



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“FORMULACIÓN DE UN GEL COSMECÉUTICO ANTIACNÉ A BASE DE  
EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA (*Caléndula officinalis*) Y  
PROPÒLEO”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**LUIS ENRIQUE MORA ANCHATUÑA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

### **DEDICATORIA**

*El siguiente trabajo de tesis previa la obtención del Título De Bioquímico Farmacéutico está dedicado en primer lugar a mis padres; pero de manera muy especial a mi madre, por siempre haber creído en mí, apoyarme moralmente en los momentos que más necesitaba. A mis hermanos y, sobrinos que fueron mi aliento en los momentos más duros que me tocó vivir. A Dios y a la vida por brindarme una segunda oportunidad, y a todas las personas que me ayudaron cuando hacía falta y sin compromiso alguno.*

### **AGRADECIMIENTO**

*A mi familia por ser la luz que guio mi camino en los momentos más difíciles y oscuros de mi vida.*

*Agradezco a la institución por haberme preparado para esta etapa en la que veo culminada mi profesionalización, a los profesores que fueron mi guía durante el tiempo de preparación en las aulas, a mis amigos y compañeros que me acompañaron durante este hermoso ciclo de mi vida.*

*A la Dra. Susana Abdo por ser mi tutora de tesis sin ningún re paro, al Dr. Francisco Portero por haberme colaborado en todo lo que pudo durante la realización de mi trabajo de titulación, al Dr. Oswaldo Duque por los buenos consejos que me regalo sin esperar recibir nada a cambio.*

*Y en especial a Dios por haberme creado y puesto en el camino de todos ustedes y a la vida, por regalarme una segunda oportunidad y permitirme estar en este momento junto a ustedes y escribir esto para ustedes.*

*¡GRACIAS A TODOS!*

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**FORMULACIÓN DE UN GEL COSMECEUTICO ANTIACNÉ A BASE DE EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA (*Caléndula officinalis*) PROPÒLEO**”, de responsabilidad del señor egresado Luis Enrique Mora Anchatuña ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez L <b>DECANO FACULTAD DE CIENCIAS</b>	_____	_____
Dr. Francisco Portero <b>DIRECTOR DE ESCUELA</b>	_____	_____
Dra. Susana Abdo <b>DIRECTOR DE TESIS</b>	_____	_____
Dr. Francisco Portero <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
<b>DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN</b>	_____	_____
<b>NOTA DE TESIS ESCRITA</b>	_____	

Yo, **Luis Enrique Mora Anchatuña**. Soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

LUIS ENRIQUE MORA ANCHATUÑA.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza.
°C	Grados Celsius
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cp	Centipoice
CMC	Carboximetilcelulosa.
FDA	Food and Drugs Administration
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico.
kg	Kilogramo
L	Litro
MNF	Moisture Natural Factor
mg	Miligramos
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado.
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones Por Minuto.
TEA	Trietanolamina
UE	Unión Europea.
UFC	Unidades formadoras de colonia.
USDA	United State Departament of Agriculture
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE FOTOFRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

<b>1</b>	<b>PARTE TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Cosmético.....	1
1.1.1	Componentes de los cosméticos.....	1
1.2.	Cosméceutica.....	3
1.2.1.1	Cosmético natural.....	4
1.2.1.2	Certificaciones para cosméticos naturales.....	5
1.3	Propóleo.....	6
1.3.1	Composición química del propóleo.....	7
1.3.2	Usos medicinales.....	8
1.4	Caléndula.....	9
1.4.1	Nombre científico.....	9
1.4.2	Nombre común.....	9
1.4.3	Clasificación científica.....	9
1.4.4	Descripción botánica.....	10
1.4.5	Usos y propiedades.....	10
1.4.6	Principios activos.....	10
1.5	Flavonoides en cosmética.....	11
1.5.1	Características cosméticas de los flavonoides.....	11
1.6	Geles.....	13
1.6.1	Características.....	13
1.6.2	Clasificación.....	13
1.6.2.1	Hidrogeles.....	14
1.6.2.2	Oleogeles.....	15
1.6.3	Agentes Gelificantes.....	15
1.6.3.1	Carbopol.....	15
1.6.3.2	Carboximetilcelulosa.....	16
1.6.3.3	Trietanolamina.....	16
1.6.4	Control de calidad de los geles.....	17
1.6.4.1	Homogeneidad.....	17
1.6.4.2	Potencial hidrogeno.....	18
1.6.4.3	Propiedades reológicas.....	18
1.6.4.4	Estabilidad.....	18
1.7	Piel.....	18
1.7.1	Características de la piel.....	19
1.7.2	Funciones de la piel.....	19

1.7.3	Partes de la piel.....	20
1.7.4	Lípidos intercelulares.....	22
1.7.5	Tipos de piel.....	23
1.7.5.1	Piel normal.....	24
1.7.5.2	Piel seca.....	24
1.7.5.3	Piel grasa.....	25
1.7.5.4	Piel mixta.....	25
1.8	Acné.....	25
1.8.1	Etiopatología.....	26
1.8.1.1	<i>Propionobacterium acnes</i> .....	27
1.8.1.2	Bacterias oportunistas en el acné.....	28
1.8.2	Clasificación del acné.....	30
1.8.2.1	Formas de acné.....	30
1.8.2.2	Tipos de acné.....	31
1.8.3	Tratamientos.....	32
<b>2</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
2.1	Lugar de investigación.....	34
2.2	Factores de estudio.....	34
2.3	Materiales, equipos y reactivos.....	34
2.4	Técnicas.....	36
2.4.1	Obtención de los extractos.....	36
2.4.2	Control de calidad de los extractos.....	39
2.4.3	Tamizaje fitoquímico.....	41
2.4.4	Concentración mínima bactericida.....	43
2.5	Formulación del gel.....	44
2.6	Control de la estabilidad del gel.....	45
2.6.1	Propiedades organolépticas.....	45
2.6.2	Propiedades fisicoquímicas.....	46
2.6.3	Estudio de estabilidad acelerada.....	49
2.6.3.1	Determinación de flavonoides totales.....	51
2.7	Metodología.....	51
2.7.1	Fase de campo.....	51
2.7.2	Fase de laboratorio.....	52
2.7.3	Formulación de gel cosmecéutico.....	52
2.8	Diseño experimental.....	54
2.9	Análisis estadístico.....	55
<b>3.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>



## ÍNDICE DE CUADROS.

CUADRO N° 01	Tabla de dilución para los extractos.	43
CUADRO N° 02	Condiciones de temperatura, estabilidad acelerada	50
CUADRO N° 03	Matriz experimental	55
CUADRO N° 04	Características de la materia prima para la obtención de los extractos.	57
CUADRO N° 05	Cálculo del porcentaje de impurezas macroscópicas de la materia prima antes de la obtención de los extractos.	58
CUADRO N° 06	Análisis organoléptico de los extractos hidroalcohólicos de flores de caléndula y propóleo.	59
CUADRO N° 07	Características físico-químicas de los extractos hidroalcohólicos de flores de caléndula y propóleo.	59
CUADRO N° 08	Resumen de los metabolitos identificados en el tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos.	60
CUADRO N° 09	Datos promedios de la evaluación del efecto microbicida de los extractos hidroalcohólicos: de flores de caléndula y propóleo.	61
CUADRO N° 10	Parámetros organolépticos para distintas formulaciones de gel	63
CUADRO N° 11	Parámetros físicoquímicos para distintas formulaciones de gel	64
CUADRO N° 12	Recuento aerobios mesófilos y coliformes totales.	66
CUADRO N° 13	Medición de flavonoides antes y después del periodo de estabilidad acelerada	67

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 01	Impurezas en la materia prima.	58
GRÁFICO N° 02	Tabla ANOVA	62
GRÁFICO N° 03	pH en función de concentración de matriz gelificante	64
GRÁFICO N° 04	Viscosidad en función de carbopol	65
GRÁFICO N° 06	Relación entre índices de viscosidad y extensibilidad.	65
GRÁFICO N° 07	Curva de calibración para estándar de quercetina.	67
GRÁFICO N° 08	Curva de disminución de flavonoides totales	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 01	Estructura básica de los flavonoides.	11
FIGURA N° 02	Estructura química del carbopol.	16
FIGURA N° 03	Estructura química del CMC	17
FIGURA N° 04	Estructura química del TEA	17
FIGURA N° 05	Partes de la Piel	20
FIGURA N° 06	Canales intercelulares de la piel.	22

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 01	Propóleo	6
FOTOGRAFÍA N° 02	Flor de caléndula.	9
FOTOGRAFÍA N° 03	Secuelas del acné	26
FOTOGRAFÍA N° 04	Puntos blancos	30
FOTOGRAFÍA N° 05	Acné Rosaceo.	32

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Obtención de los extractos estandarizados de flores de caléndula y propóleo mediante rota-vapor.	81
ANEXO B	Tabla de ensayos colorimétricos en los extractos obtenidos	81
ANEXO C	Determinación de la concentración mínima microbiciada	82
ANEXO D	Geles formulados	83
ANEXO E	Control de calidad gel formulado	83
ANEXO F	Estabilidad acelerada.	83

## INTRODUCCIÓN

El cuidado de la piel es una de las actividades principales realizadas por el ser humano, es tanta su importancia que se la ubica en cuarto lugar después de respirar, beber y comer. Una piel bien cuidada es símbolo de buena salud, y estatus social. Razón por la cual a nivel global se invierten miles de millones de dólares en productos y procedimientos cosméticos para mantenerla bella, sin importar el paso del tiempo biológico del ser humano.

El acné es un padecimiento muy común que afecta al 74% de los jóvenes entre 12 y 18 años y a más del 30% de quienes sobrepasan los 25 años de edad; como consecuencia de cambios hormonales que aumentan la producción de grasa, estrés, algunos fármacos y algunos alimentos; padecimiento que ataca como enfermedad hasta los 40 años. Patología transitoria en la mayoría de casos y crónica en el peor de los casos, y la cual contribuye de forma significativa a problemas de ámbito psicosocial como depresión, ansiedad y aislamiento.

Para resolver este inconveniente en los últimos años se desarrolló un sin número de procedimientos químicos farmacológicos basados en el uso de antibióticos sintéticos o semi-sintéticos usados de manera tópica o sistémico; así como también procedimientos físicos de dermoabrasión que usan calor y terapia láser que no están al alcance de todos los sujetos que padecen este cuadro clínico.

Los cosméticos son las sustancias fáciles de usar, presentes en varias formas, que tienen una alta distribución y demanda en el planeta, son utilizados por todas las personas sin importar la raza, religión, o clase social. Sin embargo con el actual interés creciente de la población en lo relacionado al respeto al medio ambiente, muchas personas están dejando de lado el uso de cosméticos convencionales que tienen sustancias químicas y sus productos derivados en su composición. Tendencia que ha dado origen a la creciente solicitud por los cosméticos naturales, cosméticos funcionales o *Cosméuticos*, que a su vez llevan a una creciente demanda de extractos derivados de las plantas medicinales o que tienen algún efecto beneficioso conocido.

Varios estudios realizados muestran los efectos microbicidas que presentan los extracto de propóleo y los pétalos de caléndula; debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios presentes, entre los que se destacan los flavonoides algunos de los cuales presentan la característica antes mencionado y que constituyen la base funcional y primordial en la formulación del gel cosméutico propuesto en este estudio.

Esta investigación se desarrolló en los laboratorios de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias y CITEFARM de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y tiene por objeto la formulación de un gel cosméutico con una concentración determinada de extractos de flores de caléndula, y propóleo previa evaluación de la Concentración Mínima Bactericida.

Se realizaron cuatro formulaciones en las que el ingrediente que se vario fue la concentración del agente gelificante (Carbopol Ultrez 10), manteniéndose constante la cantidad de extracto calculado y los otros ingredientes cosméticos usados agentes humectantes y despigmentantes. En cada formulación se midieron parámetros organolépticos y fisicoquímicos en los que se incluyeron medidas reológicas de viscosidad y extensibilidad que son las principales determinaciones que definen la calidad y estabilidad del producto formulado.

# CAPÍTULO I

## 1. PARTE TEÓRICA

### 1.1 COSMÉTICO

Un cosmético es una sustancia usada para mantener, limpiar, y embellecer los órganos externos del ser humano: epidermis, y sus anexos(sistema piloso, uñas,) labios, o los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo de modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado. Los cosméticos actúan a nivel superficial y se diferencian de todos los productos medicamentosos o terapéuticos. (10)

#### 1.1.1 COMPONENTES DE LOS COSMÉTICOS.

Los componentes cosméticos se refieren a los ingredientes presentes en una formulación cosmética sin importar que función específica tenga en la misma. Los siguientes componentes son los más comunes y están presentes en el 99% de los cosméticos que se ofrece en el mercado, sin importar si los cosméticos son de origen natural o sintético.

Así témenos:

- Emulgentes: para unir grasa y líquidos
- Antioxidantes: impiden el deterioro en contacto con el aire
- Gelificantes y espesantes: proporcionan propiedades reológicas
- Conservadores: impiden el deterioro temporal por agentes físicos y microbiológicos.

Los componentes que constituyen un cosmético se clasifican en tres grandes categorías:



- Sustancias activas.
- Excipientes.
- Aditivos y Correctores.

#### **1.1.1.1 Sustancias activas.**

Son todos aquellos ingredientes de la formulación responsables directos de la función principal del cosmético para el que a sido diseñados. Un cosmético puede tener, en su composición, una o varias sustancias activas diferentes, que cumplen varias funciones a la vez, finalidad que no es la misma. Como por ejemplo:

Un champú con acondicionador incorporado, en su formulación tendrá sustancias activas encargados de la higiene, detergentes y sustancias activas encargados del acondicionamiento como: emolientes y acondicionadores.

La variedad de principios activos usados en la industria cosmética es amplia. Aun clasificándolos según su función podemos encontrar: abrasivos, acondicionadores, antioxidantes, antisolares, desodorantes, detergentes, decolorantes, emolientes, epitelizantes, fijadores capilares o filmógenos, tónicos, tintes, suavizantes, pilomotores, pigmentos, perfumes, lubricantes, etc. (16)

#### **1.1.1.2 Excipiente.**

Los excipientes son sustancias o grupos de sustancias capaces de disolver o incorporar en emulsión o suspensión una multitud de ingredientes cosméticos. Es el componente con mayor porcentaje, totalmente compatible e inertes con la piel y sus anexos, sirven como medio de transporte de la sustancia activa. El excipiente más común y habitual es el agua en el que se diluyen gran cantidad de sustancias

El excipiente se adapta a la sustancia activa y determina la forma comercial cosmética y el modo de aplicación del cosmético. (16)

### **1.1.1.3 Aditivos y correctores.**

Los aditivos y correctores son sustancias que se añaden para mejorar las propiedades del producto, facilitar su uso, protegerlo frente a agentes químicos, físicos, biológicos o defenderlo del paso del tiempo o hacerlo más atractivo a la vista u olfato o más agradable de usar.

Los aditivos presentes en los cosmético tienen una nomenclatura o un código internacional; el que comienza con la letra E seguido por un número, para indicar que son conservantes permitidos de acuerdo a la reglamentación de la UE y la FDA. Existen varios tipos de aditivos y correctores que son incorporados como agentes correctores en un cosmético: (16)

- Entre E-100 y E-200 son colorantes alimentarios.
- Entre E-200 y E-300, antimicrobianos.
- Entre E-300 y E-400 son antioxidantes, y estabilizantes.
- Entre E-400 y E-500 emulsificantes y espesantes.

## **1.2 COSMECÉUTICO.**

“*cosmecéutico*” se refiere a una nueva clase de cosméticos que tienen un carácter funcional, que a más de la característica principal que tienen de adornar, proteger, y cuidar también se les añade otra, que es la de evitar o disminuir en la piel padecimientos menores como ciertos tipos de acné. Este nuevo tipo de cosméticos tienen en su composición extractos naturales obtenidos de cultivos orgánicos; con alguna actividad terapéutica previamente estudiada, y pueden estar presentes como sustancias activas y/o excipientes.(35).

Hasta mediados de la primera década del presente siglo la palabra “Cosméutico” no fue aceptada por la UE, FDA. En la actualidad aparecen con tendencia al alza; con el 15% de crecimiento anual. La industria cosmética afirma que los cosmécuticos tienen valor terapéutico a través de los ingredientes naturales que poseen en su composición para cambiar la estructura y la apariencia de la piel, cabello o uñas. (8)

### 1.2.1 COSMÉTICO NATURAL.

Un cosmético natural es un producto que lleva algún elemento vegetal en su composición, sin importar el porcentaje. Son una nueva opción de cuidado personal respetuosa con el medio ambiente durante todo su proceso de elaboración; lo que conlleva a una ética ecológica, pues no provoca residuos químicos, ni agresivos que sean perjudiciales para el medio ambiente. Las ventajas de los cosméticos naturales son enormes para la salud de la piel, no son agresivos, son compatibles, fortalecen, y mejoran las funciones dérmicas gracias a los componentes naturales presentes en las plantas.

#### 1.2.1.1 Características Cosmético Natural.

Un cosmético natural para ser llamado así debe tener las siguientes características:

##### **Composición.**

Un cosmético natural está compuesto de al menos 10% de ingredientes naturales entre sustancias activas y excipientes. El porcentaje restante pueden ser sustancia que no presenten ninguna característica toxica, nocivas e irritantes para la piel previamente comprobada. (16)

##### **Origen.**

Todas las sustancias activas, y excipientes presentes en estos compuestos deben ser orgánicamente cultivadas sin utilizar productos químicos de síntesis como: pesticidas, insecticidas, abono o agentes biológicos genéticamente modificados.

##### **Biodegradables.**

La mayoría de sustancias utilizadas para su utilización son fácilmente biodegradables a manera de sustrato que facilite la utilización por parte de los microorganismos para producir energía y metabolitos útiles para el medio ambiente. (16)

### **Desarrollo sostenible.**

Deben presentar en su proceso de elaboración un modelo que satisfaga las necesidades de las generaciones presentes; sin comprometer las posibilidades de las generaciones futuras. (16)

### **Producto certificable.**

Como producto de origen natural y cumpliendo las características anteriores se puede certificar siguiendo las reglas de la producción de la agricultura orgánica biológica. (16)

#### **1.2.1.2 Certificaciones de Cosméticos Naturales.**

Ante la ausencia de una legislación que regule la elaboración de cosméticos naturales; los fabricantes de este tipo de productos se someten criterios de empresas privadas de certificación que garanticen el carácter natural y ecológico del producto.

Cada organismo certificador tiene sus propios criterios y parámetros de exigencia para los productos cosméticos. Un cosmético certificado muestra en su etiqueta y embalaje acondicionador el sello o logo del organismo certificador. Que puede ser uno o varios dependiendo del país donde serán comercializados. (16)

### **USDA. (Departamento Agricultura de los Estados Unidos).**

El sello USDA organic puede aparecer en la etiqueta o embalaje del producto cosmético cuando el 95% como mínimo de los ingredientes procedan de agricultura ecológica.

Respecto al término natural aún no está regulado por la FDA para productos cosméticos. Por lo que estos pueden tener otros productos que no sean completamente de origen natural. (16)

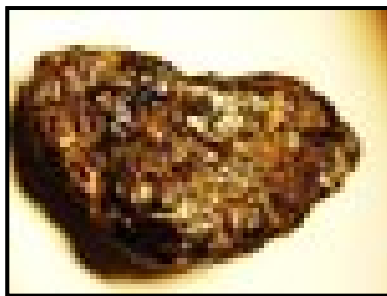
### **ECOCERT.**

Organismo que tiene operaciones de certificación en 85 países del mundo. El Sistema De Referencia de los Cosméticos Naturales y Orgánicos de Ecocert tiene un nivel de exigencias superior a la legislación que regula la cosmética convencional.

Certificadora que garantizan un verdadero respeto al medio ambiente en toda la cadena de fabricación de los cosméticos desde la obtención de la materia prima hasta la distribución del producto terminado. Los criterios de calidad que controla esta certificadora son los siguientes:

1. *Criterio para el producto acabado.* Con los siguientes parámetros:
  - Porcentaje mínimo de ingredientes sintéticos.
  - Mayor cantidad de sustancias de origen natural y orgánico.
  - Compromiso de los proveedores de que la materia prima entregada es orgánicamente cultivada.
  - Verificación del embalaje biodegradable entregado,
  - Control del etiquetado.
  
2. *Criterio para el fabricante del producto acabado.* Son los siguientes:
  - Higiene y limpieza de las zonas de fabricación.
  - Acondicionamiento del producto terminado.
  - Gestión energética autosustentable.
  - Tratamiento de Emisiones y Residuos.
  - Evaluación del sistema de calidad global.
  - Autocontrol. (16)

### 1.3 PROPÓLEO



FUENTE: [www.ecoaldeal.com/imagenes/propolis2/jpg](http://www.ecoaldeal.com/imagenes/propolis2/jpg).

FOTOGRAFÍA 1 PROPÓLEO EN ESTADO IMPURO

El propóleo es una mezcla de resinas, polen, ceras, y secreciones glandulares elaborada por las abejas del género *Apis mellifera* mediante un proceso de masticación de estos componentes y que las abejas toman de la yema de los árboles y vegetación silvestre que rodea la colmena. (16)

El propóleo sometido a un proceso de purificación presenta una consistencia similar a la goma de mascar, de color ligeramente oscuro que va del amarillo claro a marrón oscuro, pasando por una gran cantidad de tonos castaño, según su origen y temperatura. (22)

Hasta los 15°C es duro. Con el aumento temperatura es maleable hasta llegar a su punto de fusión varía entre 60 a 70 °C, llegando en algunos casos hasta 100°C.

Su olor también es muy variable, generalmente es agradable, y en algunos casos recuerda a su origen vegetal, mientras que en otros casos posee un olor predominante a cera.

### 1.3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO

La composición química del propóleo es variable y compleja, depende de la flora, y el clima del lugar de asentamiento de la colmena, motivo por el cual ha sido determinada con aproximación.

El propólis es una mezcla de varios metabolitos secundarios, en concentraciones distintas, según la consistencia y los componentes presentes en los propóleos, pueden clasificarse dentro de dos grupos:

1. *Naturalezas fluidas*. Como: los bálsamos de consistencia más densa, poco volátiles y con frecuencia sufren reacciones de polimerización, mientras que las oleorresinas que tienen la forma similar al caucho obtenido del árbol de su mismo nombre, llevan asociado el aroma de las plantas en forma concentrada se presentan en un porcentaje de 50-60%, un 30-40% de cera; un 5-10% de polen.
2. *Esencias fluidas*. Son agentes volátiles presentes en un porcentaje de 8-10% de aceites aromáticos.

En el propóleo están presentes trazas de minerales, más de 20 oligoelementos, vitaminas: complejo B en especial la vitamina B3 o nicotinamida, aminoácidos: 7 de los 8 esenciales, y más de 50 grupos de flavonoides, además de lactonas, polisacáridos y compuestos fenólicos. (29)

Composición química que lo hace efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas; los flavonoides o materias colorantes, son sustancias más activas de su composición y tienen acción antiséptica.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes.

### 1.3.2 PROPIEDADES MEDICINALES.

Al propóleo se le atribuyen muchas propiedades curativas como: antibacteriano, antiparasitario, antimicótico, antioxidante, analgésico, antituberculosos, antiviral, estimulante de la inmunogénesis hemostático, cicatrizante, termo-estabilizador, y foto-inhibidor entre otras.

Fundamentalmente es un magnífico bioregulador que estimula la capacidad de defensa, funcionamiento y adaptación del organismo. Sus cualidades antioxidantes además de reducir el efecto de los radicales libres lo hacen responsables de la acción antiviral, al inhibir el desarrollo de virus patógenos. (24)

Otra virtud del propóleo es su capacidad de transportarse indistintamente a través de la sangre y la linfa, a todo el organismo. Su acción cicatrizante es notable por el estímulo para la regeneración de los tejidos orgánicos y contra las infecciones inflamatorias de la piel. (24)

### 1.4 CALÉNDULA.



FUENTE:[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calendula\\_officialis1.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calendula_officialis1.jpg)

FOTOGRAFÍA 2. FLOR DE CALÉNDULA.

#### 1.4.1 NOMBRE CIENTÍFICO.

*Calendula officinalis* Lin es el nombre científico de la planta medicinal.

#### 1.4.2 NOMBRE COMÚN

Los nombres más comunes son: Capétuda, Flor de muerto, Mercadela y Flamenquilla.

(26)

#### 1.4.3 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Astereaceae
<b>Subfamilia</b>	Asteroideae
<b>Tribu</b>	Calenduleae
<b>Genero</b>	<i>Calendula. L</i>
<b>Especie</b>	<i>Officinalis</i>

#### 1.4.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Las flores de caléndula se presentan como hierbas de escasa altura 40 o 50 cm, de tallos erectos y ramificados desde la base formando densas matas; con hojas lanceoladas, simples, ligeramente pubescentes, de entre 5 y 20 cm de largo. Las flores son discoidales, tienen una gama de colores que van del amarillo al naranja intenso, y muy vistosas. (39)

#### 1.4.5 USOS Y PROPIEDADES.

Los pétalos de la flor de la caléndula tienen capacidad de estimular las células del sistema inmunológico conocidas como macrófagos propiciando así la destrucción de bacterias. No se conocen claramente los componentes responsables de estos efectos, aunque algunos estudios sugieren que los flavonoides de la planta podrían contribuir a sus propiedades cicatrizantes. (40)



#### 1.4.6 PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA CALÉNDULA.

Entre los componentes químicos más abundantes se encuentran los flavonoides y los carotenoides, polisacáridos, saponinas, triterpenos, ácidos fenólicos, cumarinas y taninos.

- Aceite esencial (0,1-0,2 %) rico en derivados mono y sesquiterpénicos oxigenados.
- Esteroles libres y esterificados: sitosterol, estigmasterol, isofucosterol.
- Triterpenos pentacíclicos monoalcoholes, dioles y trioles.
- Saponósidos: calendulósidos A, D, F y D2.
- Flavonoides: glucósidos flavónicos derivados del quercetol y del isorramnetol.
- Carotenoides: caroteno, calendulina, zeína, licopeno.
- Resina, mucílago (1,5 %) y polisacáridos inmunoestimulantes.
- Ácidos orgánicos: málico (6,8 %); poliacetilenos; gomas.
- Sustancia amarga: calendeno y taninos. (26)

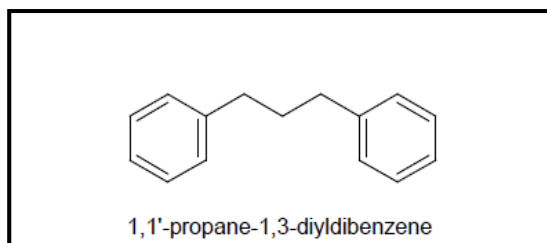
Los extractos aplicados en los cosméticos se producen a partir de las flores de la planta. Los flavonoides más comunes de caléndula son rutina y quercetina que garantizan buenas propiedades para captar de radicales libres. El isorhamnetin-3-glucósido, que parece ser un producto químico muy característico de esta planta, asegura un efecto antiinflamatorio y calmante.

El extracto de *Calendula officinalis* ha encontrado una aplicación en casi todos los tipos de cosméticos. Es ampliamente utilizado en los cosméticos de cuidado de sol, productos para después del sol, formulaciones antiacné, lociones, champús anticaspa y emulsiones elaboradas para piel irritada, agrietada. (42)

#### 1.5 FLAVONOIDES EN COSMÉTICA.

Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales ampliamente distribuida en la vegetación de cualquier lugar del planeta y justamente estos compuestos le confieren los distintos colores a muchas flores, hojas y frutos. Las acciones farmacológicas de los flavonoides, tanto tópicos, como de uso interno se han asignado alternativamente a la presencia de los glicósidos flavonoídicos o a sus agliconas. (40)

Los flavonoides pertenecen a un grupo de compuestos naturales llamados polifenoles arreglados bajo un sistema  $C_6-C_3-C_6$ , en el cual dos anillos bencénicos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. De manera general un flavonoide se define como un polifenol que contiene más de un anillo bencénico en su estructura.



Fuente: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001>

FIGURA 1 ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOIDES.

### 1.5.1 CARACTERÍSTICAS COSMÉTICAS FLAVONOIDES.

La principal característica de los flavonoides está presente en los dobles enlaces de su estructura aromática que le confiere efectos antioxidantes y secuestradora de radicales libres; principales agentes causantes de la vejez prematura de la piel, se ha propuesto que los dobles enlaces presentes en los carbonos: C2, C3, el carbonilo C4, y los hidroxilos en C3, Y C5, son esenciales para la acción antioxidante de los flavonoides. (25)

La capa superior de la piel, el estrato corneo es una estructura muy rica en lípidos y otros compuestos fácilmente oxidables, en esta capa los flavonoides desempeñan un papel eficaz como oxidante eliminando los radicales libres. En la dermis la capa mas profunda de la piel, los flavonoides influyen en la permeabilidad y la fragilidad del sistema capilar. (23, 27)

#### 1.5.1.1 Catequinas.

Las hojas frescas de te verde contienen de un 20% – 30% depolifenoles en peso seco. Los principales componentes de este vegetal son las catequinas. Durante el proceso de fermentación del te verde se observa oligometrisación de catequinas .el polifenol mas abundante en el te verde es la (-)epigallocatequina galato.

Se ha demostrado que las catequinas son capaces de inhibir la mutagenicidad inducida por muchos compuestos químicos que incluyen los del humo del cigarrillo. Característica basada en la capacidad de inhibir la actividad enzimática.

La relación estructura actividad juega un papel muy importante en los procesos de barrido de radicales libres por la presencia de múltiple grupo hidroxilo

Razones por las que los extractos de te verde tienen una gran aplicación en la industria cosmética. La presencia de estos compuestos mejora la apariencia de la piel y en especial los flavonoides que tienen carácter astringente se utilizan ampliamente en lociones antiacné y formulaciones para piel grasa. (1)

#### **1.5.1.2 Antocianinas.**

Los flavonoides de la uva son principalmente antocianinas y pro-antocianidinas, y los más comunes son: peonidin, cianidin, delphinidina y petunidin. Se ha documentado que tanto antocianinas y pro-antocianidinas tienen un amplio espectro de propiedades bioquímicas.

Las pro-antocianodinas han demostrado tener propiedades de antioxidante natural, de especial interés desde el punto de vista cosmético. Los oligómeros de catequinas funcionan más efectivamente que los monómeros de catequina como secuestrantes de radicales libres, inhiben la actividad de algunas enzimas: elastasa, colagenasa y hialuronidasa, tienen propiedades de filtros UV propiedades que lo hacen valioso para el mercado cosmético aumentando la eficacia de los protectores solares. (1)

### **1.6 GELES**

Los geles son preparaciones semisólidas formadas por pequeñas partículas inorgánicas o grandes moléculas orgánicas interpenetradas por un líquido. Geles elaborados de materiales inorgánicos usualmente son sistemas bifásicos donde las pequeñas partículas son dispersadas en un medio de dispersión. Los geles elaborados de moléculas orgánicas son sistemas monofásicos en los cuales no aparecen separaciones físicas; las cuales aparecen entre la fase dispersa y el medio dispersante.

Los geles son un atractivo sistema de liberación, porque son simples de manufacturar a nivel industrial e idóneo para la administración de sustancias activas a través de la piel. En efecto muchos geles dermatológicos se utilizan para el tratamiento de acné leve a moderado, eczemas, dermatitis, alergias, erupciones cutáneas, psoriasis, y para la eliminación de verrugas comunes. (9)

#### 1.6.1 CARACTERÍSTICAS.

De acuerdo al tipo de agente gelificantes, los geles pueden ser de aspecto turbio o transparente los cuales exhiben diferentes propiedades físicas:

##### **1.6.1.1 Imbibición.**

Propiedad que hace referencia a la ganancia de agua u otros líquidos por el gel sin algún incremento considerable en su volumen.

##### **1.6.1.2 Hinchamiento.**

Se refiere al incremento del volumen del gel por ganancia de agua u otro líquido. En esta propiedad del gel tienen influencia directa la temperatura, pH, presencia de electrolitos y otros ingredientes de la formulación.

##### **1.6.1.3 Compresión.**

Se refiere a la contracción o encogimiento del gel como resultado de las fuerzas de compresión fuera del medio de dispersión de la matriz del gel; debido al estrechamiento de las macromoléculas y la expansión de las fuerzas elásticas durante el hinchamiento de las moléculas del agente gelificante. Manteniéndose el equilibrio del sistema inalterado mediante estabilidad física, por que las fuerzas osmóticas del hinchamiento están balanceadas con las fuerzas elásticas de expansión de las macromoléculas.

##### **1.6.1.4 Tixotropía.**

Se refiere a la naturaleza de los fluidos no Newtonianos, la cual es caracterizada por una reversible formación de gel a sol sin cambio en el volumen o temperatura. (9)

## 1.6.2 CLASIFICACIÓN.

Los geles son clasificados en hidrogeles y oleogeles de acuerdo al estado físico de los agentes gelificantes en la dispersión. Los hidrogeles son preparados con materiales solubles en agua. Los oleogeles son preparados usando materiales oleaginosos insolubles en agua.

### 1.6.2.1 Hidrogeles.

Gomas naturales y sintéticas como el tragacanto, alginato de sodio, y pectinas; materiales inorgánicos como la bentonita, alúmina, y sílica; materiales orgánicos como los polímeros de celulosa forman geles con agua, los cuales pueden ser finas partículas coloidales dispersas en una fase acuosa o completamente disueltas en agua para ganar la estructura de gel. Las gomas y los agentes gelificantes inorgánicos forman una estructura de gel debido a su natural viscosidad incrementada.

Los agentes orgánicos gelificantes generalmente son derivados de polímeros de celulosa de alto peso molecular, forman la estructura de gel por las propiedades de hinchamiento y formación de cadenas enredadas de sus moléculas. Las fuerzas físicas de la estructura del gel están basadas en la cantidad de agente gelificante, en la naturaleza y el peso molecular del mismo, pH y temperatura de gelificación. (9)

### 1.6.2.2 Oleogeles.

Los oleogeles también son conocidos como geles oleaginosos que son preparados usando lípidos insolubles en agua como los ésteres de glicerol de ácidos grasos, los cuales al hincharse en agua forman diferentes tipos de cristales líquidos liotrópicos.

Que generalmente están en el agua formando una especie de cuartos cerosos en forma de cristales cúbicos líquidos incrementando la viscosidad de la dispersión.

Una gran cantidad de agua es atrapada en las bicapas lipídicas. El equilibrio del agua contenida en los oleogeles es de aproximadamente 35%. Las propiedades estructurales de los lípidos, cantidad de agua en el sistema, solubilidad de la sustancia activa incorporada, y temperatura externa tiene influencia en la naturaleza de la fase líquida cristalina. (9)

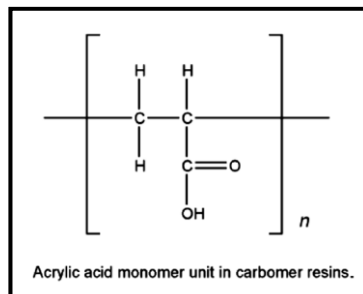
### 1.6.3 AGENTES GELIFICANTES.

Los agentes gelificantes son todas aquellas sustancias de origen orgánico o inorgánico que al contacto con el agua toman la apariencia de gel. Por lo general estos compuestos poseen alto peso molecular. Los agentes gelificantes fácilmente se dispersan en agua, poseen la propiedad de hincharse en contacto con la misma lo que le da característica de viscosidad a la dispersión.

Un agente gelificante ideal no debe interactuar con los otros componentes de la formulación, no debería sufrir contaminación microbiana y fúngica, los cambios en el pH y la temperatura durante la preparación y preservación no deberían alterar las propiedades reológicas de la formulación, adicionalmente debería ser económicamente redituable, formar geles incoloros, proveer de una sensación de frescura en el lugar de aplicación, y poseer un olor agradable.

#### 1.6.3.1 Carbopol.

Los otros nombres con los que se conoce a este agente gelificante son carbomer, ácido poliacrílico. El carbopol es el agente gelificante más ampliamente usado en la elaboración de preparaciones tópicas debido a su gran propiedad de hinchamiento por la gran cantidad de agua que absorbe, se presenta como un polvo blanco higroscópico de color blanco, que posee un olor característico. Presenta cerca del 60% en peso grupos de ácido carboxílico porcentaje que le da su característica ácida y calculada en base seca. (14)



FUENTE: Handbook of Pharmaceutical Excipients

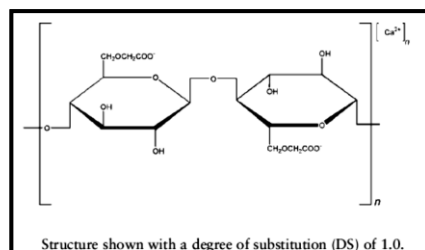
FIGURA 2 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CARBOPOL.

El carbopol designado como 934P, 971P, 974P; son usados para la preparación de geles claros. Las dispersiones acuosas de carbopol son de baja viscosidad y para formar geles de alta viscosidad es necesario neutralizarlo con sustancias básicas como el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, TEA.

La inclusión de antioxidantes, preservación de la temperatura de almacenamiento, protección de la luz ayudan a mantener la viscosidad por largos periodos de tiempo. La estabilidad microbiana de los geles de carbopol se puede mejorar por la adición de perseverantes antimicrobianos.

### 1.6.3.2 Carboximetilcelulosa (CMC).

El CMC se obtiene por la carboximetilación de celulosa y conversión en sal de calcio. Se presenta como un polvo fino de color que va del blanco al amarillo claro, higroscópico. Tiene la propiedad de hincharse y aumentar la viscosidad en agua. Se usa como: agente estabilizante, aumenta la viscosidad, y aumenta la absorción de agua. (14)

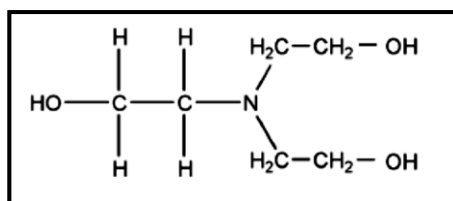


FUENTE: Handbook of Pharmaceutical Excipients

FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CARBOXIMETILCELULOSA.

### 1.6.3.3 Trietanolamina (TEA).

Es un líquido claro, viscoso de color amarillo pálido que tiene un ligero olor a amoníaco. El TEA es una mezcla de bases principalmente 2,2',2''-nitlotrietanol, también contiene 2,2'-iminobis-etanol (dietanolamina), y pequeñas cantidades de 2-aminoetanol (monoetanolamina).



FUENTE: Handbook of Pharmaceutical Excipients

FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL TEA.

El TEA es ampliamente usado en varias preparaciones tópicas, principalmente para la formación de emulsiones. (14)

#### 1.6.4. CONTROL DE CALIDAD DE LOS GELES.

Existen aspectos en la formulación de un gel que se deben tomar en cuenta debido al interés del consumidor: facilidad de extracción del envase, claridad del gel, extensión sobre la piel, y grosor de la capa que se origina al extenderlo. Se realizan varias pruebas para evaluar las características fisicoquímicas, microbiológicas, in vitro. Pruebas utilizadas para medir el aseguramiento de la calidad del gel y minimizar la variación de lote a lote.

##### 1.6.4.1. Homogeneidad.

La homogeneidad del gel formulado es usualmente valorada por inspección visual y táctil.

##### 1.6.4.2 Potencial Hidrogeno.

La determinación del pH del gel es un parámetro importante para mantener la calidad de la consistencia. Una medida convencional del pH es dificultosa y a menudo se obtienen erráticos resultados. Especiales electrodos de pH son usados debido a la viscosidad del gel. (14)

##### 1.6.4.3. Estudios Reológicos.

Los estudios reológicos tienen una relación directa con la estabilidad física de una formulación fundamentalmente para el control de calidad y la aceptación por el consumidor y la eficacia de la misma.



La medida de la viscosidad es la prueba más rápida y común que se realiza para caracterizar geles. Es un parámetro que nos permite medir hasta qué punto se puede manipular la consistencia del gel.

#### **1.6.4.4. Estudios de Estabilidad.**

Al ser los geles sistemas dispersos que contienen agua en su matriz, son propensos a problemas de estabilidad microbiana, física, y química. La separación de las fases es uno de los problemas más comunes de estabilidad física que presentan los geles; debido a la contracción elástica de los agentes poliméricos de los geles. La separación de fases o sinéresis se puede evaluar mediante el calentamiento a altas temperaturas, seguido de enfriamientos rápidos y continuos mediante un baño de agua a temperatura ambiente con hielo. La ausencia de sinéresis indica mayor estabilidad física de los geles.

### **1.7. PIEL.**

La piel es los órganos más grandes del cuerpo que protege y cubre su superficie formando una barrera protectora contra la acción de agentes químicos, físicos, o microbiológicos sobre los tejidos más profundos.

#### **1.7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL.**

El grosor de la piel varía entre 0,5 mm en los párpados y 4 mm o más en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Es el órgano más extenso del organismo en los individuos adultos tiene una extensión entre 1,2 y 2,2m<sup>2</sup>.

Tiene una gran variedad de órganos anexos como poros, glándulas sebáceas y sudoríparas, además folículos pilosos y uñas. (7)

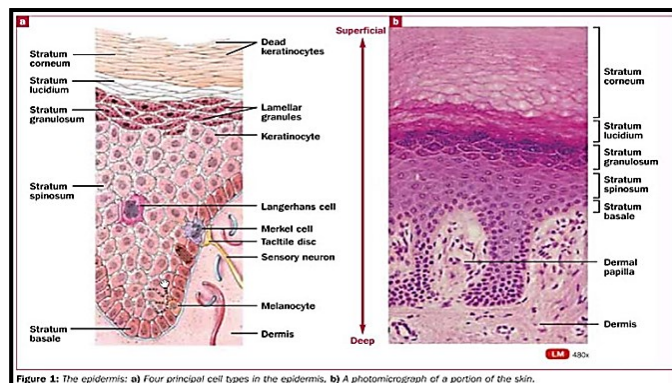
#### **1.7.2 FUNCIONES DE LA PIEL.**

Entre las principales funciones de la piel tenemos:

- Escudo de protección que evita que el cuerpo sufra daño mecánico, penetración química, invasión patógena, y radiación UV.

- Regulación de la temperatura corporal gracias a la acción de las glándulas sudoríparas y los capilares sanguíneos (participan 4,5m de capilares sanguíneos contenidos en cada 6,25cm<sup>2</sup> de piel).
- Sistema de defensa primario que protege de agentes extraños como virus y bacterias gracias a la acción de las células de Langerhan, que los captura y los transfiere hacia los nódulos linfáticos para su posterior eliminación segura.
- Recepción de estímulos externos gracias a la acción de las terminaciones nerviosas que posee y las células de Merkel que posibilitan la sensación de tacto.
- Evita la pérdida de agua corporal y evita la penetración de agentes químicos y patógenos.
- Actuar como un sistema de desintoxicación, permitiendo la excreción de agua, sales minerales y varios compuestos orgánicos y toxinas
- Definir la apariencia física de la persona. (7)

### 1.7.3 PARTES DE LA PIEL



FUENTE: Handbook of Cosmetic Science and Technology

#### FIGURAS PARTES DE LA PIEL

La piel consta de tres capas la más superficial es un epitelio denominado epidermis que descansa sobre una capa de tejido conectivo llamado dermis que a su vez descansa sobre una capa de tejido subcutáneo denominado hipodermis, que es una capa de tejido conectivo laxo rico en células adiposas que esta interpuesta entre la piel y las estructuras subyacentes, músculos, y huesos este tejido no forma parte de la piel. La piel presenta variaciones regionales estructurales caracterizadas por el grosor, vascularización e inervación, pigmentación, presencia de pelos y glándulas. (11)

### **1.7.3.1 Epidermis.**

La epidermis es la parte de la piel formado por cuatro tipos de células bien diferenciadas. Los queratinocitos que son la población predominante, los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel. La epidermis está conformada por cuatro subcapas organizadas de adentro hacia afuera:

1. Estrato basal.
2. Estrato espinoso.
3. Estrato granuloso.
4. Estrato corneo

Existe la presencia de un quinto estrato pero solo está presente en el lugar donde la piel es gruesa y es el llamado estrato lucido. La células llamadas queratinocitos avanzan del estrato basal o llamado también estrato germinativo hacia el estrato espinoso, el estrato granuloso, estrato lucido (en donde la piel es gruesa) hacia el estrato corneo; el tiempo de traslación de las células del estrato basal al estrato corneo se calcula en 21 días.

En la capa exterior de estrato espinoso se presentan gránulos entre las células, dentro de estos gránulos son observados subunidades lamelares ordenadas en pilas paralelas; se cree que estos son los precursores de la lámina lipídica del estrato corneo.(11)

#### **Estrato corneo.**

Capa superior de la epidermis que tiene un grosor de 10 – 20  $\mu\text{m}$ , y está formada por lípidos intercelulares y células muertas llamadas corneocitos; los cuales se originan de la proliferación epidérmica de células conocidas como queratinocitos, los cuales se diferencian y migran hacia las capas más externas de la piel por un proceso conocido como diferenciación, en el cual cambian su morfología y contenido celular, hasta llegar a tener apariencia lisa, sin núcleo u otros organelos celulares, y rica en una proteína llamada queratina

En la capa externa del estrato granuloso, los gránulos lamelares migran hacia la membrana plasmática apical, lugar donde se fusionan y expulsan su contenido en los espacios intracelulares.

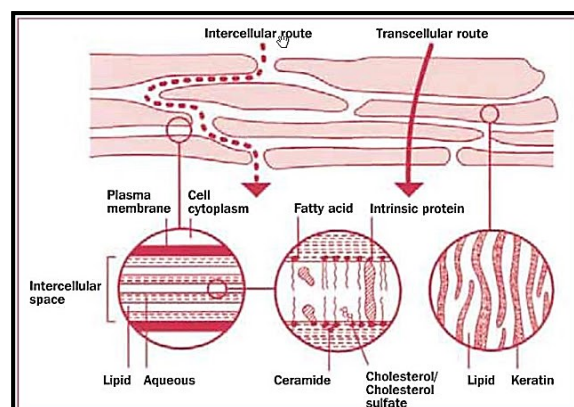
La expulsión del contenido de los gránulos lamelares es un requerimiento fundamental para la formación de la barrera permeable de la epidermis. De esta forma el proceso entero de la diferenciación de la epidermis es el mecanismo hacia la generación de la morfología química específica del estrato corneo. Como resultado los productos finales de este proceso son:

1. La matriz proteínica intracelular.
2. La lamina lipídico intracelular

Las células corneas están envueltas por la capa externa del corneocito que principalmente consiste en un envoltorio hermético de filamentos de queratina alineados paralelamente a la cara principal del corneocito. La cubierta está constituida de dos tipos de proteína y constituyentes lipídico unidos covalentemente a la proteína de envoltura. La proteína de envoltura del corneocito parece jugar un papel importante en el ensamblaje estructural en la lámina intracelular lipídico del estrato corneo.

El corneocito posee una envoltura lipídica que químicamente está formada por N- $\omega$ -hidroxiceramidas, los cuales son esteres unido a numerosos lados de una cadena de glutamato que la dan la posibilidad de dos tipos de conformaciones: la  $\alpha$ - helicoidal y la  $\beta$ -laminar involucradas en la matriz proteínica de envoltura. (11)

### Lípidos intercelulares.



Fuente: Handbook of Cosmetic Science and Technology

FIGURA N° 06. CANALES INTERCELULARES DE LA PIEL.

Los lípidos intracelulares del estrato corneo existen como una fase continua de lípidos ocupando el 20% del volumen del estrato corneo y ordenado en múltiples estructuras lamelares. Las cuales están compuestas de colesterol (27%) y ceramidas (41%) unidas a ácidos libres (9%), ésteres de colesterol (10%) y sulfato de colesterol (2%). Los fosfolípidos dominan en la capa basal y son convertidos en glucosilceramidas y consecuentemente en ceramidas y ácidos grasos libres, que virtualmente están ausentes en las capas externas del estrato corneo. La lamina intracelular lipídica está altamente estructurada, muy estable y es muy efectiva a la penetración y permeación química

### **1.7.3.2 Dermis.**

La capa interna es la dermis que cubre a la subcutánea. Está constituida principalmente por una red de colágeno y de fibras elásticas que le dan el soporte a la epidermis. La dermis está constituida por una región papilar y una región reticular.

#### **Región papilar.**

Es tejido conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos, nervios, folículos pilosos, papilas dérmicas, y corpúsculos del tacto (de Meissner). Cada papila contiene un lazo capilar de vasos sanguíneos y una terminación nerviosa especializada. Los lazos vasculares aportan nutrientes a la epidermis y superan en número a las papilas neurales, en una proporción aproximada de cuatro a uno.

#### **Región reticular.**

Está formada de tejido irregular que contiene tejido adiposo, folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y los conductos de las glándulas sudoríparas.

#### **Glándulas sudoríparas.**

Están distribuidas por todo el cuerpo. Son numerosas en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, pero bastante escasas en la piel de la espalda. Cada glándula consiste en una serie de túbulos enrollados situados en el tejido subcutáneo, y un conducto que se extiende a través de la dermis y forma una espiral enrollada en la epidermis. Las glándulas sebáceas tienen forma de saco y segregan el sebo que lubrica y ablanda la piel. Se abren en los folículos pilosos a muy poca distancia por debajo de la epidermis.

#### 1.7.4. TIPOS DE PIEL.

Desde el punto de vista cosmético la piel se clasifica en numerosos tipos de acuerdo a su diversidad estructural, y funcional características que están influenciadas por factores intrínsecos relacionados con el sexo del sujeto, etnia, edad, fisiología, psicología, y su estado patológico. Y también por factores extrínsecos relacionados con el medio ambiente inmediato como la humedad ambiental, exposición al sol, rango de temperatura ambiental, entre otros.

Los criterios de referencia para clasificar la piel están relacionados con la superficie de la piel, intensiones de seducción, y atracción que brindan un sentimiento de bienestar y placer al sujeto. Desde este punto de vista selectivo clasifica en la piel en cuatro tipos principales: (4)

- Piel normal.
- Piel seca.
- Piel grasa.
- Piel mixta.

##### **1.7.4.1 Piel normal.**

Al no existir una definición clara de piel normal se podría decir; “que es aquella que no es piel seca, grasa, o mixta y que no presenta ninguna patología”. Un rápido análisis de las partes de la piel y sus funciones nos permite determinar una definición de este tipo de piel.

Una piel normal es suave, agradable al tacto debido a la cohesión firme de las células de las capas más superficiales. Es una piel flexible debido a la existencia de un tejido denso de soporte gracias a la presencia numerosas fibras elásticas de buena calidad. Con un recubrimiento seboreico balanceado. Y también se debe presentar como una piel clara y rosada debido a la perfecta funcionalidad de la red de la microcirculación. (4)

##### **1.7.4.2 Piel seca.**

Está definida de acuerdo a la apariencia observada y el sentido sensorial al tacto; por lo tanto aquella piel que posee una sensación de seca y perdida de flexibilidad y elasticidad caracterizada por una apariencia rugosa con un proceso de descamación

importante aspectos que se pueden corregir mediante el uso de productos cosméticos hidratantes. Estudios recientes han determinado la presencia de cuatro factores que causan la piel seca.

1. Falta de agua de los cornecitos, dependen directamente de la presencia de NMF.
2. Hiper-proliferación epidérmica, resulta de una deficiencia en el proceso de renovación de los queratinocitos.
3. Cambio de la síntesis lipídica a nivel celular.
4. Deterioro de la funcionalidad de la barrera de la piel, después de una degradación de la cohesión intercelular.(4)

#### **1.7.4.3 Piel grasa.**

La piel grasa resulta de una actividad excesiva de las glándulas sebáceas, que conduce a una sobreproducción de sebo que se vierte en la piel, dándole un aspecto brillante. El sebo contiene escualeno, ceras, triglicéridos y esteroides; que bajo el efecto de las bacterias presentes en la flora normal cutánea, una parte de los triglicéridos es inmediatamente hidrolizada, el sebo excretado que contiene una cantidad significativa de ácidos grasos libres contribuyen a la acidez y el pH de la superficie de la piel.

El cambio de su tasa de producción de sebo depende de factores genéticos, endocrinos, y ambientales. Por último, a nivel cosmetológico, que debe mencionar que la piel grasa es a veces eritrocítica, fácilmente irritables, y particularmente frágil.(4)

#### **1.7.4.4 Piel mixta.**

Corresponde a un tipo de piel complejo; en el que los diferentes tipos de piel descritos anteriormente pueden coexistir en diferentes áreas del cuerpo o el rostro. El ejemplo típico es la cara, donde la piel se presenta sólida y grasosa con poros muy dilatados en la zona medio-facial, coexistiendo con una piel frágil, con poros finos en las mejillas. Este tipo de piel conjuga las particularidades y sensibilidades peculiares a la normalidad, piel seca y grasosa que pueden estar combinadas unas con otras o pueden presentarse todos a la vez. Por este motivo los cosméticos destinados para este tipo de piel deben estar elaborados en función de cada uno de estos o personalizados para cada uno de estos. (4)

## 1.8 ACNÉ

El acné es una inflamación de las glándulas pilosebáceas de la piel que se produce por la obstrucción de los poros y la aparición de diferentes lesiones en la piel que afecta a un gran número de seres humanos en algún momento de su vida.

Las glándulas sebáceas están conectadas a un canal piloso llamado folículo que fabrica una sustancia oleosa llamada sebo que llega a la piel, a través de la abertura que el folículo posee en la superficie de la piel.

El sebo provoca que la células del revestimiento folicular se secreten más rápidamente y se aglutinen formando un tapón en la abertura del folículo piloso; en esta mezcla de sebo y células, crecen las bacterias, que producen agentes químicos que estimulan la inflamación y causan una ruptura en la pared del folículo. El sebo, las bacterias y las células epidérmicas se vierten a la piel provocando enrojecimiento hinchazón y pus que son los signos característicos de la patología. (3)

Esta condición es común en la pubertad y está considerada como una respuesta anormal ante niveles normales de la hormona masculina testosterona. La respuesta de la mayoría de las personas disminuye con el tiempo y el acné tiende a desaparecer o al menos disminuye después de la pubertad; de todos modos, no hay manera de predecir cuánto tiempo tardará en desaparecer completamente y algunos individuos continuarán sufriendo acné durante décadas después.



FUENTE: Cosmetic Dermatology for Skin of Color

FOTOGRAFÍA 3. SECUELAS DEL ACNÉ.



### 1.8.1 ETIOPATOLOGÍA

El acné es una enfermedad inflamatoria de etiología multifactorial que afecta la unidad pilosebácea con la intervención primaria del microorganismo *Propionibacterium acnes* y otras bacterias oportunistas.

#### **Factores patogénicos.**

En la patogenia del acné es menester considerar cinco factores básicos:

1. Aumento de la secreción sebácea.
2. Hiperqueratosis ductal con obstrucción del folículo pilosebáceo.
3. Colonización y desarrollo bacteriano de *Propionibacterium acnes*.
4. Debilitamiento del sistema inmune en la zona de influencia.
5. Inflamación secundaria causada por bacterias oportunistas. (5, 19)

#### **1.8.1.1. *Propionibacterium acnes*.**

Éste microorganismo anaerobio gram positivo que forma parte de la flora normal, es un patógeno oportunista que coloniza el fondo del folículo pilosebáceo, desdobra el sebo en glicerol y ácidos grasos, que serían los responsables de la hiperqueratinización (sobrecrecimiento de la epidermis) y del impedimento de la descamación del epitelio folicular. Este proceso lleva a la formación de tapones y a la inflamación, representados clínicamente por comedones y pápulas eritematosas.

El *Propionibacterium acnes* causa una respuesta inflamatoria que lleva a la formación de pústulas y, si se produce una respuesta exagerada por acción de otros microorganismos se presentan quistes y nódulos.

Durante el proceso de la enfermedad, los triglicéridos se ven disminuidos por la hidrólisis causada por las lipasas de esta bacteria y parte de estos ácidos grasos que se liberan causan la irritación de la pared folicular. El *Propionibacterium. acnes* al hidrolizar el sebo produce factores quimiotácticos para neutrófilos y macrófagos que contribuyen con las manifestaciones inflamatorias. (32)

La lesión inicial se presenta con el microcomedón que resulta de la obstrucción de los folículos sebáceos por un exceso de sebo junto con células epiteliales descamadas procedentes de la pared folicular (hiperqueratosis ductal). Estos dos factores causan lesiones no inflamatorias como los comedones abiertos (puntos negros o barros) y los microquistes o comedones cerrados en los cuales la bacteria anaerobia, *Propionibacterium acnes* prolifera con facilidad y provoca la aparición de otros mediadores de la inflamación que con ayuda de bacterias oportunistas como la *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Pseudomonas aeruginosa*, causan los signos característicos del acné.(12)

#### **1.8.1.2. Bacterias oportunistas causantes del cuadro clínico del acné.**

En la mayoría de casos clínicos de acné toda su sintomatología y daños a la piel están dada por mediadores externos o bacterias oportunistas que proliferan en el sitio de la lesión y causan daño al tejido.

Gracias a las condiciones idóneas para su proliferación; tanto ambientales, nutricionales, e inmunológicas que se presentan luego de la proliferación del *Propionibacterium acnes*.

#### ***Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.**

Las bacterias del género *Staphylococcus* conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, infecciones de la piel, las partes blandas, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, y *Staphylococcus saprophyticus*.

En la actualidad, el género comprende 35 especies y 17 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus capitis* crece en regiones con glándulas sebáceas (como la frente); *Staphylococcus aureus* causa enfermedad mediante la producción de toxina o por invasión directa y destrucción del

tejido, que da paso a la formación de abscesos y la destrucción tisular. Como es el caso de las infecciones cutáneas. (12)

### ***Streptococcus pyogenes.***

La especie más importante de los estreptococos del grupo A es *Streptococcus pyogenes* que origina diversas enfermedades supurativas y no supurativas. Las cepas de *Streptococcus pyogenes* son cocos esféricos de diámetro comprendido entre 1 y 2 mm agrupados en colonias de color blanquecino, que forman cadenas cortas en las muestras clínicas y cadenas de mayor longitud cuando crecen en medios de cultivo.

Estos son algunos padecimientos del cuadro clínico del acné atribuidos a este tipo de bacteria.

1. **Pioderma:** infección cutánea localizada con vesículas que avanzan a pústulas; sin indicios de enfermedad sistémica
2. **Erisipela:** infección cutánea localizada con dolor, inflamación, adenopatía y síntomas sistémicos.
3. **Fascitis necrosante:** infección profunda de la piel que provoca la destrucción de capas musculares y de tejido adiposo. (12)

### ***Pseudomonas aeruginosa.***

Las infecciones por *Pseudomonas* son fundamentalmente oportunistas (es decir, restringidas a los pacientes con alteraciones de los mecanismos de defensa) tal como ocurre en los cuadros clínicos del acné.

*Pseudomonas aeruginosa* tiene muchos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas, las infecciones secundarias por *Pseudomonas* pueden ocurrir en los individuos que tienen acné, también causan infecciones cutáneas en los individuos que exponen las manos de manera frecuente al agua. Causan daño vascular localizado, necrosis tisular y finalmente pústulas llenas de microorganismos activos que al romperse facilitan la diseminación de los mismos a través del rostro. (12)

### **1.8.1.3 Síndrome SAPHO.**

Una de las principales complicaciones que se presente por acción de la *Propionibacterium. acnes* es este síndrome que es un conjunto de enfermedades y se ha relacionado a este microorganismo como el agente desencadenador del mismo. Este síndrome está integrado por sinovitis (S); Acné severo de los tipos conglobata o fulminas (A); Pustulosis palmoplantar (P); Hiperostosis, osificación de los cartílagos blandos del tórax (H); y Osteítis seronegativas de tendones y ligamentos (O). Se presenta más frecuentemente en varones en relación 2 a 1, entre los 30 y 50 años de edad.

En la histopatología se ve la dermis invadida por polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas; y hacia la epidermis pústulas llenas de sangre y pus. La evolución del síndrome SAPHO suele ser crónica e impredecible con episodios de complicaciones agudas muy dolorosas. Una vez debilitado el sistema inmune el tejido afectado es atacado por infecciones de *Staphylococcus. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. (30)

### **1.8.2 CLASIFICACIÓN DEL ACNÉ.**

Para su estudio el acné se clasifica en formas y tipos de acné. Desde acné suave hasta casos de acné severo y desde las lesiones típicas en la cara hasta el acné que se presenta en otras zonas del cuerpo. El tipo más común de acné es el Acné Vulgaris que significa literalmente "acné común". Este tipo de acné puede causar espinillas, puntos blancos, brotes, pústulas, nódulos y quistes.

#### **1.8.2.1 Formas de Acné.**

##### **Espinillas.**

Se producen porque hay poros parcialmente bloqueados. El sebo, las células muertas y las bacterias afloran lentamente a la superficie de la piel, y el color negro es causado por los pigmentos que existen en la piel y que son expuestos al aflorar la espinilla.

### **Puntos blancos.**

A diferencia de las espinillas, se producen por poros bloqueados al completo, y son lesiones que se encuentran bajo la piel. Estos poros completamente bloqueados atrapan el sebo, que se une a las células muertas de la piel y a las bacterias para generar la infección y con ello las lesiones.



FUENTE: Cosmetic Dermatology for Skin of Color

FOTOGRAFÍA 3. PUNTOS BLANCOS.

### **Brotes**

Son las marcas de color rojizo normalmente, y de pequeño tamaño, que causan irritación y molestias en la piel. A pesar de su apariencia tierna y al picor que pueden causar, no se los debe apretar porque en muchas ocasiones los brotes causan marcas que tardan mucho en desaparecer.

### **Las pústulas**

Las pústulas son las lesiones que la mayoría de la gente llama granos. Aparecen como un círculo rojo con un centro blanco o amarillo.

### **Los nódulos.**

Esta es una forma de acné mucho más grande. De tacto duro, suelen amontonarse debajo de la superficie de la piel y es una lesión que puede ser dolorosa y durar por varios meses. Este tipo del acné es especialmente vulnerable a los tocamientos y manipulaciones pues puede dejar marcas, de ahí que sea muy recomendable tratarlo con un dermatólogo.

### **Los quistes**

Los quistes son semejantes a los nódulos, pero se diferencian en que se llenan de pus. Es también una lesión dolorosa y es probable que deje marcas si no es tratada. (19)

### **1.8.2.2 Tipos de acné.**

#### **Acné Conglobata.**

Esta es una forma relativamente rara de acné, su principal efecto es la desfiguración de algunas zonas y causa sufrimiento psicológico así como daño físico. Las lesiones grandes se forman en la cara, en el pecho, en la espalda, y nalgas, en las extremidades superiores y en los muslos y puede estar acompañado de numerosas las mujeres, y es una condición que puede persistir durante varios años.

#### **Acné Fulminans.**

Es una aparición repentina del Acné Conglobata acompañado de fiebre y dolor en las articulaciones. Se trata generalmente con esteroides orales.

Folliculitis Gram-Negativa; Esta condición puede ser causada por el tratamiento durante un largo plazo del acné con antibióticos. Es una infección bacteriana que causa pústulas y quistes.



FUENTE: El Acné. Revista de la Facultad de Medicina UNAM

FOTOGRAFÍA 4. ACNÉ FULMINANS

#### **Pyoderma Faciale.**

Este tipo de acné sólo afecta a las mujeres, generalmente entre las edades de 20 y 40. Causa pústulas, nódulos y quistes dolorosos en la cara y puede dar lugar a la aparición de marcas permanentes. Se presentan más casos en mujeres que nunca han padecido de acné, y generalmente desaparece en el transcurso de un año.

## Acné Rosácea.

Forma de acné afecta generalmente a personas mayores a los 30. Causa un sarpullido rojo en las mejillas, en la frente, en la nariz y en el mentón. Pueden presentarse granos y otras alteraciones de la piel. Está más documentado en mujeres que en hombres, aunque los hombres a menudo tienen los síntomas más severos. Es una forma diferente al Acné Vulgaris y por ello su tratamiento es también diferente. (34)



FUENTE: Cosmetic Dermatology for Skin of Color

FOTOGRAFÍA 5. ACNÉ ROSASEO

### 1.8.3 TRATAMIENTO

El acné, en concreto, es un problema muy frecuente que tiene difícil solución mediante los tratamientos convencionales puestos que están diseñados con el fin de prevenir la formación de nuevas lesiones y a ayudar a cicatrizar las lesiones viejas. Los medicamentos locales, tópicos que secan la grasa o promueven el peeling de la piel, suelen contener peróxidos de benzoilo, sulfuro, resorcinol, ácido salicílico.

Para las lesiones que se infectan se prescriben antibióticos tales como la tetraciclina o la eritromicina. También se utilizan antibióticos tópicos sobre el area afectada de la piel, tales como la clindamicina, o la eritromicina que controlan la infección.

La vitamina sintética (isotretinoína) ha demostrado ser beneficiosa en el tratamiento de acné intenso. Pero las mujeres embarazadas y las adolescentes sexualmente activas no deben tomar esta medicación. También existen procedimientos quirúrgicos como el peeling profesional de la piel (químico) la dermoabrasión o la extracción y drenaje de quistes.

Las pequeñas exposiciones solares mejoran el acné sin embargo una exposición al sol o a los rayos ultravioletas no está recomendada porque aumenta el riesgo de contraer cáncer de piel, existen otros tratamientos domésticos que pueden disminuir los efectos del acné. (34)

El principal inconveniente que presentan la mayoría de estos tratamientos es que después de un tiempo de haberlo finalizado pueden aparecer recaídas y brotes mayores que los que en un principio se tenía; efecto que no ocurre con los tratamientos naturales. Una vez se obtienen los resultados deseados la piel queda renovada y sólo es necesario seguir un tratamiento de mantenimiento para evitar que aparezcan nuevamente granos con el consumo de plantas depuradoras. (18)



## CAPÍTULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL.

#### 2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo experimental necesario se llevó a cabo en tres distintos laboratorios de acuerdo a las necesidades que se presentaron en el transcurso de la investigación:

- Laboratorios de productos naturales Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Microbiología clínica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- CITEFARM de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2. FACTORES DE ESTUDIO.

Se consideraron como factores de estudio de esta investigación:

- Concentración de extractos de caléndula y propóleo en distinta proporción.
- Formulaciones de gel cosméutico antiacné.

#### 2.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 2.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y VEGETAL.

- Las flores de caléndula fueron obtenidas secas y previamente procesadas por la empresa “Jambi Kiwa” la que garantizó la calidad orgánica de la droga cruda.
- El propóleo se obtuvo del sector del “Guzo” cantón Penipe en estado impuro, recolectado mediante la técnica de raspado en junio del 2011.
- Bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 2.3.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Aplicadores estériles
- Asa de siembra
- Bandejas de plástico
- Balones volumétricos
- Caja de guantes
- Caja de mascarillas
- Matraces
- Embudo
- Espátula
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Cápsulas de porcelana.
- Tubos colapsables.
- Papel parafina
- Placas petri descartables.
- Pera de succión
- Pipetas de 1mL-5mL- 10mL
- Probetas de 10mL-50mL- 100mL
- Rollo de algodón
- Trípode
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación de 250mL
- Vasos descartables de plástico
- Varrilla de agitación.

### 2.3.3 EQUIPOS

- Autoclave OMNIclave A3-72990
- Baño María ML W11
- Balanza analítica Sartorius GMBH 2842
- Balanza de precisión OHAUS 3,135,344
- Centrifuga ALO 4217
- Estufa MEMMER U15
- Estufa bacteriológica FAMEN 002CB
- Espectrofotómetro THERMO
- Microscopio OLYMPUS CX3
- pH-metro
- Refractómetro de Abbe
- Rotavapor BELLUCCI
- Viscosímetro SELECTA P04
- Ultrasonido
- Sellador de Plástico

### 2.3.2. REACTIVOS

- Ácido sulfúrico al 10%
- Ácido cítrico al 40%
- Agar Muller-Hinton MERK
- Agar soya triptica MERK
- Agua destilada
- Alcohol metílico
- Caldo cerebro-corazón MERK
- Caldo soya triptica MERK
- Carboximetilcelulosa
- Carbopol ULTREZ 10
- TEA
- Glicerina
- Urea M&B
- Etanol de 96°
- Metanol absoluto
- Metilparabeno
- Propilenglicol.
- propilparabeno
- Solución salina al 0.9%

## 2.4 TÉCNICAS

### 2.4.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

#### 2.4.1.1 Obtención de extracto fluido de caléndula por percolación.

- En un recipiente de acero inoxidable de poca profundidad se colocó la droga cruda pesada y se remojó con menstruo (etanol al 70%), procurando no dejar liquido residual empleando un volumen no inferior al peso de la droga. Se dejó en reposo por 15 min.
- Se transfirió la droga humectada a un percolador previamente preparado, se cubrió la superficie con un disco metálico con orificios y se presionó procurando no dejar burbujas de aire en el percolador
- Cubriendo nuevamente con menstruo la masa vegetal hasta dejar de 3 a 5 cm por encima de la droga.
- Se abrió la llave del percolador y se dejó que el líquido de extracción salga lentamente con un flujo de 1 mL/min. Hasta que se obtuvo una primera fracción de 85% de extracto; fracción que se guardó para una concentración posterior.

- Luego el residuo del extracto se maceró por 24 horas con la finalidad de completar el 100% del volumen de extracto requerido.
- Se percoló hasta agotamiento de la droga
- Luego de completado el volumen requerido se procedió a la concentración del mismo mediante destilación simple u otro método similar a una temperatura que no exceda los 60 °C para evitar la degradación de los principios activos termolábiles presentes.

#### **2.4.1.2 Obtención del extracto hidroalcohólicos de propóleo según el método Rumano.**

Previamente se analizó el propóleo recolectado en bruto y se separó las impurezas macroscópicas. Se congeló la cantidad obtenida de propóleo a 0 °C por espacio de 48 horas, y se desmenuzó. (37)

##### **FASE ACUOSA.**

- Para separarlo de la cera se añadió 100mL de agua caliente a una temperatura máxima de 70°C por espacio de 60 min.
- Después se enfrió a 8 °C por 60 min, tiempo en el cual se formaron dos fases una acuosa y otra cerosa que se retiró con cuidado.
- Luego se agregó 25 mL de propilenglicol y se aplicó calor a 55 °C por aproximadamente 5 horas; se filtró y se obtuvo una fase acuosa.

##### **FASE ALCOHÓLICA.**

- El residuo del filtrado se disolvió con etanol al 90% y se sometió al calor entre 40 – 65 °C / 3 horas.
- Después de este tiempo se filtró y al residuo se procedió a someterlo al tratamiento anterior hasta extracción total de las sustancias activas solubles en etanol.
- Se unió ambas fases y se procedio a concentración mediante la metodología apropiada. (37)

#### **2.4.1.3 Obtención de Extracto Blando Total.**

- Luego con cada uno de los extractos obtenidos se realizó una destilación simple hasta la mitad del volumen obtenido en un balón de vidrio esmerilado previamente pesado.
- El mismo que se procedió a una evaporación casi total del líquido de menstuo con la ayuda del rotavapor.
- El sólido obtenido se sometió a secado en estufa a 60°C durante 2 horas, para obtener el denominado extracto blando total.
- Hasta dejar una pasta espesa la cual es el extracto total blando que nos facilitó la obtención de extractos estandarizados

#### **2.4.1.4 Obtención de Extracto Estandarizado.**

Un extracto estandarizado es un preparado líquido que contiene una proporción fija y certera de extracto blando o constituyente activo, que garantiza el contenido de uno o más principios activos o compuestos marcadores en un volumen determinado de solvente.

Esta concentración influye en la calidad del producto natural, y nos permite ajustar la formulación de una droga vegetal facilitando determinar con precisión la actividad terapéutica de la droga o de los principios activos.

#### **Extracto Estandarizado De Flores De Caléndula.**

- Para la obtención de este extracto estandarizado, se preparó una solución de etanol al 60%.
- Se pesó en una balanza analítica 3 g de extracto blando total de flores de caléndula y se procedió a disolver con 60 mL de la solución previamente preparada en un vaso de precipitación a una temperatura constante de 60 °C
- Una vez disuelto se trasvaso a un balón aforado de 100 mL y se procuro evitar pérdidas, y entonces se afora a 100 mL.

### **Extracto Estandarizado De Propóleo.**

- Al igual que el extracto anterior se preparó una solución de etanol al 60%.
- Se pesó 2 g de extracto blando total de propóleo en una balanza analítica y se procedió a disolver en 80 mL de disolvente, y con ayuda del ultrasonido por espacio de 45 min. En un erlemmeyer de 100mL, se evito en lo posible la perdida de disolvente por evaporación.
- Una vez disuelto se pasó a un balón volumétrico y se aforo a 100mL.

En ambos extractos la concentración de droga procesada se calculó con la siguiente ecuación

$$\text{concentración de extracto blando} = \frac{Peb}{Vs} = \frac{mg}{mL}$$

En donde:

Peb = peso del extracto blando en miligramos

Vs = volumen del solvente en mililitros.

### **2.4.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS.**

Hace referencia a la medida de distintos parámetros que determinan la calidad de los extractos obtenido.

#### **2.4.2.1 Determinación de los Requisitos Organolépticos.**

##### **Determinación del Olor.**

- Se tomó una tira de papel secante de 1cm de ancho por 10 cm de largo, y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo.
- Se apercibió y se determinó si corresponde con las características del producto.

##### **Determinación Del Color.**

- Se tomó un tubo de ensayo bien seco y se llenó hasta las tres cuartas partes del tubo con la muestra y se observó, el color, la transparencia, la presencia de partículas y si separa en capas.

### **Determinación De La Densidad Relativa.**

- Es un término que equivale a peso específico.

### **Determinación del Índice de Refracción.**

- El índice de refracción es una característica constante y única para cada sustancia la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio. Relación que viene dada por la siguiente ecuación:

$$n_{\eta} = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$$

- Se colocó una gota de agua destilada sobre el prisma del refractómetro, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible, que aparece en la línea límite del campo visual que lo divide entre claro y oscuro.
- Luego de realizado el ajuste anterior se colocó una gota de extracto y se procedió de igual manera que la anterior.
- Para expresar los resultados se hicieron tres mediciones y se calculó el promedio de las mismas, dos o más lecturas no debe inferir en más de 0.002.
- Para las determinaciones no realizadas a la temperatura de referencia se utilizo la siguiente formula.

$$N_{d^{25}} = N_{d^t} + 0.00044 \times (T-25)$$

Donde:

$N_{d^{25}}$  = Índice de refracción a 25°C

$N_{d^t}$  = Índice de refracción a temperatura ambiente

T = Valor de la temperatura a la que se realiza la medición.

0,00044=Factor de corrección por grados centígrados.

### **Determinación de Potencial Hidrogeno.**

Para caracterizar la acidez o alcalinidad del extracto mediante la medición del índice de hidrogeno que es un valor numérico que expresa la mayor o menor acidez de una solución en función de lo iones de hidrogeno u OH libres.

Procedimiento:

- Se preparó una solución reguladora de pH en rango de 0-7, con bitartrato de potasio.
- Se ajustó el electrodo a un pH de 7; luego se procedió a medir el pH de la muestra.
- Los resultados obtenidos se registraron con una cifra decimal.

#### 2.4.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Una vez que obtenido los extracto procedemos al revelamiento fitoquímico también conocido como tamizaje fitoquímico para determinar cualitativamente la presencia o ausencia de metabolitos secundarios mediante la utilización de reacciones colorimétricas. Los ensayos que se realizaron fueron los siguientes:

##### **2.4.3.1 Alcaloides.**

- Se llevó a sequedad 30ml del extracto obtenido
- Se Adiciono 5 mL de HCl al 10% y se calentó por 10min.
- Una vez enfriado el filtrado se dividió en tres tubos de ensayo y a cada uno se agregó unas gotas de los reactivos de reconocimiento: Dragendorff, Meyer, y Wagner.
- Una leve precipitación o turbidez evidencio la presencia de alcaloides.

##### **2.4.3.2 Flavonoides.**

- Se colocó en un tubo 2mL de extracto, y algunos fragmentos de magnesio metálico.
- Por las paredes del tubo se agregó unas gotas de HCl diluido.
- Se observó la coloración la cual varió; por la presencia de las diferentes estructuras.

##### **2.4.3.3 Taninos.**

- Se evaporo 5mL de extracto disolviendo el residuo restante en 10mL de agua destilada.



- Se filtró 3mL del extracto acuoso obtenido y se adicionaron unas gotas de cloruro férrico al 10%.
- Se anotó la coloración obtenida.

#### **2.4.3.4 Saponinas.**

- Se evaporó 5mL del extracto obtenido
- El residuo obtenido se retomó en agua hirviendo.
- Una vez que se enfrió, se agitó vigorosamente y se dejó en reposo de 10 a 15 min. Luego se clasificó la presencia de saponinas por la altura y la presencia de espuma.

#### **2.4.3.5 Cardiotónicos.**

- A 10mL del extracto se adicionó 5 mL de una solución de acetato de plomo al 10% y 10mL de agua destilada.
- Se calentó la mezcla en baño María y se filtró.
- El filtrado se agitó con 20mL de cloroformo y se separó en seis tubos de ensayo que se llevaron a sequedad.
- A cada tubo se adicionó los reactivos de identificación: Baljet, Kedde, Raymond-Marthoud, Keller-Killani, Lieberman-Burchard, y Salkowaki.
- Se anotaron las reacciones obtenidas.

#### **2.4.3.6 Cumarinas Volátiles.**

- En un tubo de ensayo se colocó 2mL de extracto, se cubrió con un pedazo de papel filtro impregnado de una solución de NaOH diluido,
- después se llevó a un Baño de agua a 100 °C por 10 min.
- Luego de este tiempo se examinó el papel filtro bajo luz UV
- Se Anotó el color de la fluorescencia.

#### 2.4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS.

La determinación de este parámetro de actividad microbicida nos permite determinar la cantidad necesaria de extracto que va en la formulación. Se considera como Concentración Mínima Bactericida, la menor de aquellas concentraciones donde no hubo crecimiento bacteriano en placas. (21)

##### a. Baterías de dilución.

- Se preparó una serie de tubos en la cual el primero contiene 2mL de caldo nutritivo a doble concentración. Y los demás tuvieron la misma cantidad de caldo a simple concentración.
- Al primer tubo se añadió 2mL del extracto de estudio (2% de propóleo y 3% de caléndula), de este se tomó una alícuota de 2mL y se añadió al siguiente se homogeniza, y así se procedió sucesivamente con los tubos restantes hasta desechar los últimos 2mL.
- De esta forma la concentración de los extractos de estudio en los tubos quedo de la siguiente forma tal como se muestra en el siguiente cuadro. (33)

**CUADRO 1. BATERIA DE DILUCIÓN Y SU EQUIVALENTE EN CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS.**

TUBOS	EXTRACTO DE CALÉNDULA		EXTRACTO DE PROPÓLEO	
	DILUCIÓN	mg/mL	DILUCIÓN	mg/mL
Solución madre	1	30	1	20
1	½	15	½	10
2	¼	7.5	¼	5
3	1/8	3.75	1/8	2.5
4	1/16	1.88	1/16	1.25
5	1/32	0.94	1/32	0.62
6	1/64	0.47	1/64	0.31

##### b. Preparaciones de las cajas con el agar y el extracto vegetal.

- A 9 mL de agar Mueller-Hinton se adiciono 1mL del extracto vegetal de las diluciones realizadas; se vertió en la caja Petri y se dejó solidificar.
- Se incubo durante 24 horas las cajas que presentan crecimiento microbiano se descartaron, se almacenaron las caja libres de contaminación a 4° C; hasta el momento de su utilización.

**c. Preparación del inóculo.**

- Se inoculo una asada de cultivo microbiano previamente aislado y puro en 5 mL de caldo tripticasa de soya, se incubo a 36° C por 24 horas.
- En el caso de las bacterias se diluyo 100µL de la suspensión en 9.9mL de solución salina estéril.
- Se ajustó a la escala McFarland equivalente a 0.5

**d. Determinación de la actividad.**

- Se inoculó el agar con el extracto en la placa previamente rayada tres partes iguales
- En la parte central de cada parte se depositó una azada del microorganismo en estudio
- Se dejó reposar durante 5-10 min.
- Se incubo durante 24 horas.
- Luego de transcurrido el tiempo especificado se reporta la actividad con crecimiento o no de las bacterias mediante UFC. (28)

**2.5. FORMULACIÓN DEL GEL.**

Antes de la formulación de cualquier tipo de cosmético se debe tomar en cuenta que tipo es, lugar de aplicación, usos y funciones de la sustancia activa, presentación, forma de aplicación y sobre todo accesibilidad económica.

(Formulación para 400 gramos de gel)

**2.5.1 FASE I**

- Se deajo 5g de carbopol ultrez10 en 100g de agua esterilizada por espacio de 24h.

**2.5.2 FASE II**

- En un vaso de precipitación se pesó y se disolvió en 50 mL de agua los otros ingredientes que intervinieron en la formulación en el siguiente orden: urea, ácido cítrico, propilenglicol, y glicerina

- En otro vaso de precipitación, en 75 gramos de agua estéril se disolvieron 10g de extracto hidroalcohólicos de propóleo y 15g de extracto de caléndula.

### 2.5.3 FASE III

- Se junto la FASE I y la FASE II en un recipiente adecuado y se mezcló hasta tener una apariencia homogénea. .
- Se Ajustó el peso a 400g con cantidad suficiente de agua en la cual deben estar ya disueltos los agentes conservantes.
- Se neutralizo con TEA hasta que adquiriera la apariencia de gel o pH superior a 6. Sin sobrepasar el límite de 6.5

## 2.6. CONTROL DE CALIDAD DEL GEL.

### 2.6.1 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL GEL ANTIACNÉ DE EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA Y PROPÓLEO.

#### **2.6.1.1. Aspecto.**

Visualmente se determinaron las características de las muestras, verificando si ocurrieron modificaciones macroscópicas con relación al patrón establecido. Para el caso del gel se toma en consideración si es: fluido, viscoso, volátil, homogéneo, transparente, opaco, lechoso.

#### **2.6.1.2. Color.**

Se compara el color de la muestra con el patrón establecido de igual composición. Las fuentes de luz empleadas pueden ser luz blanca, o natural.

#### **2.6.1.3. Olor.**

Se compara el olor de la muestra con el patrón establecido, directamente a través del olfato.

#### **2.6.1.4. Sensación al Tacto.**

Se compara la textura de la muestra para determinar mediante el tacto, si es grumoso, pegajoso.

## 2.6.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL GEL ANTIACNÉ DE EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA Y PROPÓLEO.

### 2.6.2.1 Potencial Hidrogeno (pH)

Para la determinación potenciométrica se utiliza el pH-metro que facilita la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos inmersos en la muestra de estudio. El que da resultados numéricos fácilmente interpretados.

$$H + pH = -\log a$$

En donde:

$a[H^+]$  = actividad de los iones hidrogeno.

Procedimiento:

- Se ajustó el pH-metro digital HANNA con una solución reguladora de pH al rango de 7
- Posteriormente realizar la determinación del pH de la muestra.
- Los resultados obtenidos se anotaron con una cifra decimal.

### 2.6.2.2 Materiales volátiles.

- Se taró tres crisoles hasta peso constante
- Con la ayuda de un desecador se procedió a poner en cada crisol 2 gramos de muestra, luego se sometió a 105°C en una estufa.
- Se tomo mediciones de peso cada 30 minutos por espacio de tres horas hasta tener un peso constante de la muestra.
- La diferencia de la masa de la muestra antes y después del ensayo revelo la cantidad en masa de componentes de la formulación que se volatilizaron en esas condiciones.

### 2.6.2.3 Viscosidad.

La viscosidad es una variable que caracteriza reologicamente a un sistema. La evaluación de este parámetro en un producto cosmético semilíquido ayuda a determinar si presente una consistencia o una fluidez apropiada,

Procedimiento:

- Para la evaluación de la viscosidad se usó el Viscosímetro rotacional P-Selecta ST-2001 con husillo L4 para altas viscosidades.
- Se colocó una muestra representativa del gel formulado en un vaso de precipitación de 100 mL, se ajustó la velocidad del equipo en rpm (revoluciones por minuto).
- Luego se introdujo el husillo en la muestra y se anotó las mediciones obtenidas

#### **2.6.2.4. Centrifugación.**

Este tipo de prueba produce estrés en la muestra simulando un aumento en la fuerza de gravedad, aumentando la movilidad de las partículas en la matriz del gel anticipando de esta manera posibles inestabilidades que se manifiestan en forma de precipitados, separación de fases, formación de escamas, o coalescencia. Las muestras deben ser centrifugadas en temperatura, tiempo y velocidades estándar. Enseguida se evalúa la muestra visualmente y se reporta.

Procedimiento:

- Se colocó 5 gramos de muestra en un tubo de ensayo de 15 mL
- Se procedió a centrifugar por espacio de 30 min a 3500rpm.
- Después de transcurrido ese tiempo se inspecciona visualmente, si en la muestra había algún cambio.

#### **2.6.2.5. Densidad.**

Es el parámetro que representa la relación entre la masa de un compuesto y el volumen que ocupa. En el caso de los semilíquidos este parámetro puede indicar la incorporación de aire o la pérdida de ingredientes volátiles. Expresión de los resultados, la densidad relativa se calcula con la siguiente fórmula.

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

Donde:

M1 = peso del picnómetro con la muestra en g.

M2 = peso del picnómetro con el agua destilada a 25°C en g.

M = peso del picnómetro vacío en g.

Procedimiento:

- Se pesó el picnómetro vacío y seco a 2 °C y se llenó con la muestra problema, manteniéndola a 25 °C durante 15 min.
- El exceso de muestra se retiró con papel toalla antes de pesar el picnómetro con la muestra.
- Se Repitió la operación anterior con agua destilada a 25 °C después de limpiar el picnómetro.

#### **2.6.2.6. Extensibilidad.**

Parámetro que mide la capacidad que tiene un cosmético semilíquido de extenderse sobre la área de aplicación. Para lo cual se determina en una cantidad determinada de muestra de estudio sometida a un peso específico por un periodo de tiempo. El área de extensibilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$AE = \pi(rp)^2$$

En donde:

AE.....Área de extensibilidad.

$\pi$  constante matemática.

Rp promedio de los radios obtenidos.

Procedimiento:

- Se tomó dos placas de vidrio de 20 cm<sup>2</sup>, a una se le rotulo como placa base y es la que va a albergar la muestra de 1 gramo de muestra problema; a la otra placa se le rotulo como placa peso, de la cual se va a tomar la medida.
- En la placa que albergara la muestra se trazó dos diagonales sobre papel milimetrado, en el punto de intersección de las dos rectas se colocó un gramo de muestra

- Se señaló hasta donde se extiende la muestra luego de transcurrido un minuto
- Se hizo mediciones por espacio de 8 min.
- Se repitió este proceso con la placa superior y con un peso de 200g. (31)

#### **2.6.2.7. Recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales.**

La presencia de agua y compuestos orgánicos en la formulación, favorece el crecimiento de microorganismos; los cuales pueden afectar la estructura de los agentes conservantes influenciando en la estabilidad del producto.

Procedimiento:

Este recuento se lo hace mediante la técnica 3M PLACAS PETRIFILM para aerobios mesófilos y coliformes totales.

#### **2.6.3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA.**

Los estudios de estabilidad en productos cosméticos proporcionan información que nos indiquen el grado de estabilidad relativa del producto en las variadas condiciones a las que puede estar sujeto desde su fabricación hasta su expiración.

Para este tipo de pruebas las muestras se almacenan en condiciones que aceleren los cambios posibles que puedan ocurrir durante un plazo de validez establecido. La duración del estudio es de 15 días y auxilia en la selección de las formulaciones.

Todas las muestras en estos estudios son sometidos a condiciones de estrés buscando acelerar el surgimiento de posibles señales de inestabilidad, para lo cual las muestras son sometidas a calentamiento en estufas, enfriamiento en refrigeradores y ciclos alternados de calentamiento y enfriamiento. (17, 20)

Procedimiento:

- Acondicionar una cantidad necesaria de muestra en un recipiente de vidrio neutro, transparente, con tapa con cierre hermético que evite la pérdida de gases o vapor para el medio, y el ingreso de aire; evitando completar el volumen total



del recipiente permitiendo un espacio vacío de un tercio del recipiente para posibles intercambios gaseosos.

- Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 30 minutos, si no hay cambio en las muestras someter al periodo de estabilidad; de lo contrario volver a formular el producto.
- Las muestras que pasan la prueba de centrifugación se someten a la acción de temperaturas y exposición a la luz. De acuerdo al siguiente detalle.

**CUADRO 2. CONDICIONES DE TEMPERATURA PARA ENSAYO DE ESTABILIDAD ACELERADA**

Periodo	Temperatura	Prueba
15 días	37° C +/- 1 °C	Calentamiento constante.
15 días	4° C +/- 1 °C	Enfriamiento constante.
15 días	18° C +/- 1 °C	Temperatura ambiente.
Ciclos de 24 horas	Calentamiento/ Enfriamiento	Estrés constante

- Terminado el periodo de estabilidad acelerado, realizar en las muestras determinación de flavonoides totales mediante espectrofotometría.

### 2.6.3.1 Flavonoides totales.

#### a. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

- Se pesó 6.75 mg de quercetina en un balón volumétrico de 25mL y se aforar con etanol al 60%.
- Se Tomó alícuotas de 500 µL, 250 µL, 125 µL, 75 µL en cuatro balones volumétricos de 25mL, a cada uno añadir 200 µL de cloruro de aluminio al 2% en etanol absoluto, y aforar al volumen con la solución de etanol al 60%.
- Luego se dejó reposar por 30min y se procede a leer a415 nm cada solución y elaborar la curva de calibración. (38)

## b. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

- Se Pesó un gramo de la muestra de gel y se disolvió con 10 mL de etanol al 60 % a una temperatura de 60 °C.
- Se Adiciono 500 µL de una solución de acetato de plomo al 1% y filtro.
- Se Recogió el filtrado en balón aforado de 25mL y se adiciono 200 µL de cloruro de aluminio al 2% en etanol absoluto,
- Se agito evitando perdida de la solución y llevar a volumen con etanol al 60%.
- Se midió a 415 nm.(38)
- Usando la curva de calibración que se obtuvo del estándar se calculó la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina.
- Se utilizó la ecuación de la recta en donde se reemplazó el valor de 'X' de la ecuación por el valor de la absorbancia de cada muestra
- El valor resultante se multiplico por el valor de R (Regresión lineal), y se obtuvo un valor más preciso de concentración. (38)

## 2.7 METODOLOGÍA.

### 2.7.1 FASE DE CAMPO.

El lugar de recolección del propóleo presenta una vegetación caracterizada principalmente por la presencia de bosques mixtos, con árboles de eucalipto, pino, ciprés y en ciertos sectores bosques primarios; también hay la existencia de fincas con una gran cantidad de cultivo de frutas entre las cuales se pueden citar: duraznos, manzanas, claudias, capulí, tomate de árbol, todas ellas cercadas con arbustos de ortiga, arrayan entre otros. Una vez recolectado parte del material de estudio se pesó *in situ*, se etiqueto y se llevó al laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH para su posterior separación y purificación.

## 2.7.2 FASE DE LABORATORIO.

En la fase de laboratorio se realizaron los siguientes procedimientos para evaluar la actividad microbiana de los extractos de *Calendula officinalis* y Propóleo, parte central para la formulación del gel cosméutico antiacné:

1. Obtención y control de calidad del extracto de flores de caléndula.
2. Purificación, obtención, y control de calidad del extracto de Propóleo.
3. Obtención de extractos estandarizados
4. Determinación la Concentración Mínima Bactericida de los extractos de caléndula y propóleo.
5. Formulación del gel cosmecéutico de caléndula y propóleo.
6. Control de calidad del gel cosmecéutico.
7. Estudio de estabilidad acelerada del producto formulado.

También se realizó un tratamiento estadístico de los datos obtenidos mediante:

- Análisis de varianza en la determinación de Concentración Mínima Bactericida
- Prueba de t-student para la diferencia de concentración de flavonoides totales terminado el periodo de estabilidad acelerada.

## 2.7.3. FORMULACIÓN DEL GEL COSMÉCEUTICO ANTIACNÉ.

- Una vez que se obtuvieron los extractos estandarizados de *Calendula officinalis*. y Propóleo; se procedió a evaluar in vitro la Concentración Mínima Bactericida según el método de baterías de disolución modificado por Rojas y replicado para esta investigación, sobre bacteria oportunistas causantes del cuadro clínico del acné.(33)
- Cada una de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, y *Pseudomonas aureoginosa* ATCC 27853; fue sometida a la acción de un extracto, en seis tratamientos, cada uno por triplicado; cada tratamiento corresponde a una dilución de los extractos bajo estudio tal como lo demuestra la tabla de dilución del cuadro N° 01, además de un control positivo, un control negativo y un blanco.

- Luego de un periodo de incubación de 24 horas en agar Moller-Hinton se procedió a contar las UFC (unidades formadoras de colonias) para determinación del efecto microbicida. Descartándose las altas concentraciones donde no había crecimiento alguno y las bajas concentraciones en las que habían un exceso de crecimiento. Interesándonos solo aquellas concentraciones en donde habían crecimientos de 2 a 8 UFC.
- Una vez que se haya hecho el tratamiento estadístico; se procede a formular el gel con las concentraciones recomendadas por dicho tratamiento. Un factor a tomar en cuenta en la formulación del gel es el porcentaje del agente gelificante en nuestro caso fue el carbopol. Además de los otros ingredientes como la urea, ácido cítrico, glicerina que cumplen la función de agentes humectantes.
- Luego de obtenida la formulación más adecuada desde el punto de vista organoléptico se procedió al control de calidad fisicoquímico tomando en consideración la viscosidad del formulado así como el índice de extensibilidad del mismo parámetros reológicos claves en la calidad de un gel.
- Después se procedió a someter a la mejor formulación a un periodo de estabilidad acelerada tomando en consideración la medición de flavonoides totales presentes en el gel antes de este periodo y después del mismo.

## **2.8 TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Debido al número y a la naturaleza de los tratamientos a los que se sometio las distintas unidades experimentales y considerando aspectos tales como el grado de precisión requerido y la disponibilidad de la materia prima a utilizar en el desarrollo en este trabajo de investigación se utilizó el diseño experimental de Bloques Completamente Al Azar; las razones por las que se ha elegido este tipo de diseño es la flexibilidad del diseño y la sencillez tanto del diseño como del tratamiento de los datos estadístico obtenidos en la investigación de la concentración mínima bactericida de los extractos antes de proceder a la formulación del gel cosméutico antiacné propuesto en la investigación. (2, 13)

**Descripción del problema.**

Variable respuesta                      Unidades Formadoras de colonias (UFC)  
 Factor de interés:                      Concentración Mínima Bactericida de los extractos  
 Unidades experimentales: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, y *Pseudomonas aureoginosa* ATCC 27853  
 Diseño experimental:                  3X6X2X3  
 Modelo:                                       $Y_{ij} = \mu_{ij} + \alpha_{ij} + e_{ij}$

Donde:

$\mu_{ij}$ : es la media asociada con alguna concentración  $i, j$  microbicida de los extractos

$\alpha_{ij}$ : efecto debido a la concentración del extracto

$e_{ij}$ : error asociado a la observación  $Y_{ij}$  esperada

$$H_0 = \mu_i > \mu_j; \mu_i - \mu_j > 0$$

$$H_1 = \mu_i < \mu_j; \mu_i - \mu_j < 0 \text{ para algún } i, j$$

**CUADRO 3. MATRIZ EXPERIMENTAL**

Extractos	E1			E2			Repeticiones
<b>BACTERIAS ATCC.</b>							
Grupo experimental							
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Pseudomonas aureoginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Pseudomonas aureoginosa</i> ATCC 27853	
C1	E <sub>1</sub> C <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>1</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>1</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>1</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>1</sub> M <sub>3</sub>	3
C2	E <sub>1</sub> C <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>2</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>2</sub> M <sub>3</sub>	3
C3	E <sub>1</sub> C <sub>3</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>3</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>3</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>3</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>3</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>3</sub> M <sub>3</sub>	3
C4	E <sub>1</sub> C <sub>4</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>4</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>4</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>4</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>4</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>4</sub> M <sub>3</sub>	3
C5	E <sub>1</sub> C <sub>5</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>5</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>5</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>5</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>5</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>5</sub> M <sub>3</sub>	3
C6	E <sub>1</sub> C <sub>6</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>6</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>6</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>6</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>6</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>6</sub> M <sub>3</sub>	3
Grupos Control							
C-	E <sub>1</sub> C <sub>-</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>-</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> C <sub>-</sub> M <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>-</sub> M <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>-</sub> M <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> C <sub>-</sub> M <sub>3</sub>	3
B	E <sub>1</sub> BM <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> BM <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> BM <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> BM <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> BM <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> BM <sub>3</sub>	3

C 1-6 = Distintas concentración; E1 = Extracto de caléndula, E2 = extracto de propóleo; M1, = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, M2 = *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, M3= *Pseudomonas aureoginosa* ATCC 27853; C- Control Negativo: *etanol* al 60%; y B = Blanco: agua estéril.

## **2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Antes de proceder a formular el gel cosméutico antiacné propuesto en la investigación con la concentración mínima efectiva microbicida. Se continuó con la tabulación de los datos para poder realizar el análisis de varianza.

### **2.9.1. ANÁLISIS DE VARIANZA O ANOVA.**

Tratamiento estadístico que nos permite comparar dos o más media obtenidos, debido a que nos permite determinar si la media entre los tratamientos es mayor que la variabilidad esperada dentro de cada tratamiento. En definitiva un análisis de varianza nos permite determinar si las medias son o no estadísticamente significativas.

En esta investigación de análisis de varianza nos permite establecer la relación entre la variable dependiente unidades formadoras de colonias (UFC) y un factor independiente (concentración de los extractos).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A continuación se presentan para la discusión los resultados obtenidos luego de la aplicación de la metodología para la formulación del gel cosméutico propuesto en la investigación.

#### 3.1 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LA MATERIA PRIMA

**CUADRO 4 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LA MATERIA PRIMA PREVIA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Calendula officinalis*, PROPÓLEO. LABORATORIO DE BIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA NOVIEMBRE 2011.**

PARÁMETRO	MÉTODO	CALÉNDULA	PROPÓLEO
Presentación	Visual	Pétalos y corolas	Gomoso
Tamaño de la muestra	Visual y táctil	Regular	Irregular
Aspecto	Visual	Heterogéneo	Heterogéneo, terroso
Color	Visual	Amarillo, rojizo, verde	Pardo, ámbar
Olor	Olfato	Floral	Parecido a la miel de abeja
Sabor	Gusto	Ligeramente a hierba	Amargo, Astringente.
Impurezas	Visual	Se presentan pétalos y corolas en muy secas	Esta resina presenta restos de insectos: alas, patas tejido vegetal polvo

**CUADRO 5 PORCENTAJE DE IMPUREZAS MACROSCÓPICAS DE LA MATERIA PRIMA**

MATERIA PRIMA	PESO TOTAL (g)	IMPUREZAS (g)	SIN IMPUREZAS (g)	PORCENTAJE DE IMPUREZAS (%)
<i>Calendula officinalis</i>	135.3	37.4	97.9	<b>27,64</b>
Propóleo	90.4	7.9	82.9	<b>8.7</b>

Se observó que la materia prima obtenida tiene una considerable cantidad de impurezas: otros tipos de flores y restos vegetales en las Flores de *Calendula officinalis*; restos de insectos, trozos de colmenas y material terroso en el propóleo; que se separó y peso tal como lo demuestran los Cuadros 4 y 5.

### 3.2 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

**CUADRO 6 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD PARA EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE FLORES DE CALÉNDULA Y PROPÓLEO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA FEBRERO 2012.**

PARÁMETRO	MÉTODO	EXTRACTO DE CALÉNDULA	EXTRACTO DE PROPÓLEO.
Color	Visual	Amarillo	Amarillo lechoso
Olor	Olfativo	Hierba	Miel de abeja
Precipitado	Visual	No presenta	Presenta
Aspecto	Visual	Transparente	Turbio.
Densidad relativa	Picnometría	0.9090	0.9393
Índice de refracción	Refractometría	19.9969	20.6999
pH	Potenciometría	6.3	5.3

Los resultados reportados en el Cuadro 6 establecen los parámetros organolépticos y fisicoquímicos de calidad de los extractos hidroalcohólicos obtenidos

### 3.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

**CUADRO 7. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS *Calendula officinalis*, PROPÓLEO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA FEBRERO 2012.**

METABOLITO	MÉTODO	EXTRACTO DE CALÉNDULA	EXTRACTO DE PROPÓLEO.
Alcaloides	Visual-Colorimétrico	+	-
Cardiotónicos	Visual-Colorimétrico	-	+
Cumarinas	Visual-Colorimétrico	-	-
Flavonoides	Visual-Colorimétrico	++	+++
Taninos conjugados	Visual-Colorimétrico	+	-
Taninos hidrolizados		-	-
Saponinas.	Visual-Colorimétrico	-	+

+ = baja evidencia; ++ = evidencia; +++= alta evidencia; - = negativo

Se identificó en los extractos hidroalcohólicos los siguientes grupos fitoquímicos: Alcaloides, Flavonoides y Taninos Conjugados en *Calendula officinalis*; Saponinas, Cardiotónicos y Flavonoides en el Propóleo. Algunos de estos grupos concuerdan con lo que reporto Cando, M en su trabajo de titulación en el año 2007. Las principales diferencias están en la presencia de algunos metabolitos, que en el tamizaje fitoquímico que se realizó para este estudio, no se evidenciaron. (36)



### 3.4 ACTIVIDAD MICROBICIDA.

Se realizó una batería de dilución con el objeto de determinar la Concentración Mínima Bactericida, a la cual cada extracto tiene efecto antibacteriano esperado y medido mediante el conteo de UFC. Parámetro importante para la posterior formulación del gel cosmecéutico antiacné.

**CUADRO 8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS *Calendula officinalis*, PROPÓLEO. CITEFARM FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH RIOBAMBA. NOVIEMBRE 2012.**

E. IDROALCOHÓLICO	<i>Calendula officinalis</i> Lin.						Propóleo					
	Unidades formadoras de colonias (UFC)											
	Concentraciones µg/mL											
MICROORGANISMOS	300	150	75	37.5	18.7	9.34	200	100	50	25	12.5	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	15.3	92.3	91	96.6	0	0	0.33	20.3	96.6	98.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0	0	21.3	41.3	95.6	96.3	0	0	0.33	49.	100	100
<i>Pseudomonas aureoginosa</i> ATCC 27853	0	0	1.33	90	94	100.3	0	0	3.33	80.3	100	100

Se determinó que en la concentración de 50 µg/mL del extracto hidroalcohólicos de propóleo presento un bajo crecimiento de UFC para las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; y *Pseudomonas Aureoginosa* ATCC 27853. Las concentraciones correspondientes a 200 µg/mL y 100 µg/mL son muy elevadas para la formulación del gel cosmecéutico, las concentraciones restantes que van de 25 a 6,25 µg/mL son muy diluidas y presentan un elevado crecimiento de UFC y no son aptas para la formulación.

Para el extracto de flores de caléndula la concentración de 150 µg/mL no presentan UFC para las bacterias ATCC antes mencionadas; la concentración de 300 µg/mL es elevada para la formulación del gel; las concentraciones entre 75-9,34 µg/mL presentan un crecimiento elevado de UFC.

### 3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LOS EXTRACTOS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS: DE FLORES DE CALÉNDULA Y PROPÓLEO.

#### **Hipótesis Estadística:**

- *Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):* La media del efecto microbicida del extracto C3 de propóleo es menor que la media del efecto microbicida del extracto C3 de flores de caléndula. De manera que la diferencia de las dos medias es menor a cero
- *Hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>):* La media del efecto microbicida del extracto C3 de propóleo es mayor que la media del efecto microbicida del extracto C3 de flores de caléndula. De manera que la diferencia de las dos medias es mayor a cero.

Mediante ANOVA se pudo expresar que las UFC de los distintos microorganismos sometidos al estudio de Concentración Mínima Bactericida de los extractos de caléndula y propóleo dependen únicamente de la concentración de los extractos y no de los otros factores que intervienen en la investigación. De acuerdo al p valor resultante del ANOVA igual a **0,008** valor que es menor a **0.05** grados de libertad; requisito que nos permite rechazar la hipótesis nula; por lo tanto se tiene que las UFC dependen exclusivamente de la concentración de los extractos.

### 3.7. FORMULACIÓN DEL GEL COSMÉCEUTICO

Una vez que se determinó la Concentración Mínima Bactericida de los extractos de *Calendula officinalis*, Propóleo. Se formuló el gel cosméceutico con distintas concentraciones de agente gelificante (Carbopol Ultrez 10), y se evaluó de manera visual y táctil las características reológicas que presenta cada formulación de acuerdo a los lineamientos establecidos por la ASOCIACIÓN BRASILEÑA DE COSMÉTICOS. (17)

**CUADRO 9 INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA FORMULACIÓN DEL GEL COSMECÉUTICO COSMÉCEUTICO ANTIACNÉ CON EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* Y PROPÓLEO. CITEFARM FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2013**

COMPONENTE COSMÉTICO	INGREDIENTE	EFECTO
SUSTANCIAS ACTIVAS	- Extracto de Flores de Caléndula	- Antiinflamatorio.
	- Extracto de Propoleo.	
	- Urea	- Antibacteriano
	- Glicerina	- Humectante
	- Ácido Cítrico	- Humectante
EXCIPIENTES	- Propilenglicol	- Despigmentante
		- Humectante
	- Carbopol ULTREZ 10	- Agente gelificante
CORRECTIVOS	- TEA	- Neutralizante, espesante
	- Agua Estéril	- Matriz gelificante, dispersante, vehículo.
	- Metilparabeno	- Antibacterianos
	- Propilparabeno	

De acuerdo a la definición de cosmético cada uno de los ingredientes mostrados tienen un efecto cosmético determinado y le dan la funcionalidad, estabilidad, y forma comercial al gel formulado tiene en su composición sustancias antibacterianas, antiinflamatorias, y los llamados factores naturales de humectación entre los que tenemos a la glicerina, urea y propilenglicol según Couturaud, V. en el Handbook of Cosmetic Science and Technology publicado en el 2009.

### 3.7.1 CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

**CUADRO 9. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD PARA FORMULACIONES DE GEL COSMÉCEUTICO ANTIACNÉ CON EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* Y PROPÓLEO. CITEFARM FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2013**

PARÁMETRO	BLANCO	F1	F2	F3	F4
Aspecto	Gel, viscoso, transparente	Gel, viscoso levemente turbio	Gel Ligeramente fluido, transparente	Gel turbio, fluido	Gel ligeramente viscoso, turbio
Color	incoloro	Ligeramente amarillo	Amarillo	Amarillo claro	Amarillo Claro
Olor	Inodoro	Levemente modificado	Modificado	Levemente modificado	Levemente modificado
Apariencia	homogéneo,	Heterogénea	Homogéneo	Heterogéneo grumoso	Heterogéneo Grumoso
Sabor	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica

El Cuadro 9 demuestra las características organolépticas de cada formulación que están en función de las características del producto cosmético y de los ingredientes utilizados. Los geles que presentan características fluidas, de apariencia turbia, heterogéneos y con grumos en su estructura no son aceptados por el consumidor; criterios que determinan una baja calidad del producto cosmeceútico formulado. (17)

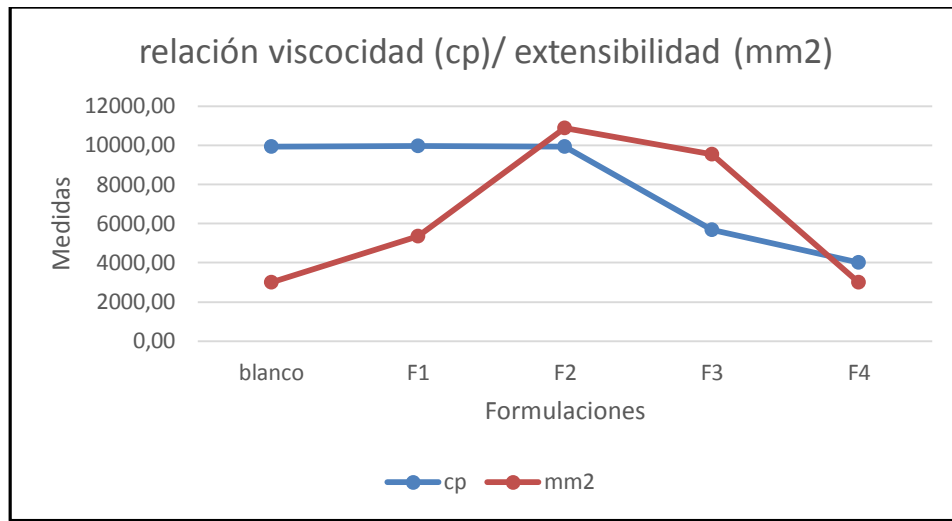
**CUADRO 10 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS MEDIDOS EN DISTINTAS FORMULACIONES DE GEL COSMÉCEUTICO ANTIACNÉ CITEFARM FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH RIOBAMBA. OCTUBRE 2012**

Formulación	Matriz gelificante (g)						
		pH	Centrifugación	Viscosidad (cp)	Materia volátil (%)	Densidad	Índice de extensibilidad (mm <sup>2</sup> )
Blanco	8	6.54	Sin cambio	9983	25.62	0.958	3007.551
F1	8	6.84	Sin cambio	9971	20.04	0.939	5363.288
F2	6	6.9	Sin cambio	9945	17.14	1.030	10888.564
F3	4	6.57	Sin cambio	5681	28.58	1.020	9551.488
F4	5	5.99	Sin cambio	4007	29.01	1.010	3007.551

F 1-4 = Formulación

El cuadro muestra las distintas mediciones que se hizo en las formulaciones obteniéndose varios resultados, de los que se destacan son lo que presento la formulación F2 que se asemejan a lo aconsejada por la norma brasileña y Registro Sanitario de Panamá.(17, 43)

**GRÁFICO 2 RELACIÓN ÍNDICE DE VISCOSIDAD CON EL ÍNDICE DE EXTENSIBILIDAD**



Al relacionar las líneas de tendencia de la viscosidad y del índice de extensibilidad se cortan cerca de la formulación F2, lo que demuestra una relación directa entre ambos parámetros.

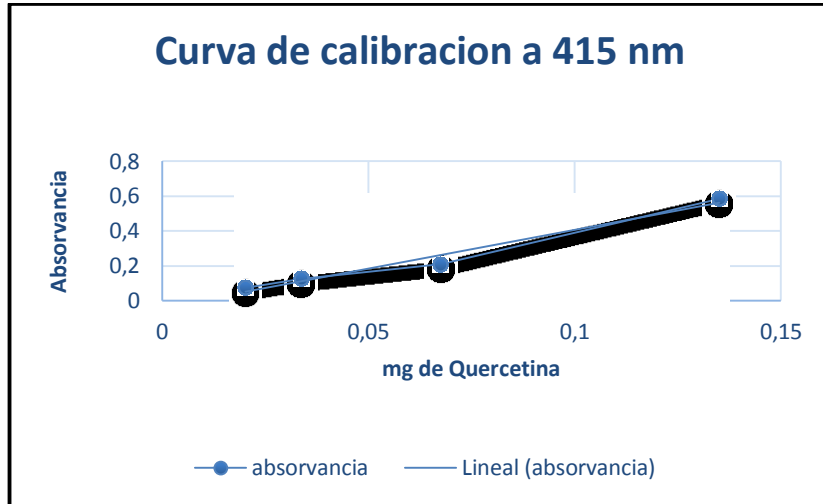
**CUADRO 11 RESULTADOS DEL RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS COLIFORMES TOTALES. CITEFARM FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH RIOBAMBA. ENERO DEL 2012.**

PARÁMETRO	MÉTODO	FORMULACIÓN N°2
Aerobios mesófilos	Recuento por placa Petri film Valor de referencia ( $1 \times 10^{-5}$ UFC/g)	<1
Coliformes totales	Recuento por placa Petri film Valor de referencia (10 UFC/g)	<1

Valores obtenidos del recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales de la formulación; valores que se encuentran dentro del límite establecido lo que indica una calidad apropiada del producto y de las técnicas utilizadas durante la formulación. Lo que demuestra que la concentración de las sustancias conservantes utilizadas en la formulación es efectiva.

### 3.8 ENSAYO DE ESTABILIDAD ACELERADA Y DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

GRÁFICO 3 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ESTÁNDAR DE QUERCETINA.



En el gráfico 3 se observa la curva de calibración obtenida con el estándar de quercetina y facilitara el cálculo mediante regresión lineal la concentración de mg de quercetina presentes en la muestra antes y después del tratamiento de estabilidad acelerada al que fue sometido el gel cosmeceútico.

Para el cálculo se utilizó la ecuación de la línea recta: (38)

$$y = a + b \cdot x$$

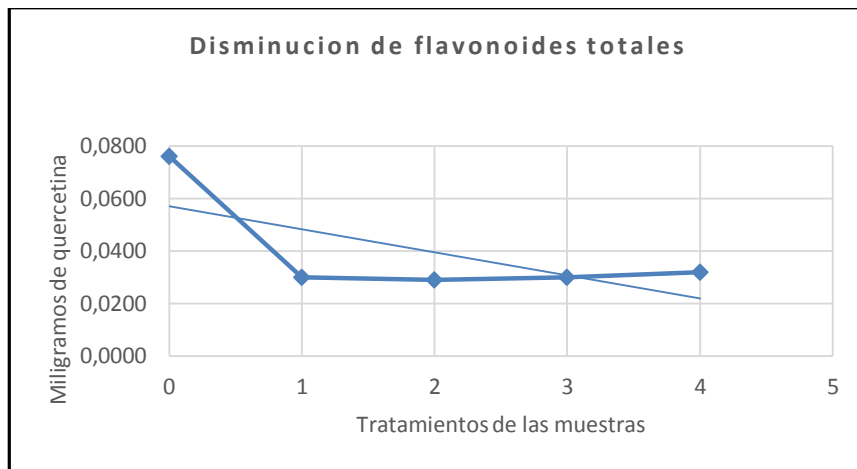
**CUADRO 12 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONOIDES TOTALES. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH RIOBAMBA OCTUBRE DEL 2013**

Tratamientos.	FLAVONOIDES TOTALES EN FUNCIÓN DE QUERCETINA								
	Ambiente		Refrigeración		Calentamiento		Variación 24 horas		
	18°C +/- 5°C		4°C +/- 1°C		37°C +/- 1°C		4°C/37°C		
	Absorbancia								
Antes	0.303	0.076mg							
Después	0.097	0.030mg	0.092	0.029mg	0.075	0.025mg	0.104	0.032mg	

**CUADRO 13 VALORES ESTADÍSTICO t-student.**

t-student: $H_0 : \mu = 0.076$	
$H_1 : \mu < 0.076$	
t-Student	-31,9302
diferencia	3
p-valor	3.375e-05

**GRÁFICO 3 DISMINUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES LUEGO DEL PERIODO DE ESTABILIDAD ACELERADA.**



En el Cuadro 12 se comprobó que la concentración de flavonoides totales medidos en el gel cosmeceútico antes del tratamiento de estabilidad acelerada es mayor y corresponde a un valor de 0.076 mg de quercetina. Luego de este ciclo de tratamiento se notó un claro decaimiento de dicha concentración por efectos de temperatura y exposición a la luz. De acuerdo al Estadístico t-student (cuadro 13) y como lo demuestra el gráfico 4.

## CAPÍTULO IV

### 4 CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de flores de caléndula (*Calendula officinalis*.) y Propóleo mediante percolación y método Rumano respectivamente; se realizó la determinación de los parámetros de calidad del extracto y el tamizaje fitoquímico permitió identificar la presencia de alcaloides, flavonoides y taninos conjugados en el extracto de flores de caléndula; y en el extracto de propóleo: cardiotónicos, flavonoides y saponinas. (Cuadro 6 y 7 )
2. Utilizando bacterias ATCC del Cepario de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, se determinó la Concentración Mínima Bactericida de los extractos hidroalcohólicos: *Calendula officinalis* es 150 µg/mL , y Propóleo 100 µg/mL (Cuadro 8)
3. Los parámetros medidos: Índice de viscosidad, y extensibilidad para la formulación F2 que presento las mejores características organolépticas es de 9945 cp. y 10888,5 mm<sup>2</sup> respectivamente parámetros que le dan características reológicas y de estabilidad al gel formulado y se aproximan a las establecidas por la norma brasileña para cosméticos ANVISA, 2005. (Cuadros 9 y 10)
4. La formulación F2 se sometió a un estudio de estabilidad acelerada por un periodo de 15 días a temperaturas constantes de 37 °C, y 4 °C; y variables que corresponden a temperatura ambiente con un promedio de 18 °C +/- 5 °C y ciclos de 24 horas de calentamiento a 37 °C y enfriamiento a 4 °C. Terminado este periodo se midió la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina y se determinó que existe diferencia significativa que se demostró mediante el test estadístico t-student.(Cuadro13 y Gráfico 4)



## **CAPÍTULO V**

### **5 RECOMENDACIONES**

1. Ampliar el estudio del propóleo del sector del Guzo Canton Penipe como una nueva sustancia para el tratamiento de algunos defectos cardiacos puesto que durante el tamizaje fitoquímico se determinó mediante reacciones de identificación la presencia de cardiotónicos
2. Seguir con el estudio comprobando la eficacia del gel cosmeceútico antiacné formulado de manera instrumental y en vivo para tener mejores resultados.
3. Hacer un estudio de estabilidad durante el lapso de un año almacenado a distintas condiciones de temperatura, humedad y altura.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESUMEN

Se Formuló un gel cosméutico Antiacné a base de Extracto: de flores de Caléndula (*Caléndula officinalis*) y Propóleo en el laboratorio piloto CITEFARM de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Efecto evaluado previamente *in vitro* mediante método experimental con extractos estandarizados de flores de caléndula (*Calendula officinalis*) y Propóleo sustancias activas microbidas que evitan la proliferación de bacterias oportunistas causantes del cuadro clínico del acné. Para la formulación del gel se utilizaron distintas concentraciones de agente gelificante. Se mantuvo constante las cantidades de los extractos y los demás ingredientes cosméticos: humectantes, despigmentantes, antioxidantes y conservantes.

Se realizaron cuatro formulaciones de gel y en cada una se determinaron características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas en base a la norma brasileña ANVISA 2005 y la norma panameña GO 2134- 2001.

La formulación F2 presento los siguientes parámetros: gel ligeramente fluido, transparente de color amarillo, de consistencia homogénea. Con un pH de 6.9; índice de viscosidad de 9945 centipoin (cp); una densidad relativa de 1.030; índice de extensibilidad de 10888,5 milímetros cuadrados (mm<sup>2</sup>); y 17,14 % de materiales volátiles. Parámetros que nos permitieron determinar que la formulación F2 es la más estable y presenta mejores características organolépticas para el cliente.

Se recomienda evaluar la eficacia de esta formulación en seres humanos de manera instrumental y *in vivo* para completar esta investigación

## SUMMARY

An anti-acne cosmeceutical gel was formulated from extract of: Calendula flowers (*Calendula officinalis*) and Propolis in the CITEFARM pilot laboratory from the Faculty of Science at the Escuela Superior Politecnica de Chimborazo (Higher Education).

Effect evaluated previously in vitro through experimental method with standardized Calendula flowers extract (*Calendula officinalis*) and Propolis, microbicides active substances avoiding the bacteria proliferation opportunistic causing acne diseases patterns. For the gel formulation different concentrations of gelling agent was used keeping constant the amount of extracts and the rest of the moisturizing ingredients, depigmenting, antioxidants, and preservatives.

It was carried out four gel formulations and in each one was determined chemical-physical, organoleptic, and microbiological characteristics based in the ANVISA 2005 regulation and the GO 2134-2001 Panamanian regulations.

The F2 formulation presented the following parameters: slightly fluid gel, transparent of yellow color, homogenous consistency. With a pH of 6.9; viscosity index of 9945 centipoint (cp); a relative density of 1.030; extensibility index of 10888,5 square millimeter (mm<sup>2</sup>); and volatile materials 17,14%. Parameters that allowed determining that the F2 formulations is more stable and shows better organoleptic characteristics for the customers.

It is recommended to evaluate the effectiveness of this formulations in human beings instrumentally and alive in order to complete this research.

## CAPITULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. **ANDERSEN, M.**, Flavonoids: Chemistry., Biochemistry and Application., 1a ed., New York-United State., Taylor &Francis Group., 2006., Pp: 371-388.
2. **BAHAMONDE, G.**, Métodos Estadísticos y Principios de Diseño Experimental., 2a ed., Quito-Ecuador: Universitaria., 1985., Pp: 97-101
3. **CHEN, T.**, Over-The-Counter Acne Medication; Formulation of Skin Care Products., New York -United State., Tayler and Francis., Volumen 28. Pp: 252-254
4. **COUTURAUD, V.**, Handbook of Cosmetic Science and Technology. New York – United State., Informa Helathcare., 2009., Pp: 6-9
5. **FERNANDEZ, E.**, Acne treatment, Methodologies Formulation Of Skin Care Products., New York – United States., Tayler & Francis., 2006., Pp: 273-276; 282-290.
6. **GRANADOS, R.**, Microbiología., 2a ed., Thomson Paraninfo., Volumen I., 2003., Pp: 165, 175.
7. **HIB, J.**, Histologia de Difiore: Texto y Atlas., 20a ed., Buenos Aires Argentina., El Ateneo., 2001., Pp: 18-21.
8. **MC DANIEL, D.**, The Role of Cosmetic in Dermatology., New York United States., Tayler and Francis. 2006., pp: 187-193.
9. **MAHALINGAM, R.**, Semisolid Dosages: Ointments, Creams and Gels Pharmaceutical Manufacturing Handbook. New Jersey John Wiley and Sons, Inc. 2008., Pp: 288, 291-293,

10. **MIHTEIN, S.**, Definition of Cosmetic; Handbook of Cosmetic Science And Thecnology., 3a ed., New York United States Marcel Dekker. 2001., pp: 6-11.
  
11. **MICHNIAN-KOHN, B.**, Skin:Physiology and Penetration Pathways Delibery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products, Aplications and Formulations., New York – United States., William Andrew Publishing., 2005., pp:79-85.
  
12. **MURRAY, P.**, Microbiología Medica., Madrid España., Elsevier., Pp: 231, 360-361.
  
13. **PRAT, A.**, Control y Mejora de la Calidad. Madrid: Ediciones UPC., 1998., Pp: 105-115.
  
14. **ROWE, R.**, Handbook of Pharmaceutical Excipients., Londres – United King., PharmaceuticalPress., 2006., pp: 111, 118, 794,
  
15. **SABATER, I.**, Cosmetología Para Estética y Belleza. Madrid España., McGraw-Hill., 2012., Pp: 8, 15,17.
  
16. **ALCALDE, M.**, Cosmética Natural y Ecologica: Regulacion y Clasi ficación., Barcelona - España., Offarm., Volumen 27., No 9., 2008., Pp:96-103.
  
17. **ANVISA.**, Guia de Estabilidad de Productos Cosméticos., Brasilia Brasil., Serie Calidad en Productos Cosméticos., Volumen1., 2005., Pp: 11-29.
  
18. **CAMACHO, F.**, Acné. Concepto Epidemiología y Etiopatogenia., Sevilla-España., Piel., Volumen 22., No 9., 2007., Pp: 467-465.
  
19. **DE HOYOS, M.**, Acné: Diagnostica Terapéutica., Madrid – España., Pediatr. Integral., Volumen8 No 3., 2004., Pp: 235-242.
  
20. **ESPAÑA.**, Ficha Técnica de un Producto de Higiene Personal, Cosméticos, y Perfumes., Ebysos., Registro. FT 00001-2012. 2012., Pp: 1-9.

21. **EGIZABEL, M.**, Actividad Antibacteriana In vitro del extracto Etanólico de Propóleo Peruano Sobre *S. mutans* y *L. corei*., Lima – Peru., Odontología Sanmarkina., Volumen 10., No 2 2007., Pp: 18-20.
  
22. **FARRE, R.**, El propóleo y la Salud., Valencia – España., Ars Farmaceutica., volumen 45., No 1., 2004., Pp: 21-43.
  
23. **LANZENDORFER, G.**, Uso de Flavonoides Como Agentes Inmunorreguladores o inmunoprotectores en Preparaciones Cosmética y Dermatológicas., **Volumen 2.**, No 177., 2002., Pp: 1-8
  
24. **LOFTHY, M.**, Biological Activity of Bee Propolis in Healt and Diseaces., Minufaya – Egypt .AsianPac. J. Cancer Prew., .2006., Pp: 22-31.
  
25. **MARTINEZ, A.**, Flavonoides. Medellin – Colombia., Universidad de Antioquia., 2005., pp: 45-47.
  
26. **MUÑOZ, L.**, .Plantas Medicinales Españolas. *Calendula officinalis* *L. (asteraceae)*. Salamanca – España., Medicina Naturista., Volumen 5. 2011., pp: 257-261.
  
27. **OCHOA, C.**, Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. Cali - Colombia. Ing. y Comp., Volumen 6., No 2., 2004., Pp: 4-5.
  
28. **ORTEGA, N.**, Actividad Antibacteriana y Comparación Cualitativa de Propóleos Provenientes de dos Zonas Climaticas del Departamento del Cauca. Popayan – Colombia., Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial., Volumen 9., No 1. 2011., Pp: 8-16.
  
29. **PEÑA, C.**, Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Santiago - Chile., Cien. Inv. Agr., Volumen 35., No 1., 2008., Pp:17-26
  
30. **PEÑALOZA, J.** .El Acné. México - México. Rev. Fac. Med. UNAM., Volumen 46., No 4. 2003., Pp: 138-142.

31. **PÉREZ, T.**, Comportamiento Reológico y Extensibilidad de una Formulación Semisólida a Partir del Extracto Acuoso de *Rhizophora mangle L.* La Habana – Cuba .Tecnol. Ciencia Ed. 26. No 2., 2012., Pp 75-79.
32. **PERRY, A.**, *Propionibacterium acnes.*, Birmingham – United King. Lett. Appl. Microbiolo., Volumen 42., No 3., 2006., Pp 185-188.
33. **TOLOSA, L.**, Obtención Caracterización y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de extractos de Propóleo de Campeche. México - México., *ArsPharmaceutics.* Volumen 43., No 1-2., 2002., Pp: 187-204
34. **THAMAN; L.**, Formulation Of Skin Care Products., New York United States., Tayler and Francis., 2006., pp: 403-407.
35. **CANDO , M.**, Comparación del Efecto Cicatrizante de Geles Elaborados a Base de Propóleo y Caléndula en Heridas de Conejos., Facultad de Ciencias., Escuela de Fitoquímica y Farmacia., Tesis., Riobamba – Ecuador., 2007., Pp: 34-39.
36. **ORDOÑEZ, F.**, Métodos de Purificación del Propóleo Para una Posterior Salud Animal., Facultad de Ciencias Pecuarias., Escuela de Ingeniería Zootecnista., *Riobamba –Ecuador.*, 2005.,pp: 36.46-47.
37. **ANÁLISIS DE FLAVONOIDES.**,  
[www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry)  
2012-10-25
38. **CALÉNDULA**  
<http://www.herbsociety.org>  
2012-10-26
39. **FLAVONOIDES Y COSMÉTICA NATURAL.**  
<http://www.naturalsensia.es/2011/09/flavonoides-y-cosmetica-natural/>  
2013-11-05

**40. GLÁNDULAS SEBÁCEAS**

<http://www.elmedicointeractivo.com/ap1/emiold/publicaciones>  
2013-11-05

**41. MANUAL DE CULTIVO Y MANEJO DE LA CALÉNDULA.**

<http://www.plantasmedicinales.org/archivos/manualdecultivopdf>  
2013-11-04

**42. PERSONAL CARE.**

<http://www.personalcaremagazine.com/Print.aspx?Story=5240>  
2013-10-31

**43. REGISTROS SANITARIOS PANAMÁ.**

<http://registrossanitariospanama.blogspot.com/2012/06/cosmeticosparametros-utilizados-para.html>  
2013-10-26



## CAPÍTULO VIII

### 7. ANEXOS

#### ANEXO A OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ESTANDARIZADOS DE FLORES DE CALÉNDULA Y PROPÓLEO MEDIANTE ROTAVAPOR.



#### ANEXO B. TABLA DE ENSAYOS COLORIMÉTRICOS PARA EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

METABOLITO SECUNDARIO	ENSAYOS COLORIMÉTRICOS	RESULTADOS
ALCALOIDES	DRAGENDORFF MAYER WAGNER	PRECIPITADO: Rojo a naranja Blanco a crema. Marrón
FLAVONOIDES	Mg <sup>2+</sup> /HCl	COLORACION: Rojo
TANINOS:	FeCl <sub>3</sub> al 10%	COLORACION: Azul Verde
HIDROLIZADOS		Presencia de espuma
CONJUGADOS		COLORACION: Roja naranja
SAPONINAS	BALJET	Coloración intensa
CARDIOTÓNICOS	KELLER-KILIANI LIEBERMAN-BURCHARD	Coloración verde, azul verdoso
CUMARINAS VOLATILES	NaOH	Fluorescencia en UV

**ANEXO N° C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA MICROBICIDA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.**



**ANEXO D. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL EFECTO MICROBICIDA DE LOS EXTRACTOS PREVIO LA FORMULACIÓN DEL GEL COSMÉCEUTICO ANTIACNÉ.**

ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	533,5555556	1	533,5555556	8,89671144	0,0087903
Dentro de los grupos	959,5555556	16	59,97222222		
Total	1493,111111	17			

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
UFC EN E1C3	9	12	1,333333333	4	
UFC EN E2C3	9	110	12,22222222	115,9444444	

**ANEXO E. DISTINTOS GELES FORMULADOS.**



**ANEXO N° F. CONTROL DE CALIDAD DEL GEL FORMULADO.**



**Medición de pH**



**Densidad específica.**