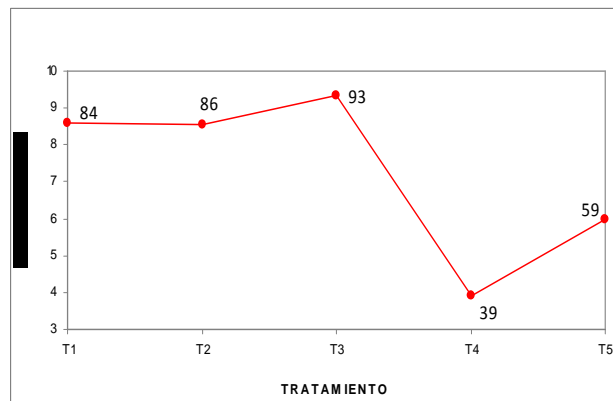


GRAFICO N° 1. CURVA DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACION DE LAS HERIDAS, MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, SOBRE *E. coli*. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008.

Como se observa en el gráfico N°1 según el test de Tukey al analizar las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza del 95 %, obtuvimos los siguientes porcentajes en el proceso de inhibición bacteriana: T1 (gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho al 1%) con el 84%; el tratamiento T2 (gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del agua de cocción del grano de chocho al 1%) correspondiente al 86%; el tratamiento T3 (sulfadiazina de plata al 1%) con el 93%; el tratamiento T4 (animales sin tratamiento) el 39% y el tratamiento T5 (gel placebo) con un 59%, aplicados sobre heridas de 1 cm. de diámetro con infección epidérmica por *E. coli* y tratadas durante cuatro semanas.

Se encontró que entre los tratamientos T1-T2 y los tratamientos T3-T1 no existe una diferencia significativa comprobando que estadísticamente son iguales. Ver Cuadro N° 16, Gráfico N° 1, Anexo N°1

3.5.2.2 DERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA DE LAS FORMULACIONES F1 Y F2 AL 1% EN HERIDAS INFECTADAS POR CEPAS DE *S. aureus* ATCC 13709.

CUADRO N° 17. TEST DE TUKEY PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA DE LAS FORMULACIONES F1 Y F2 AL 1% EN HERIDAS CON INFECCION EPIDÉRMICA CAUSADA POR CEPAS DE *S. aureus*. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008.

Categorías	Diferencia	Significativo
T3 ~ T4	4,867	Sí
T3 ~ T5	2,767	Sí
T3 ~ T1	0,667	No
T3 ~ T2	0,567	No
T2 ~ T4	4,300	Sí
T2 ~ T5	2,200	Sí
T2 ~ T1	0,100	No
T1 ~ T4	4,200	Sí
T1 ~ T5	2,100	Sí
T5 ~ T4	2,100	Sí

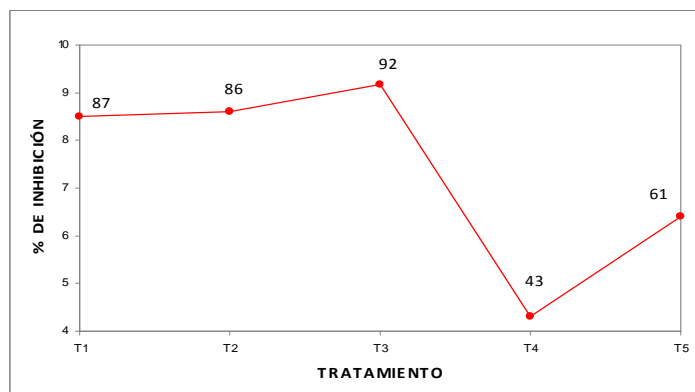


GRAFICO N° 2. CURVA DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS, MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, SOBRE CEPAS DE *S. aureus* ATCC 13709. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008.

Como se aprecia en el gráfico N° 2 según el test de Tukey al analizar las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95 %, demuestra que el tratamiento: T1 (gel del extracto alcohólico de las hojas de chocho al 1%) con el 87%, el tratamiento T2 (gel del extracto etéreo de los alcaloides totales del agua de cocción del grano de chocho al 1%) correspondiente al 86%, y el tratamiento T3 (sulfadiazina de plata al 1%) con el 92%, aplicados sobre heridas de 1 cm. de diámetro con infección epidérmica por *S. aureus* y

tratadas durante cuatro semana, son iguales estadísticamente, en comparación con el tratamiento T4 (animales sin tratamiento) con el 43%, y el tratamiento T5 (gel placebo) con el 61%; en los cuales su porcentaje de inhibición bacteriana es estadísticamente menor. Ver Cuadro N° 17, Gráfico N° 2, Anexo N°2

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Mediante la determinación del perfil cromatográfico de los alcaloides totales contenidos en los extractos por el método de cromatografía en capa fina se comprobó que el compuesto más representativo es el alcaloide de la lupanina con 42%.
2. El análisis estadístico del porcentaje de inhibición bacteriana y cicatrización de las heridas de 1 cm. de diámetro con infección epidérmica causada por *E.coli* ATCC 9637 y tratadas durante 4 semanas, se ha encontrado que entre los tratamientos T1-T2 y T3-T1, no existe una diferencia significativa, lo mismo ocurre para heridas con infección epidérmica causada por *S. aureus* ATCC 13709, tratadas en las mismas condiciones, debido a que los tratamientos T1, T2 y T3, presentan similar actividad. Por lo tanto se puede utilizar cualquiera de ellos para lograr un tratamiento eficaz.
3. Se comprueba la hipótesis planteada pues el gel elaborado del extracto alcaloidal del chocho cumple con los requisitos de calidad y eficacia terapéutica.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar otro tipo de presentaciones farmacéuticas como cremas, ungüentos en los cuales se pueda comprobar si el principio activo tiene la misma eficacia terapéutica.
2. Continuar la investigación con estudios de estabilidad y del periodo de vida útil de los dos geles, considerando el tiempo de conservación.
3. Efectuar trabajos de investigación sobre la toxicidad en los extractos alcaloidales del chocho para determinar otros posibles efectos farmacológicos.
4. Realizar investigaciones que permitan aprovechar subproductos que se desechen o que puedan causar contaminación ambiental, contribuyendo de esta manera a la salud pública y al ecosistema.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, con el financiamiento del SENACYT e INIAP con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana de un gel obtenido del extracto alcaloidal del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), utilizando el agua de desamargado del chocho que es un subproducto de desecho. Se trabajó con los extractos: alcohólico de las hojas de chocho obtenido por maceración y etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho obtenido por extracción líquido-líquido con éter. Se determinaron parámetros físicos, organolépticos y microbiológicos. Para la elaboración de los geles se realizaron dos formulaciones, en la formulación F1 se adicionó el extracto alcaloidal de las hojas de chocho y en la formulación F2 se adicionó el extracto etéreo de los alcaloides totales del grano de chocho. El control de calidad de los geles se realizó en base a parámetros establecidos por la USP 25. La actividad antibacteriana de los geles frente al control positivo de la crema Silvadin (sulfadiazina de plata), a una concentración del 1%, aplicados diariamente sobre heridas de 1cm de diámetro con infección epidérmica causada por *E.coli* ATCC 9637 en ratones *Mus musculus* durante 4 semanas se obtuvo los siguientes porcentajes de inhibición bacteriana: 84%, 86% y 93% respectivamente; para heridas con infección epidérmica causadas por *S.aureus* ATCC 13709, en las mismas condiciones se obtuvo: el 87%, 86% y 92%. Comprobando que los dos geles y la crema tienen similar actividad antibacteriana.

SUMMARY

The present investigation was carried out in the Science Faculty Lab of the ESPOCH with the SENACYT and INIAP funding to evaluate the antibacterial activity of a gel obtained from the alkaloid extract of the lupine (*Lupinus mutabilis Sweet*) using the de-bittering water from the lupine which is a waste byproduct. The following extracts were used: alcoholic one from the lupine leaves obtained by maceration and the etereuos one from the total alkaloids from the lupine grain obtained by liquid-liquid extraction with ether. The physical, organoleptic and microbiological parameters were determined. For the gel elaboration two formulations were carried out. In formulation 1, the alkaloid extract from the lupine leaves was added and in the formulation 2 the etereous extract of total alkaloids from the lupine grain was added. The gel quality control was performed on the basis of parameters established by the USP 25. The antibacterial activity of the gels against the positive control of the Silvadin cream (silver sulfadiazine) at 1% concentration, applied daily to 1cm wounds with epidermic infection caused by *E. coli* ATCC 9637 in mice *Mus Musculus* was observed during four weeks. The following percentages of bacterial inhibition were obtained: 84%, 86% and 93% respectively; for the wounds with epidermic infection caused by *S. aureus* ATCC 13709 in the same conditions, 87%, 86% and 92% were obtained. The two gels and the cream have a similar antibacterial activity.

CAPITULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

7.1 GENERAL

1. ALLAUCA, U. 2005. Desarrollo de la tecnología de elaboración de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), germinado fresco para aumentar el valor nutritivo del grano. Tesis Dra. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 37-41
2. CANDO, M. 2006. Comparación del efecto cicatrizante de geles elaborados a base de propóleo y caléndula en heridas de conejos. Tesis Dra. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 49-53
3. CHAPALBAY, E. 2006. Elaboración de un gel de aloe para tratamiento del acné. Tesis Dra. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 101-115
4. COBOS, R. 2004. Obtención de extractos vegetales y evaluación de su eficiencia en el control de *Meledoigyne incognita*. Tesis Dr. Biología. Quito. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. pp. 20-24

5. CONVENTION PHARMACOPEIAL. 2004. USP N° 25. preparat by the council of experts and published by the board of trustees official from january I. United States. Washington. pp. 1568-1590
6. GAVILANES, M. 2003. HACCP para la planta de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y especificaciones de calidad del grano. Tesis Dr. En Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 92-95.
7. GROOS, R. 1982. El cultivo y la utilización de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*). FAO. Roma. pp. 150-156.
8. GUERRERO, M. 1987. Algunas propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). memorias de los eventos de información y difusión de resultados de investigación sobre chocho y capacitación en nuevas técnicas de laboratorio. Quito. pp. 10. (fotocopia)
9. GUZMÁN, M. 1987. Algunas propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).evento de información y difusión de resultados de investigación sobre chocho y capacitación en nuevas técnicas de laboratorio. Ambato: CONACYT/EMP/IIT. pp. 1-3.
10. JARRÍN, P. 2003. Tratamiento del agua de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. Tesis Dra. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 20-41.
11. LARA, K. 1999. Estudio de alternativas para el desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Tesis Dr. en Química. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Doctorado en Química. pp. 223

12. MERINO, C. 1989. Análisis de aminoácidos y azúcares libres en chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) durante el tratamiento previo al consumo. Tesis Dr. en Química. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Doctorado en Química. pp. 98
13. MIRANDA, M. 1996. Métodos de análisis de drogas y extractos. Habana-Cuba: Instituto de Farmacia y Alimento. pp. 6-34.
14. OROZCO, R. 2005. Elaboración de gel, pomada y crema antiviral de bidens pilosa con el control de calidad. Tesis Dr. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 100
15. VILLACRECES, L. 1996. Estudio de la actividad antimicrobiana en extractos metabólicos en 6 plantas de la flora ecuatoriana. Tesis Dr. en Química. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Doctorado en Química. pp. 88-89
16. WHO. 2002. Medicina tradicional. necesidades crecientes y potencial. Genova: Policy perspectives in medicine. pp. 26

7.2 ESPECÍFICA

17. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
<http://www.medicina.edu.pe/actividadantibacterianal/schtdata/temlib.htm>.
20070613.
18. AFECCIONES DE LA PIEL/ E. coli
<http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/367/1/Estafilococo-aureus-meticillin-resistente-Un-reto-en-la-terapia-antimicrobiana.html>
20080615

19. ALCALOIDES QUINILIZÍNICOS.
[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia
/general/gp000011.nsf/voDocumentos/C/\\$File/web_alcaloides.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/C/$File/web_alcaloides.htm)
20070609
20. ANTIBIOTERAPIA
<http://Settings\http://www.oscar.ruiz.com/articulos/antibioterapia3.html>
20070528
21. ANTIMICROBIALES
<http://www.patologiasmicribiana.org/publications/Web/103/ch2.htm>
20070528.
22. ARANGO, G. 2002. Alcaloides y compuestos nitrogenados
<http://www.farmacia.unal.edu.co/V35N2-02.pdf>,
20080710
23. ARIAS, D. 1999. Glosario de medicamentos. desarrollo, evaluación y uso. 4a.ed.
Mexico: Limusa. pp. 1547
24. BACTERIAS Y SU ACTIVIDAD
[http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/367/1/Estafilococ
o-aureus-meticillin-resistente-Un-reto-en-la-terapia-antimicrobiana.html](http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/367/1/Estafilococ-o-aureus-meticillin-resistente-Un-reto-en-la-terapia-antimicrobiana.html)
20070528
25. BERTRAN, G. 1989. Farmacología básica y clínica: mecanismo de acción de los
alcaloides. 2a.ed. México: Manual Moderno. pp. 621
26. CAUSANTES ANTIMICROBIANOS
http://www.danival.org/microclin/antibiot/_madre_antibiot.html
20080528
27. CHOCHO
<http://www.productoandino.org/alcaloides/crecivege.htm>
20070609
28. CONTROL DE CALIDAD
<http://www.calidad/eucerin.es/produc/galening.html>
20070617

29. CONTROL DE FORMULACIONES

<http://www.ffyb.uba.ar/farmacotecnia%2014/controlformulaciones%.htm>
20070617

30. CULTIVOS ANDINOS FAO

http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/ /libro10/cap03_1_3.htm.
20080615

31. DAR, A. 1981. Tecnología farmacéutica: elasticidad de los geles. 4a.ed. España: Acribia. pp. 547

32. EXCIPIENTES

http://www.propiedades/excipientes/presentan/medicamento.ap3_3_83htm
20070619

33. FERNANDEZ, P. Fármacos basados en productos naturales de origen microbiano

<http://www.portalfarma.com/pfarma/taxgonomia /general/gp000011.nsf>
20070619

34. FORMAS FARMACÉUTICAS

<http://www.propiedades/caracteristicasde las formas farmacéuticas.com / fewfunds /lanced.htm>
20070619

35. FUNDACYT servicio informativo

<http://www.elmercurio.com.ec/web/titulares.php>
20070514

36. IRAIZOZ, A. 1989. Conferencias de tecnología farmacéutica. 2a.ed. Habana: Universal. pp. 89

37. JARA, P. Crecimiento vegetativo de frambuesa con lupinus

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/biologia/v10_n1/creci_vege.htm
20070514.

38. JÁTIVA, C. 2000. Farmacognosia texto básico. Riobamba: CDR-XEROX ESPOCH. pp. 55-58.
39. MANDEL, S. Terapia tópica
http://es.wikipedia.org/wiki/ADa_1%C3%ADquida_de_alta_resoluci%C3%20080607
40. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS
bacterias\ccoli\internet\AUREUS\Noticias Prometedora estrategia para prevenir las infecciones por Staphylococcus aureus.mht
20070514
41. MIMS, C. 1999. Microbiología medica. 2a.ed. España: Harcourt Brace. pp. 25
42. MODELO DE HERIDA INFECTADA
[http://enfermedad_bacterianas/12kjuAUREUS\COLINueva_\(2\)\Revista Cubana de Medicina Militar - Modelo de herida infectada.mht](http://enfermedad_bacterianas/12kjuAUREUS\COLINueva_(2)\Revista_Cubana_de_Medicina_Militar_-_Modelo_de_herida_infectada.mht)
20070514
43. PELCZAR, M. 1977. Microbiología de PELCZAR. 2a.ed. México: Graw Hill. pp. 559
44. PRESCOTT, M. 2004. Microbiología. 5ta.ed. México: Hill Interamericana. pp. 667-999
45. PROMETEDORA ESTRATEGIA
http://www.em/2kjhg_el/patógeno/manipuladores_/CONSUMER_.mht
20070619
46. REMINGTON. 1998. Farmacia. 19a.ed. Buenos Aires: Médica. pp. 29
47. RUITÓN, F. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus* con actividad antibacteriana y antifúngica
http://www.alcaloidesyflavonoidesconactividad_comCONSUMER_es.mht
20080329

48. SANCHEZ, Z. Tarwi otra maravilla peruana
[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4066E9867F569FCDC12572D70033C34C/\\$File/302_plantas.htm?OpenElement](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4066E9867F569FCDC12572D70033C34C/$File/302_plantas.htm?OpenElement).
20080916
49. VERPOORTE, R. 1983. Chromatography of alkaloids. New York: Grawers.
volumen 23A. pp. 70,71
50. VOIGT, R. 1982. Tecnología farmacéutica. 2a.ed. Sevilla: Acribia. pp. 300

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO Nº 1. UNIDADES DE ESTUDIO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA, DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, APLICADOS EN LA PIEL DE RATONES CON INFECCION EPIDÉRMICA CAUSADA POR CEPAS DE *E. coli*. ATCC 9637.

Semanas	GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	
	T1	T2	T3	T4	T5
	Formulación F1	Formulación F2	Sulfadiazina de plata	Animales sin tratamiento	Gel placebo
	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)
1	2,3	2,2	2,7	0,2	1,5
2	5,4	5,4	6,0	1,3	2,3
3	7,0	7,1	7,8	2,8	3,9
4	8,4	8,6	9,3	3,9	5,9

ANEXO Nº 2. UNIDADES DE ESTUDIO PARA ESTABLECER EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA DE LOS TRATAMIENTOS, APLICADOS EN LA PIEL DE RATONES CON INFECCION EPIDÉRMICA CAUSADA POR CEPAS DE *S. aureus*. ATCC13709.

Semanas	GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	
	T1	T2	T3	T4	T5
	Formulación F1	Formulación F2	Sulfadiazina de plata	Animales sin tratamiento	Gel placebo
	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)
1	2,2	2,4	2,7	0,5	1,8
2	5,7	5,5	6,1	1,9	3,0
3	7,4	7,2	8,0	3,4	4,1
4	8,7	8,6	9,2	4,3	6,1

ANEXO Nº 3. DETERMINACION DE LOS VALORES DE pH DE LOS EXTRACTOS

REPETICIONES	pH EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO	pH EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO
1	5,30	11.0
2	5,29	11.0
3	5,31	11.04
4	5,30	10.98
5	5,30	11.0
	X= 5,3	X= 11.00

ANEXO Nº 4. DETERMINACION DE LOS VALORES DE pH DE LAS FORMULACIONES.

REPETICIONES	pH GEL DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO	pH GEL DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO
1	6,01	6,69
2	6,01	6,70
3	6,02	6,68
4	6,02	6,69
5	6,02	6,68
	X= 6,015	X= 6,69

ANEXO Nº 5. DETERMINACION DE LOS VALORES DE EXTENSIBILIDAD DE LAS FORMULACIONES

REPETICIONES	GEL DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO	GEL DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO
1	69.45	65.36
2	69.43	65.36
3	69.44	65.37
	X= 69,44	X= 65.36

ANEXO Nº 6. DETERMINACION DE LOS VALORES DE VISCOSIDAD DE LAS FORMULACIONES.

REPETICIONES	GEL DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO	GEL DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO
1	58.69	55.58
2	58.71	55.57
3	58.70	55.58
	X= 58.70	X= 55.58

ANEXO Nº 7. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2008.



FOTOGRAFIA Nº 4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO 1. MACERACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHOLICO EN EL ULTRASONIDO 2.CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO EN EL ROTAVAPOR.

ANEXO Nº 8. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE (*Lupinus mutabilis Sweet*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2008.



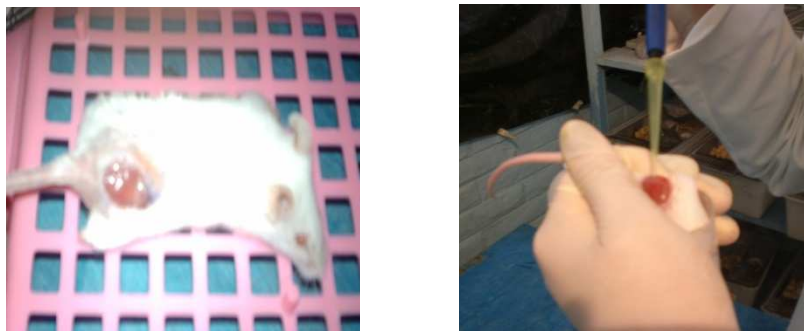
FOTOGRAFIA Nº 5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO 1. COCCION DEL GRANO DE CHOCHO 2. EXTRACCÓN DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL AGUA DE COCCION CON ÉTER.

**ANEXO Nº 9. PRESENTACIÓN DE LOS GELES ANTIBACTERIANOS DE USO TÓPICO AL 1%.
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS.
ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2008.**



FOTOGRAFIA Nº 6. GELES ANTIBACTERIANOS DE USO TÓPICO AL 1% 1. GEL DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHOCHO 2. GEL DEL EXTRACTO ETÉREO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE CHOCHO.

**ANEXO Nº 10. HERIDA EN RATONES *Mus musculus* CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA. INDUCIDA POR
CEPAS DE *S. aureus*. ATCC 13709 Y *E. coli* ATCC 9637. BIOTERIO. FACULTAD DE
CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008**



**FOTOGRAFIA Nº 7. HERIDAS EN RATONES *Mus musculus* CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA
INDUCIDA POR CEPAS DE *S. aureus*. ATCC 13709 Y *E. coli* ATCC 9637** 1. HERIDA DE 1cm DE DIÁMETRO 2. INOCULACION DE LAS BACTERIAS EN LA HERIDA PROVOCADA.

ANEXO Nº 11. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE HERIDAS DE 1cm DE DIAMTRO CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA PROVOCADA POR *E. coli* ATCC 9637. BIOTERIO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008



FOTOGRAFIA Nº 8. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE HERIDAS CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA PROVOCADA POR *E. coli* 1. DIA 1 INICIO DEL TRTAMIENTO 2. DIA 28 CICATRIZACIÓN DE LA HERIDA

ANEXO N° 12. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE HERIDAS DE 1cm DE DIAMTRO CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA CAUSADA POR *S. aureus*. ATCC 13709. BIOTERIO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE DEL 2008.



FOTOGRAFIA N° 9. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE HERIDAS CON INFECCIÓN EPIDÉRMICA PROVOCADA POR *S.aureus* 1. DÍA 1 INICIO DEL TRTAMIENTO 2. DIA 28 CICATRIZACIÓN DE LA HERIDA.