

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



**EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD ACCELERADA DE UNA LOCIÓN, CON
CAPACIDAD ANTIFÚNGICA, ANTIBACTERIANA Y ANTILEVADURA PREPARADA
A PARTIR DE EXTRACTO SECO DE RIZOMA DE *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla),
EN SOLUCIÓN ETANÓLICA AL 70%.**

Informe de Tesis

Presentado por

Andrea del Carmen Melgarejo Salazar

**Para optar el título de
Química Farmacéutica**

Guatemala, Noviembre de 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Jose Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska de León	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad

Por la formación que me brindó a lo largo de toda mi carrera.

Al Decano

Por la colaboración en los trámites para culminar mi carrera.

Al Laboratorio

Farmaya y Lipronat, por el apoyo brindado en la elaboración del trabajo de tesis y por sus sabios consejos.

A mi Asesora

Licda. Lucrecia Martínez de Haase, por el apoyo brindado en la elaboración de tesis.

A mi Co-asesor

Lic. Armando Cáceres, por su asesoría y apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A mi Revisor

Lic. Julio Chinchilla, por su colaboración y ayuda.

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por ser la fuente de inspiración y sabiduría para poder llegar a ser lo que soy y cumplir con uno de los objetivos que tiene para mí en la vida. Para ti la gloria y honra.

A MI MADRE

Marina Salazar de Melgarejo, con profunda gratitud sea este un regalo y tributo a tu amor, sacrificio, trabajo, desvelos y esperanza de que llegara a ser alguien profesional en la vida y así como siempre estar pendiente de que nunca me faltara nada. Gracias por creer en mí.

A MI PADRE

Mario Melgarejo, que se que desde el cielo celebras con orgullo cada una de mis metas, eres un ángel que llevo en el recorrido de mi vida.

A MIS HERMANAS

Jaquelin Melgarejo, Alejandra Melgarejo por el cariño brindado, apoyo incondicional y su voto de confianza en mi persona de poder lograr un objetivo más en la vida.

A MI ABUELITA:

Cristina Vásquez, por todas las bendiciones que a través de sus oraciones recibo de Dios.

A MI NOVIO:

Manuel Godínez Anleu por el amor, la confianza y el apoyo incondicional brindado para poder llegar a ser alguien profesional.

A LAS FAMILIAS

Salazar Poitevin, Salazar Ordoñez, Godínez Anleu, Melgarejo, por la preocupación a la culminación de mi carrera y su incondicional apoyo cuando fue requerido.

A MIS AMIGAS

Wendy Flores, Ma. Alejandra García, Ana Silvia Herrera, Paola Padilla, María Isabel Salazar, Karen Monzón, Delia Dávila, que más que amigas son como hermanas, por esos inolvidables momentos compartidos así como el apoyo incondicional recibido.

A MIS AMIGO

Un agradecimiento especial y mis más sinceros recuerdos, para todos aquellos momentos que compartimos a lo largo de la carrera, siempre los llevaré en mi corazón.

ÍNDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	4
IV. Justificación	9
V. Objetivos	10
VI. Hipótesis	11
VII. Materiales y Métodos	12
A. Universo	12
B. Muestra	12
C. Material y Equipo	12
D. Métodos	14
VIII. Resultados	22
IX. Discusión de Resultados	26
X. Conclusiones	29
XI. Recomendaciones	31
XII. Bibliografía	32
XIII. Anexos	35
A. Información de componentes, clasificación, acción farmacológica y terapéutica	35
B. Especificaciones del Producto	35
C. Condiciones para realizar los estudios acelerados de estabilidad	36
D. Conteo aeróbico en placa, mohos y levaduras	37
E. Interpretación de resultados	39

F. Resultados de pruebas cuantitativas	42
G. Resultados prueba actividad antifúngica	48
H. Resultados prueba actividad antibacteriana y antilevadura	49

I. RESUMEN

Estabilidad es la capacidad que posee un producto para mantener sus condiciones y características dentro de los límites específicos a través de un periodo de almacenamiento y uso. Este deberá mantener las mismas características que tenía en el momento de su manufactura (The United States Pharmacopeia Convention. 2007)

La utilización de productos fitoterapéuticos se ha incrementado por el interés del regreso a lo natural que existe de forma general en la sociedad. Sin embargo va mas allá de una simple moda, representa un incremento del interés en los tratamientos naturales para los problemas de salud, con mayor seguridad y eficacia, tratándose en este momento más bien de una tendencia global.

La evaluación de los medicamentos a base de plantas medicinales debe seguir las normas que rigen la evaluación de los medicamentos de síntesis química (The United States Pharmacopeia Convention. 2007), debido a que no existen metodologías farmacopéicas de análisis para dichos productos. El presente informe, plantea una metodología para evaluar la capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura de una loción preparada a partir de extracto seco de rizoma de *Smilax domingensi*. en solución etanólica al 70%, variando las condiciones normales de almacenamiento. Se tomó en cuenta para la evaluación parámetros fisicoquímicos (características organolépticas, características fisicoquímicas, microbiológicas, conteo aeróbico en placa, recuento de enterobacterias).

La prueba de estabilidad que se realizó a los lotes de loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura fue acelerada, utilizando condiciones de estudio de estabilidad (temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un tiempo total de 180 días).

Luego de la evaluación se obtuvieron resultados demostrando que a los 180 días de almacenamiento a condiciones extremas de temperatura, las características fisicoquímicas y microbiológicas de la loción se mantienen dentro de los rangos aceptados, con excepción del grado alcohólico. Los metabolitos activos se mantienen después del tiempo de prueba y en los tres lotes analizados la capacidad antifúngica contra *Microsporium gypseum*, capacidad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Escherichia coli*, y la capacidad antilevaduras contra *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* es positiva.

II. INTRODUCCIÓN

La estabilidad de un producto se define como la extensión de la vida en anaquel, en la que este mantiene sus propiedades químicas y físicas durante un período de almacenamiento. Este estudio estableció y evaluó la estabilidad para prevenir una inestabilidad química, física y terapéutica (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

La calidad es un requisito básico de los medicamentos, porque constituye la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia. Los parámetros que resultan ser mucho más complejos en los preparados a partir de plantas medicinales, que en fármacos preparados con moléculas de síntesis. Generalmente un fitofármaco es un sistema complejo de compuestos y no un compuesto puro (Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII), por lo cual la caracterización y demostración de la estabilidad de los componentes se hace mucho más difícil, debido a que la estabilidad se esta haciendo por la forma farmacéutica.

Sin embargo, la evaluación de los medicamentos a base de plantas debe seguir las normas que rigen la evaluación de los medicamentos de síntesis química (The United States Pharmacopeia Convention. 2007), las regulaciones existentes, generalmente son designadas para principios activos formados por una sola molécula, no siempre se adaptan a fitocomplejos como es el caso de las drogas vegetales y extractos, de los cuales no se conocen con precisión los componentes responsables de su actividad.

El presente trabajo, planteó una metodología para la evaluación de la estabilidad acelerada de una loción obtenida de una planta medicinal, la cual posee actividad antifúngica, antibacteriana y antilevadura (Anexo A), tomando en cuenta parámetros que pueden influenciar la calidad, eficacia y seguridad del fitofármaco. Estos son parámetros microbiológicos (bacterias mesófilas, mohos, levaduras y recuento de enterobacterias), y fisicoquímicos (características organolépticas y fisicoquímicas como color, olor, sedimentación, pH, densidad relativa, grado alcohólico y sólidos totales). Los parámetros antes mencionados se evaluaron en condiciones de estudio de estabilidad $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se realizaron tres mediciones a tiempo cero, noventa y ciento ochenta días respectivamente (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

III. ANTECEDENTES

Después de una revisión bibliográfica acerca de productos fitoterapéuticos, no se encontró referencia alguna sobre estudios de estabilidad para productos fitofarmacéuticos de tipo loción en los listados de tesis o libros en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, la biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala, o alguna referencia en páginas de Internet en español, únicamente se citan las características que debe tener un producto dependiendo la forma farmacéutica, para cumplir con las especificaciones de calidad y las condiciones que debe mantener a través de su tiempo de vida útil. La única referencia que se encontró es un trabajo de tesis del año 2008 titulado: Evaluación de la estabilidad acelerada de una tintura preparada a partir de *Gnaphalium stramineum* HBK (flores), *Plantago major* L (hoja), *Psidium guajava* L (hoja) y *Tagetes lucida* Cav. (hoja y flor), en solución alcohólica al 35% a la cual se le confieren propiedades antibacterianas. La cual fue realizada por Licda. Wendy Carolina Flores Barrios.

A. INFORMACIÓN DE LOS COMPONENTES, CLASIFICACIÓN, ACCIÓN FARMACOLÓGICA Y TERAPÉUTICA

1. Nombre científico: *Smilax domingensis* Willd.
Familia: Smilacaceae
2. Nombres comunes
Zarzaparrilla (Guatemala), Raíz china, Zarza, Corona de Cristo (Honduras),
Bejuco de canasta (Costa Rica) (Arteche. 2003).
3. Descripción botánica
Glabras completamente. Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con aguijones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas de 6-15 cm de largo y 1.5-10 cm de ancho, 1.4-6 veces más largas que anchas, ovaladas, lanceoladas-ovadas, o lanceoladas cartáceas, inermes, 5 nervios desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras

secundarias conspicuas, algo preminentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado breviscuspidado, la base aguda, margen entero; peciolo de 0.5-2 cm. Umbelas estaminadas solitarias; pedúnculo 1-5 mm, terete o algo aplanado. Umbelas pistiladas solitarias; pedúnculo 1-5 mm, más corto que el peciolo subyacente, subterete. Pétalos de las flores estaminados de 4-6 mm; filamentos de 2-4 mm, anteras de 1-2 mm. Pétalos de las flores pistiladas. Bayas de 7-10 mm, rojas purpúreas o negras. (Martínez. 2002).

4. Hábitat y distribución geográfica

Crece en bosques o matorrales húmedos, desde cerca del nivel del mar hasta los 1,200 msnm; se ha descrito en México; Honduras; El Salvador; Costa Rica; Panamá y en Guatemala en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Escuintla, Sacatepéquez, Zacapa, Suchitequez, Santa Rosa (Mizzau. 2003).

5. Obtención

El rizoma se colecta al final de las lluvias, se recorta y se seca al sol. (Girón. 2000.)

6. Usos medicinales

El rizoma se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (diarrea, dolor de estómago, inapetencia), hinchazón, malaria (Martínez. 1995), dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores (Sánchez. 2003). Se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antiprúritas, antireumáticas, antisépticas, cicatrizantes, desinflamantes, estimulantes, diuréticas, diaforéticas, depurativas, sudoríferas y tónicas (De la Cruz. 2005).

La decocción se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eccemas, liquen plano, tinea, psoriasis) (Sánchez. 2003).

7. Otros usos: las raíces y rizomas de algunas especies del género se utilizan como colorantes de refrescos (Huft y otros. 1995.Vol. 6 p543).

8. Composición química

El tamizaje fitoquímico indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glucósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos) flavonoides, leucoantocininas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas (Robles, G. 1998). Se han aislado agliconas esteroidales (parrillina, sarsasapogenina, smilagenina), beta-sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico (Solis P., De Solis, N., Gattuso, Cáceres. 2003)

9. De la droga vegetal

- a. Denominación: *Smilax domingensis rhizomae*.
- b. Definición: Rizomas secos y molidos de color marrón claro.
- c. Obtención: El rizoma se colecta después de las últimas lluvias, se corta y se seca al sol, luego es molido (Standley, PC. 1952).
- d. Propiedades organolépticas: fragmentos semifinos de color marrón claro.
- e. Descripción macroscópica: el rizoma es algo lignificado, voluminoso con engrosamientos tuberosos, de color castaño-rojizo (Temaj. 1995).
- f. Posibles adulterantes o sustituyentes: fragmentos de raíz, rizomas o raíces de otras especies de *Smilax*.
- g. Componentes con actividad terapéutica y marcadores: La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas; la parrillina es antimicótico y antitumoral. La sarsapogenina tiene actividad antiinflamatoria (Williams. 1981)

B. Loción

Forma farmacéutica que se puede presentar como solución, suspensión o emulsión que contiene principios activos y aditivos y cuyo agente dispersante es predominantemente acuoso. Preparado líquido para aplicación externa sin fricción.

C. Estabilidad

Capacidad que posee un producto para mantener sus condiciones y características dentro de los límites específicos a través de un periodo de almacenamiento y uso. Este deberá mantener las mismas características que tenía en el momento de su manufactura (Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII).

Existen diferentes tipos de estabilidad reconocidos, la estabilidad química en la cual todo ingrediente activo debe retener la integridad química, de acuerdo a los límites especificados. La estabilidad física en la que el producto deberá conservar sus propiedades físicas tales como apariencia, palatabilidad, uniformidad y disolución. La estabilidad microbiológica, en la que el producto debe demostrar esterilidad o resistencia al crecimiento microbiano de acuerdo a las especificaciones. En caso de tener agentes antimicrobianos, debe retener la efectividad dentro de los límites. La estabilidad terapéutica, en la que el efecto terapéutico y la potencia reportada del producto no deben cambiar (The United States Pharmacopeia Convention. 2007)

Existen varios factores que pueden afectar la estabilidad del producto y cada componente de un medicamento puede ser responsable potencial de un cambio en la potencia del producto. Dentro de estos factores se encuentran, factores ambientales tales como temperatura, radiación, luz, aire (presencia de oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua), humedad, tamaño de partícula, pH, propiedades de los disolventes o del agua, naturaleza de los contenedores y contaminantes (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

Dentro de las pruebas de estabilidad se encuentran los estudios acelerados de estabilidad, estos están ideados para aumentar la tasa de degradación química y de alteración física del medicamento sometiéndolo a condiciones de almacenamiento extremas como parte del programa estructurado de pruebas de estabilidad. Los resultados obtenidos de esta prueba no siempre permiten predecir alteraciones físicas, sino son estudios de tipo presuntivo, por lo que muchas veces se necesita de un estudio a tiempo real (a largo plazo) paralelo que afirme y asegure con resultados las

características organolépticas, el pH, los límites microbianos, pérdida de peso (envase plástico), prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos, esterilidad y materia particulada. Todos los estudios deben llevarse a cabo en muestras en contacto con la tapa para determinar si existe alguna interacción que afecte la estabilidad del producto y es necesario que se utilicen tres lotes de producción con la formulación y el material de empaque o envase primario (Ver anexo B) (Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII)

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, no existen procedimientos o monografías individuales para la determinación de las características organolépticas, fisicoquímicas, microbiológicas y potencia de la actividad de productos de origen botánico. Por lo que plantear el alcance y la metodología de un estudio de estabilidad resulta ser importante.

Es frecuente que el formulador de un producto determine en primer lugar los efectos que tienen sobre él, o sobre los ingredientes activos; factores tales como la temperatura, la luz, el aire, el pH, la humedad, los rastros de metales y los excipientes o disolventes utilizados en la formulación. Tomando esto en cuenta se debe valorar la potencia empleando un método indicador de estabilidad, se inspecciona el producto en busca de cambios físicos y si corresponde, se somete a pruebas de carga microbiana y/o resistencia al crecimiento microbiano y otras pruebas para evaluar la toxicidad y la biodisponibilidad (Sólis. 2003).

Las reglamentaciones existentes, generalmente designadas pensando en principios activos constituidos por una sola molécula, no siempre se adaptan a los fitocomplejos como es el caso de las drogas vegetales y extractos, de los cuales además no se conocen con certeza los componentes responsables de su actividad por la gran cantidad de metabolitos activos que estos presentan. Es por esto que es importante establecer métodos para evaluar la estabilidad, en este caso de una loción preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis*, planta a la cual se le ha reconocido que posee actividad antifúngica (Anexo A).

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar mediante pruebas de estabilidad acelerada una loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura fabricada en Guatemala, preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis*.

B. Específicos:

1. Determinar la estabilidad organoléptica, fisicoquímica y microbiológica de una loción vegetal con propiedad antifúngica, preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis* en solución etanólica al 70%.
2. Determinar el efecto de inhibición fúngica, bacteriana y levadura de la loción preparada a partir de extracto seco de Rizoma de *S. domingensis*. en solución etanólica al 70%.
3. Establecer criterios para los estudios de estabilidad de la loción preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis* y las condiciones de almacenamiento.

VI. HIPÓTESIS

Las características fisicoquímicas, organolépticas, microbiológicas y capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura de una loción preparada a partir de extracto seco de rizoma *S. domingensis* en solución etanólica al 70%, se mantienen al variar las condiciones normales de almacenamiento.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo:

Loción de *S. domingensis* hecha en Guatemala.

B. Muestra:

Muestras de tres lotes de loción de *S. domingensis* con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura elaborada con Buenas Prácticas de Manufactura bajo la supervisión de la autora de la investigación.

C. Materiales y Equipo

1. Materia vegetal desecada de:

- a. rizoma *S. domingensis*.

2. Cristalería de laboratorio

- a. Vasos de precipitar
- b. Tubos de ensayo
- c. Tubos para análisis
- d. Puntas amarillas 1 ml
- e. Puntas azules de 0.5 ml
- f. Cajas de Petri
- g. Varillas de agitación
- h. Vidrios de reloj
- i. Pipetas serológicas 1, 5 y 10 ml
- j. Crisoles
- k. Cápsulas de porcelana
- l. Campanillas de Durham
- m. Cristalizador

3. Equipo de Laboratorio

- a. Autoclave
- b. Pipeteadores
- c. Mechero Bunsen
- d. Campana Microbiológica
- e. Percolador de acero inoxidable
- f. Incubadora a 25°C
- g. Incubadora a 35°C
- h. Incubadora para estabilidad

- i. Mufla
- j. Potenciómetro
- k. Cámara de Neubauer
- l. Balanza analítica
- m. Picnómetro
- n. Baño de María
- o. Rotavapor

4. Material para análisis microbiológico

- a. Caldo lactosado
- b. Caldo bilis verde brillante
- c. Caldo *E. coli*
- d. Agar Sabouraud
- e. Agar plate count
- f. Agar Muller Hinton
- g. Agar - Agar
- h. Medio de Takashio

5. Reactivos

- a. Dextrosa
- b. Etanol 50%
- c. Etanol 70%
- d. Etanol 95%
- e. Fosfato diácido de potasio
(KH_2PO_4)
- f. Peptona
- g. Solución salina estéril
- h. Sulfato de sodio (Na_2SO_4).
- i. Estándar de saponina
- j. Agua destilada

6. Estándares (microbiológicos)

- a. *Microsporium gypseum*
- b. *Candida kruseii*
- c. *Candida glabrata*
- d. *Candida parapsilosis*
- e. *Staphylococcus aureus*
- f. *Pseudomonas auriginosa*
- g. *Escherichia coli*

7. Material de oficina

- a. Computadora personal
- b. Impresora
- c. Bolígrafos
- d. Tinta para impresora
- e. Calculadora
- f. Hojas de papel Bond 80 g

D. Métodos

1. Diseño experimental:

Por ser un producto cuya actividad depende de fitocomplejos, no fue posible realizar los cálculos de estabilidad establecidos para moléculas sintéticas, por lo que la estabilidad se evaluó a través de los siguientes parámetros

a. Fisicoquímicos:

- i. Características organolépticas: color, olor, examen físico y variación de peso.
- ii. Características fisicoquímicas: pH, densidad relativa, grado alcohólico y sólidos totales.

b. Microbiológicos:

- i. Conteo aeróbico en placa: bacterias mesófilas, mohos y levaduras.
- ii. Recuento de enterobacterias: coliformes totales, coliformes fecales y determinación de *E. coli*.

c. Determinación de la actividad antifúngica, antibacteriana y antilevadura

Para obtener un 95% de confiabilidad se evaluaron los resultados de los parámetros anteriormente mencionados, en tres diferentes lotes de loción a tiempo cero, noventa y ciento ochenta días (Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII) (Anexo C). El análisis estadístico se realizó de manera descriptiva aplicando medidas de tendencia central en cada tiempo de medición.

2. Metodología para la evaluación de la estabilidad de la loción

Se procedió de la siguiente manera:

a. Producto terminado:

La metodología para la determinación de estabilidad acelerada de tres lotes de producción de tres lotes de loción con actividad antifúngica, se llevó a cabo

a tiempo 0, 90 y 180 días; a una temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII) (Anexo C).

b. Determinación características organolépticas

i. Color: Se tomó una muestra de 10 ml en un tubo de ensayo y se verificó el color de la tintura y se comparó con el catalogo de colores Pantone ®, durante cada uno de los tiempos de muestreo.

ii. Olor: Se tomó una tira de papel filtro de 10 cm de largo por 1 cm de ancho y se introdujo uno de los extremos en una muestra de 5 ml de loción. Se escogió un panel de tres personas entrenadas para oler y describir las muestras. (Anexo B)

iii. Examen físico: Turbidez, sedimentación y separación de fases.

Se tomó una muestra de 10 ml de loción en un tubo de ensayo 13 x 100 mm, la muestra debió presentarse traslucida, no debió presentar residuos sólidos y debía estar homogénea, en una sola fase sin residuos sólidos.

iv. Variación de peso: Se pesó cada una de las muestras en su empaque o empaque primario, en una balanza analítica (Medinilla.1999)

c. Características fisicoquímicas

i. pH: Se tomó una muestra de 10 ml de la loción a volumen en un tubo de ensayo y se midió por potenciometría.

- Procedimiento: Se sumergió el electrodo y el termómetro dentro de la muestra, para obtener el valor de pH. Si se van a realizar diferentes mediciones sucesivamente, es recomendable lavar el electrodo con agua desionizada (Medinilla. 1999).

ii. Densidad relativa: Se utilizó un picnómetro previamente lavado y seco. Una vez obtenidos los pesos necesarios, se determinó la densidad relativa con la siguiente formula:

$$\text{Densidad relativa} = \frac{(\text{Peso del picnómetro con muestra}) - (\text{Peso de picnómetro vacío})}{(\text{Peso de picnómetro con agua}) - (\text{Peso de picnómetro vacío})}$$

- iii. Grado alcohólico: Se tomó una muestra de 250 ml de loción en una probeta a volumen y se introdujo un alcoholímetro.
- iv. Sólidos totales: Se tomaron tres cápsulas de porcelana y se secaron en horno a 100°C por una hora. Las cápsulas se retiraron del horno y se colocaron en una desecadora hasta que alcanzaron temperatura ambiente (25°C). Se pesó cada una de las cápsulas en balanza analítica. En una probeta de 25 ml de capacidad, se midió una muestra de 25 ml de loción la cual se agregó en cada una de las tres cápsulas. Se llevó a ebullición en baño de maría hasta sequedad para obtener sólidos totales. Luego se retiraron las capsulas y se secaron en horno a 100°C durante 6 h. Las cápsulas se colocaron en una desecadora hasta que alcanzaron temperatura ambiente. Se pesaron las cápsulas con los sólidos totales y se determinó la cantidad obtenida con la siguiente formula:

$$\text{Sólidos totales} = \frac{(\text{Peso de cápsula con muestra}) - (\text{Peso de cápsula vacía})}{\text{ml de tintura}}$$

Con los tres datos obtenidos se realizó un promedio el cual es el contenido de sólidos totales de la muestra.

d. Determinación de características microbiológicas

i. Conteo aeróbico en placa:

- Bacterias mesófilas:

Preparación de la muestra: Se midió 1 ml de muestra y se adicionaron 9 ml de solución salina al 0.85% p/v, en un tubo de ensayo. Se agitó la mezcla hasta obtener una mezcla homogénea.

Preparación de diluciones: A partir de la solución homogénea se prepararon tres diluciones. Dilución 1:100: se tomó 1 ml de la solución y se agregaron 9 ml de solución salina al 0.85% p/v. Dilución 1:1,000: De la dilución 1:100 se midió 1 ml de solución y agregaron 9 ml de

solución salina al 0.85% p/v. Dilución 1:10,000: De la dilución 1:1,000, se midió 1 ml de solución y agregaron 9 ml de solución salina al 0.85% p/v.

Se colocó 0.1 ml de cada una de las diluciones en cajas de petri previamente preparadas e incubadas con agar Plate count. Se incubó a 35 – 37°C durante 5 días. (The United States Pharmacopeia Convention. 2007) Los resultados se interpretaron según Anexo D.

- Mohos y levaduras

Se colocó 0.1 ml de cada una de las diluciones en cajas de Petri previamente preparadas e incubadas con agar Sabouraud. Se incubó a 35 – 37°C durante 5 días (The United States Pharmacopeia Convention. 2007). Se interpretaron los resultados según Anexo D.

ii. Recuento de enterobacterias

- Coliformes totales

Se preparó caldo lactosado según instrucciones del envase. En tubos de ensayo de 20 ml con tapón rosca, se agregaron 9 ml de caldo lactosado y se introdujo una campana de Durham, se prepararon nueve tubos por muestra. Se esterilizaron los tubos en autoclave por 15 min a 121°C. Se dejaron enfriar. Se midió 1 ml de muestra y se agregaron 9 ml de solución salina al 0.85% p/v. Se colocaron 3 ml de cada una de las diluciones preparadas con anterioridad en tres tubos con agar, 1 ml de muestra a cada uno, iniciando con la dilución 1:100 hasta llegar a la dilución 1:10,000 para obtener nueve tubos (The United States Pharmacopeia Convention. 2007). Se interpretaron los resultados según el Anexo E.

- Coliformes fecales

Se preparó caldo bilis verde brillante (BVB) según las instrucciones del envase. Se agregaron 9 ml de caldo BVB en un tubo de 20 ml con tapón rosca, y se introdujo una campana de Durham. La cantidad de

tubos que se preparó es igual al número de tubos con resultado positivo en la prueba de coliformes totales. Se esterilizaron los tubos en autoclave, por 15 min a 121°C y se dejaron enfriar. En una campana limpia y sanitizada con anterioridad, se inocularon los tubos de BVB tomando una asada cada tubo de caldo lactosado que presentaron resultado positivo. Se incubó de 24 a 48 h en una incubadora a $42 \pm 2^\circ\text{C}$. Se verificó el crecimiento bacteriano con producción de gas (burbuja de aire en la campana de Durham), formación de turbidez o precipitado. Los resultados se interpretaron según la tabla de Número Más Probable (NMP), (Anexo E). A los tubos con resultado positivo se les realizó análisis para *E. coli*. (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

- Determinación de *E. coli*

Se preparó caldo EC según las instrucciones del envase. Se agregaron 10 ml de caldo EC en un tubo de 20 ml con tapón rosca y se introdujo una campana de Durham. La cantidad de tubos que se prepararon fué igual al número de tubos con resultado positivo en la prueba de coliformes fecales. Se esterilizaron los tubos en autoclave, por 15 min a 121°C. Se dejaron enfriar los tubos. En una campana limpia y sanitizada con anterioridad se inocularon los tubos de EC tomando una asada de cada tubo de caldo BVB que presentaron resultado positivo. Se incubaron de 24 a 48 h en una incubadora a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. El crecimiento bacteriano se verifica con producción de gas, formación de turbidez o precipitado.

Si existió resultado positivo en los tubos, se inocula una muestra de cada uno, en placas de agar Mac Conkey. Estas cajas deben incubarse a $43 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h El crecimiento de colonias rojas, umbilicadas, generalmente no mucosas, indican la posible presencia de *E. coli*. (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

e. Determinación de la actividad antifúngica:

i. Preparación del medio de cultivo (agar-planta)

- Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Saboraud y se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, se dejaron enfriar a 50°C y luego se agrego 1.5 mL de la loción a ensayar (concentración de 10 mg/mL), y se obtuvo una concentración final de 1 mg/mL.
- El medio de cultivo se sirvió en cajas de petri estériles, se dejó solidificar y se incubaron a 37°C durante 24 h para comprobar esterilidad.

ii. Preparación del inóculo

- Se sirvió 6 mL de medio Takashio preparado en tubos con tapón de rosca y se esterizaron en autoclave durante 15 min a 121°C y se dejó solidificar con un ángulo de inclinación adecuado para la siembra.
- Se sembró el hongo con un asa de nicromo en L en los tubos que anteriormente se prepararon y se incubaron a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo de la colonia.
- Se agregó a cada tubo de Takashio 2 mL de solución salina estéril para desprender el hongo con el asa de nicromo.
- El material que se obtuvo se trasvasó a tubos con tapón de rosca estériles, y luego se agitó durante 2 min en vortex y se hizo un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- La suspensión de esporas que se preparo en solución salina es de 100 esporas/ μ l (10 esporas por cuadrante).

iii. Inoculación del hongo

- Se abrieron agujeros en las cajas con agar-planta con campanillas de Durham estériles de 5 mm de diámetro.
- De la suspensión de esporas se tomaron 30 μ l y depositaron en los agujeros, las cajas se incubaron 27°C por 14 días.
- Como control negativo se utilizó una caja con agar Saboraud y etanol al 50%, donde el hongo creció en un 100%; y como control positivo una caja con solución de Ketoconazol en agar Saboraud.

iv. Interpretación de resultados

Los diámetros de las colonias del hongo se midieron en milímetros y la actividad se determinó de la siguiente manera:

- Actividad positiva: reducen el diámetro de la colonia en un 75%.
- Actividad negativa: la colonia crece más del 25% (crecimiento de 100%). (Cáceres. 1993).

f. Determinación de la actividad antibacteriana:

Se agregó 1 ml de loción a 9 ml de agar Muller Hinton fundido a 40°C AMH– T. Se agitó y se vertió en una caja de Petri estéril y se dejó solidificar. Se incubó a 35°C durante 24 h. Luego se inocularon bacterias estándar en caldo tripticasa y se incubaron a 35°C durante 24 h. Se diluyó 1:10 en agua destilada estéril y luego se inocularon en triplicado por estrías en la caja AMH–T. Se incubaron a 35°C durante 24 h y se leyeron los resultados. Las bacterias utilizadas como control fueron *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Las cuales debían estar inhibidas a la concentración de prueba.

g. Determinación de la actividad antilevadura:

- Se agregó 1 ml de loción a 9 ml de agar Muller Hinton. Se agitó y se vertió en una caja de Petri estéril y se dejó solidificar.
- Se incubó a 35°C durante 24 h se inocularon bacterias estándar en caldo tripticasa y se incubaron a 35°C durante 24 h. Se diluyó 1:10 en agua destilada estéril y se inocularon por triplicado, por estrías según la plantilla. Luego se incubaron a 35°C durante 24 h y se leyó. Las levaduras control utilizadas fueron *Candida krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* las cuales deberían estar inhibidas a la concentración de prueba.

VIII. RESULTADOS

Para los tres lotes de loción evaluadas, se realizó la medición de las pruebas cuantitativas por triplicado y un control. En las tablas de resultados se reportan los promedios de dichas mediciones a tiempo 0, 90 y 180 días. La Tabla No. 1 muestra los resultados que fueron realizados cada una de las mediciones de los parámetros propuestos en la metodología. Los datos de los resultados de las mediciones se describen en el anexo F,G y H.

Tabla No. 1
RESULTADOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

La Tabla No.1 muestra los resultados obtenidos de la medición de los parámetros de calidad establecidos para la loción que posee actividad antifúngica, antibacteriana y antilevadura, evaluados a los tiempos 0, 90, 180 días, para el lote A, B, C .

Tiempo 0 días

PARÁMETRO		ESPECIFICACIÓN		RESLUTADO TIEMPO 0 DÍAS		
Características Organolépticas			Control	Lote A	Lote B	Lote C
Color	Catálogo Pantone	Pantone 497C		Cumple	Cumple	Cumple
Olor		Característico alcohólico.		Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				Cumple	Cumple	Cumple
Turbidez		No presenta turbidez		Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación		No presenta sedimentación		Cumple	Cumple	Cumple
Características Físicoquímicas				Cumple	Cumple	Cumple
pH		5.54 – 6.04		Cumple	Cumple	Cumple
Densidad relativa		0.925 – 0.975		Cumple	Cumple	Cumple
Grado alcohólico		70 - 65%		No Cumple	No Cumple	No Cumple
Sólidos totales		0.01635 – 0.01808 g/ml		Cumple	Cumple	Cumple
Características microbiológicas						
Conteo aeróbico en placa						
Bacterias mesófilas		< 1000 UFC	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Mohos y levaduras		< 1000 UFC	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Recuento de Enterobacterias						
Coliformes totales		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Coliformes feclaes		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Determinación de E. coli.		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad antifúngica <i>M. gypsum</i>		Crecimiento menor del 25%	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad Antibacteriana						
<i>S. aureus</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>P. aeruginosa</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>E. coli</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad Antilevadura						
<i>C. kruseii</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>C. glabrata</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>C. parapsilosis</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

Tiempo 90 días

PARÁMETRO		ESPECIFICACIÓN		RESULTADO TIEMPO 90 DÍAS		
Características Organolépticas			Control	Lote A	Lote B	Lote C
Color	Catálogo Pantone	Pantone 497C		Cumple	Cumple	Cumple
Olor		Característico alcohólico.		Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				Cumple	Cumple	Cumple
Turbidez		No presenta turbidez		Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación		No presenta sedimentación		Cumple	Cumple	Cumple
Características Físicoquímicas				Cumple	Cumple	Cumple
pH		5.54 – 6.04		Cumple	Cumple	Cumple
Densidad relativa		0.925 – 0.975		Cumple	Cumple	Cumple
Grado alcohólico		70 - 65%		No Cumple	No Cumple	No Cumple
Sólidos totales		0.01635 – 0.01808 g/ml		Cumple	Cumple	Cumple
Características microbiológicas						
Conteo aeróbico en placa						
Bacterias mesófilas		< 1000 UFC	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Mohos y levaduras		< 1000 UFC	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Recuento de Enterobacterias						
Coliformes totales		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Coliformes feclaes		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Determinación de E. coli.		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad antifúngica M. gypsum		Crecimiento menor del 25%	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad Antibacteriana						
<i>S. aureus</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>P. aeruginosa</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>E. coli</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad Antilevadura						
<i>C.kruseii</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>C. glabrata</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>C. parapsilosis</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

Tiempo 180 días

PARÁMETRO		ESPECIFICACIÓN		RESULTADO TIEMPO 180 DÍAS		
Características Organolépticas			Control	Lote A	Lote B	Lote C
Color	Catálogo Pantone	Pantone 497C		Cumple	Cumple	Cumple
Olor		Característico alcohólico.		Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				Cumple	Cumple	Cumple
Turbidez		No presenta turbidez		Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación		No presenta sedimentación		Cumple	Cumple	Cumple
Características Fisicoquímicas				Cumple	Cumple	Cumple
pH		5.54 – 6.04		Cumple	Cumple	Cumple
Densidad relativa		0.925 – 0.975		Cumple	Cumple	Cumple
Grado alcohólico		70 - 65%		No Cumple	No Cumple	No Cumple
Sólidos totales		0.01635 – 0.01808 g/ml		Cumple	Cumple	Cumple
Características microbiológicas						
Conteo aeróbico en placa						
Bacterias mesófilas		< 1000 UFC	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Mohos y levaduras		< 1000 UFC	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Recuento de Enterobacterias						
Coliformes totales		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Coliformes feclaes		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Determinación de E. coli.		< 3 NMP	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad antifúngica <i>M. gypsum</i>		Crecimiento menor del 25%	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad Antibacteriana						
<i>S. aureus</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>P. aeruginosa</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>E. coli</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Actividad Antilevadura						
<i>C. kruseii</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>C. glabrata</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
<i>C. parapselosis</i>		Positivo	No Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla No. 1, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad de los lotes A, B y C de la loción con actividad antifúngica, antibacteriana y antilevadura, la cual se evaluó por medio de pruebas de estabilidad acelerada, utilizando como directrices para el análisis, las pruebas utilizadas para evaluar la calidad de productos farmacéuticos líquidos. La estabilidad de estas características se evaluó a los tiempos 0, 90 y 180 días, sometiendo las muestras a una temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, realizando una comparación con un control.

Las características organolépticas evaluadas, las cuales fueron color y olor, luego de la evaluación se encontró que los tres lotes analizados cumplen con las especificaciones para la forma farmacéutica luego de transcurridos 180 días. Se observó que los parámetros físicos no varían entre los tiempos 0, 90 y 180 días de almacenamiento a temperatura extrema $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, por lo cual cumple con las especificaciones para la preparación.

De las características fisicoquímicas evaluadas, se encontró que los valores de pH, densidad relativa y sólidos totales no muestran una desviación significativa de los valores especificados y los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros permitidos, por lo que cumple con las especificaciones luego de 0, 90 y 180 días de evaluación.

En cuanto a la medición del porcentaje alcohólico de la loción, los valores que se obtuvieron desde el inicio de la evaluación, no cumplen con las especificaciones de calidad, ya que estos se encuentran por debajo del valor mínimo permitido y en cada una de las mediciones se mostró una desviación mayor a 1, lo que significa que después de cada tiempo de medición se perdió más del 1% de alcohol en las cada una de las muestras. Esta disminución pudo deberse a varios factores, dentro de los que se puede mencionar que durante el proceso de disolución del extracto seco de rizoma de *S. domingensis*, el disolvente puede evaporarse. Otro factor pudo ser que la medición se realizó utilizando un método por flotación, el cual puede tener un porcentaje de error alto, debido a que la determinación es visual, el

color fuerte de la loción puede alterar el resultado y los solutos disueltos interfieren en los resultados ya que estos pueden aumentar la densidad de la misma, dificultando al experimentador la observación exacta del menisco. En este caso, pudo haberse disminuido el error utilizando un método más exacto, hay dos formas de poder corregir el porcentaje alcohólico que queda a elección del formulador una de ellas es corregir en las especificaciones el porcentaje alcohólico colocando el porcentaje final del producto terminado ya que siempre hay evaporización del alcohol siempre y cuando no sea menor a 28% ya que por debajo de este no se podría mantener en las condiciones óptimas, y la otra forma de corregirlo puede ser agregando alcohol al 95% hasta obtener el porcentaje alcohólico descrito en las especificaciones, deberá hacerse uno de los dos ajustes antes mencionados durante el proceso de manufactura.

También se evaluó las características microbiológicas de la loción en los tiempos 0, 90 y 180 días respectivamente y se determinó que la loción mantuvo su asepsia durante el transcurso del tiempo de medición sometida a temperatura extrema, por lo que encontró que es apta para el uso humano.

La determinación de la actividad antifúngica, antibacteriana y antilevadura de la loción se realizó por medio de bioensayos, luego de realizarlos se determinó que los tres lotes inhibieron el crecimiento del hongo dermatofito *Microsporum gypseum*, de las bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, y de las levaduras *C. kruseii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* mientras que en el control si hubo crecimiento.

Los resultados de estabilidad acelerada de los tres lotes de loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura analizados pueden deberse a varios factores; en especial a la cantidad de metabolitos activos, que confieren la actividad antimicrobiana, antilevadura, antifúngica. Esta cantidad de metabolitos activos, depende de la época de colecta de la materia médica vegetal, ya que cada planta en particular posee la mayor concentración de sus metabolitos activos en un periodo del año.

Luego de la evaluación de los tres lotes de la loción se puede determinar que es importante que la estabilidad de sus características fisicoquímicas, microbiológicas y su actividad antimicrobiana, antilevadura, antifúngica se mantengan, por lo que es indispensable que se controlen todos los procesos involucrados en la fabricación del producto, como las Buenas Prácticas Agrícolas y las Buenas Prácticas de Manufactura, para que los lotes sean reproducibles y que el producto mantenga su acción terapéutica durante el tiempo asignado para su expiración.

Las características organolépticas, fisicoquímicas, microbiológicas y de la potencia de la actividad antifúngica, antibacteriana y antilevadura de una loción preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis* en solución etanólica al 70%, se mantienen al variar las condiciones normales de almacenamiento, ya que para que el producto sea estable, debe cumplir con todos los parámetros de calidad para dicha forma farmacéutica. Es por esta razón que debe realizarse estudios de estabilidad a largo plazo (estabilidad de anaquel), para establecer el tiempo de vida útil del producto, controlando factores que pueden disminuir la actividad del producto como lo son el material de empaque, el almacenamiento del producto, la distribución y la zona climática de los lugares donde se comercializara el producto.

La metodología planteada para el estudio de estabilidad para la loción preparada a partir de extracto seco de *S. domingensis*, demostró ser factible para la forma farmacéutica evaluada.

X. CONCLUSIONES

1. Las características organolépticas, fisicoquímicas, microbiológicas de la loción preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis* con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura en solución etanólica al 70%, se mantuvieron al variar las condiciones normales de almacenamiento luego de 180 días de almacenamiento.
2. Los tres lotes de loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura mantienen la presencia de sus metabolitos activos luego de 180 días de almacenamiento en condiciones extremas de temperatura.
3. Los lotes A, B y C, inhiben el crecimiento del dermatofito *M. gymipseum*, de las bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, y de las levaduras *C. kruseii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, luego de 180 días de almacenamiento comparado con el control en el que si hubo crecimiento.
4. La metodología de análisis de estabilidad para productos obtenidos por síntesis química que se planteó para la evaluación de la estabilidad acelerada de la loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura, preparada a partir de extracto seco de rizoma de *S. domingensis*, cuenta con las características y los parámetros de calidad para la evaluación del producto.
5. Las características fisicoquímicas evaluadas para la loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura cumplen con las especificaciones de calidad para la forma farmacéutica con excepción del porcentaje alcohólico, que se mantuvo por debajo de los rangos aceptados que deberá ser corregido en el proceso de manufactura.
6. El porcentaje alcohólico en los tres lotes de loción con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura evaluados no cumplió con las especificaciones permitidas, por lo que debe utilizarse otro método como el de Karl Fisher.

7. Las características microbiológicas de los tres lotes de loción analizados no se ven afectados por las condiciones extremas de temperatura a la fueron sometidos $40\pm 2^{\circ}\text{C}$.
8. Para obtener un 95% de confiabilidad se evaluaron los resultados de los parámetros anteriormente mencionados, en tres diferentes lotes de loción a tiempo 0, 90 y 180 días. El análisis estadístico se realizó de manera descriptiva aplicando medidas de tendencia central en cada tiempo de medición. La medición de las variables cuantitativas se realizó por triplicado en cada una de las mediciones.

XI. RECOMENDACIONES

1. Mejorar las buenas prácticas de manufactura del producto, para obtener lotes reproducibles tanto en sus características fisicoquímicas, microbiológicas y fotoquímicas, como en la actividad contra bacterias, hongos y levaduras.
2. La medición del porcentaje alcohólico cuantitativamente deberá realizarse por el método de Karl Fisher.
3. Utilizar cámaras de estabilidad para la realización de estudios de estabilidad acelerada a fin de establecer la influencia de la humedad en dicho proceso.
4. Identificar y cuantificar metabolitos secundarios en los productos fitofarmacéuticos, para que sirvan como indicadores para establecer de forma numérica la estabilidad de los mismos.

XII. BIBLIOGRAFIA

- Arriaza, D.A. (1983). Acción diurética y antimicrobiana de algunos vegetales del género Smilax. (Tesis Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala.
- Arteche, A. (2003). Historia de la medicina naturista española. Recuperado de <http://www.fitoterapia.net>.
- Bérdy, J., Aszalo, A., Bostain, M., & McNitt, K. (1982). CRC Handbook of Antibiotic Compounds (Vol. 1 pp. 410). (Vol. 2 pp. 429.) .Boca Raton,. (Vol. 1 pp. 410). (Vol. 2 pp. 429.)
- Brancato, F.P., & Golding N.S. (1983). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth (45:848-863). (s.l.) J. Mycol
- Cáceres, A. (1993). Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala. Cuaderno de investigación 7-92 (pp. 89). Guatemala: Dirección General de Investigación DIGI, USAC.
- Cáceres, A. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala (pp. 402). Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B. & Aguilar. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders 1. Screening of 84 plants against enterobacterias (30:55-73). (s.l.): Journal Ethnopharmacol.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B. & Aguilar. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases 1. Screening of 68 plants against gram positive bacteria (cap 31, pp 193-208). (s.l.):Journal Ethnopharmacol.
- Huft, M.J., Davidse, G., Sousa, M. y Chater, A.O. (1995). Flora Mesoamericana. México: Universidad Autónoma de México. Vol. 6. pp.543.
- De la Cruz, BC. (2005). Caracterización de cinco Extractos de Plantas Medicinales Nativas de Guatemala, Validadas Científicamente (Tesis Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala: (s.n.)
- Gattuso, M. (1999). Contribución personal. Universidad Nacional del Rosario Argentina.
- Girón, M., Martínez, JV., Amador, D., y Cáceres, A. (2000). Tecnología agrícola para la producción de plantas medicinales (pp. 9-66). Guatemala: (s.n.).

- Hartwell, J. (1982). Plants used against cancer (pp. 144, 338). (s.l.):Lawrence Quaterman Publications.
- House, P.R., Lagos-Witte, S., Ochoa, L., Torres, C., Mejía, T. y Rivas, M. (1995). Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa. UNAH-CIMN-CIMN-CID/CIIR-GTZ. pp. 555.
- Kenneth, A. Connors; Gordon, L. Amidon, & Lloyd, K. (1979). Chemical Estability of Pharmaceuticals. A Handbood for Pharmacistis (pp. 102 – 119) New York, USA: Wiley – Interscience Publication.
- Martínez, J. (1995). Distribución de las Especies de Smilax en Guatemala. Guatemala
- Martínez, J. (2002). Proyecto 18-00 Caracterización In situ y Manejo de poblaciones de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis*). (pp. 32-36, 38). Guatemala: (s.n.).
- Medinilla, B. (1999). Manual de Laboratorio de Fitoquímica (pp.19). Guatemala: USAC.
- Mizzau, D. (2003) El arte de curar con plantas en el hombre. Recuperado de <http://www.fundacer.com.arg>
- Morton, J.F. (1981). Atlas of Medicinal Plants of Middle America (pp. 82, 1420). (s.l.). pp. 82, 1420.
- Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII. Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad para uso Humano. Anexo. Resolución No. 148-2005. ICS 11.120.10 (pp. 1-5.) Guatemala: Comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT. Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC. Secretaría de Industria y Comercio, SIC. Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC.
- Robles, G. (1998). Plantas Medicinales del Género Smilax en Centro América (24-27, 30-36). Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Sánchez, M.R. (2003). Evaluación de Toxicidad Aguda y Subcronica de la planta *Smilax domingensis* (zarzaparrilla). (Tesis Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmaci. USAC. Guatemala.
- Santa Cruz, L. (1987). Manual de Selección Fotoquímica.(pp. 43-51). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala: (s.n.).

- Sólis, P., De Solis, N., Gattuso, S., y Cáceres, A. (2003). Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos (pp. 49). Proyecto de Desarrollo y Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos. (OEA/AICD/AE 089/03. (s.n.)
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A.(1952). Flora of Guatemala (pp.431). Chicago: Fieldiana.
- Tamizaje Fitoquímico (2005). Manual de Operaciones. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (pp 3,4, 6). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala: (s.n.).
- Temaj, S. (1995). Cuantificación de Saponinas Esteroidales en hojas y rizomas de *Smilax lundellii* (zarzaparrilla). (Tesis Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala.
- The United States Pharmacopeia Convention. (2007). Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional. (Vol. 1. pp. 1364). USP 30a. ed., NF 25a ed. ed. anual en español. Estados Unidos de America [USA] : (s.n.).
- Williams, L. (1981). The useful plants of Central America (24:51, 196, 264). Honduras, Ceiba: (s.n.).

XIII. ANEXOS

A. INFORMACIÓN DE LOS COMPONENTES

1. DEL PREPARADO VEGETAL:

a. Denominación: tinturas, extractos y cristales.

Obtención: a partir del rizoma seco y molido se procede a la extracción con el respectivo alcohol para obtener una tintura, el extracto se obtiene concentrando la tintura en un rotavapor, y los cristales se obtienen secando en su totalidad el extracto. (Sólis, P., De Solis, N., Gattuso, S., Cáceres, A. 2003).

b. Componentes con actividad terapéutica y marcadores: saponinas actividad antimicrobiana, parrillina antimicótico.

c. Metodología analítica: del extracto obtenido del rizoma molido, se identifican agliconas esteroidales por cromatografía de capa fina (Standley. 1952).

B. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO TERMINADO

1. Características de la loción

Prueba	Especificación
Apariencia	Líquido oscuro
Color	Vino tinto oscuro
Olor	Característico alcohólico
Ph	5.54 – 6.04
Densidad relativa (25°C)	0.925 – 0.975

Fuente: monografía registro sanitario de producto terminado

2. Características del envase

Envase	Especificación
Capacidad	60 ml
Material	PET
Color	Ámbar oscuro
Tapadera	Asperjadores plásticos

Fuente: monografía registro sanitario de producto terminado

C. CONDICIONES PARA REALIZAR ESTUDIOS ACELERADOS DE ESTABILIDAD

1. Se aplica para el registro de un medicamento o modificaciones a las condiciones de registro; se deben llevar a cabo en tres lotes de producción con la formulación y el material de empaque / envase primario sometido a registro para obtener un 95% de confiabilidad. (Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII.)

Condiciones del Estudio de Estabilidad Sustancias que no requieren refrigeración ni congelación Tiempo 6 meses (180 días)	
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	ANÁLISIS
40 °C ± 2 °C con 75 % ± 5% de humedad relativa para formas farmacéuticas sólidas	Inicial 90 días 180 días
40 °C ± 2 °C para formas farmacéuticas líquidas y semisólidas	Inicial 90 días 180 días
40 °C ± 2 °C para todas las demás formas farmacéuticas	Inicial 90 días 180 días

Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII.

D. CONTEO AERÓBICO EN PLACA, MOHOS Y LEVADURAS

1. Cálculos:

Cajas sin crecimiento bacteriano: El resultado se expresa como menor de la dilución más baja sembrada (Samayoa, 1996).

Ej:	1:10	1:100	
	0	0	= 10 UFC/g ó ml
	0	0	

Cajas con menos de 25 colonias: Tomar la dilución menor y reportar como recuento aeróbico en placa estimado; o tomar como 25 veces la dilución menor donde aparecen colonias (Samayoa, 1996).

Ej:	1:10	1:100	
	15	3	= 250 UFC/g ó ml
	0	0	

Cajas entre 25 y 250 colonias: El conteo final se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{Sumatoria de Colonias}}{[(1*NCdb) + (0.1*NCda)]} * FD$$

N: Número de colonias por g o ml de muestra.

NCdb: Número de cajas contadas de la dilución más baja.

NCda: Número de cajas contadas de la dilución siguiente más alta.

FD: Factor de dilución menor contada.

Ej:	1:100	1:1000	
	232	33	
	244	28	

$$\frac{232+244+33+28}{[(1*2) + (0.1*2)]} * 100 = 24,409 = \mathbf{24,000 \text{ UFC/g ó ml}}$$

NOTA: Cuando los conteos de uno de los duplicados está fuera de ambos límites (25-250), tome en cuenta sólo los que están dentro de los establecidos (Samayoa, 1996).

Todas las cajas tienen más de 250 colonias

Se seleccionan los duplicados de la dilución con el conteo más cercano a 250.

Si hay menos de 10 colonias por cada cuadro del contador

Si hay menos de 10 colonias por cada cuadro del contador de colonias (cada cuadro mide 1 cm²), seleccione 12 cuadros (seis horizontales y seis verticales). Si hay más de 10 colonias por cuadro, entonces se cuentan solo 4 cuadros. En ambos casos debe obtenerse el promedio de colonias por cm². Este resultado se multiplica por el área de la caja y por el factor de dilución y se informa como recuento estimado, el cual se indica con un asterisco (*). El diámetro interno de los halos de tamaño estándar varía, por lo que el área puede ser:

65 cm (9 cm de diámetro interno)

57 cm (8.5 cm de diámetro interno)

Ejemplo:

Cada cm² tiene más de 10 colonias:

$$\text{Promedio} = 15+16+18+15 = 64/4 = 16$$

$$\text{RE} = 16 * 57 \text{ a} * 100 \text{ b} = 91,200 \text{ UFC/g-ml}$$

RE = Recuento estimado

a = Área de la caja

b = Factor de dilución

Cajas con crecimiento excesivo: El conteo excede de 100 colonias por cm² o es Muy Numeroso Para Contar (MNPC). Se informa como recuento estimado y como mayor de 5700 UFC (Samayoa, 1996).

Ej: 1:1000 1:10000
 MNPC MNPC

$$100 a * 57b * 10000c = \mathbf{5,700,000 \text{ UFC/g ó ml}}$$

MNPC = Muy Numeroso Para Contar

a = Colonias

b = Área de la caja

c = Factor de dilución mayor

E. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Coliformes totales:

La presencia de Coliformes totales indica que la contaminación de la muestra se debe al proceso que ha llevado desde el inicio, como malas condiciones de secado, almacenamiento, aire, humedad así contaminación por animales, insectos y agua (The United States Pharmacopeia Convention. 2007)

Muestra	1: 100	1:1000	1:10000	Resultado (NMP/g-ml)
XX	0	0	0	Xx

(3)

- Coliformes fecales:

La presencia de Coliformes fecales indica contaminación fecal proveniente del riego con aguas negras y puede haber potencialmente la presencia de microorganismos patógenos (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

Muestra	1: 100	1:1000	1:10000	Resultado (NMP/g-ml)
XX	0	0	0	Xx

NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Combinación de tubos positivos	NMP por g ó ml
0-0-0	< 3
0-0-1	3
0-1-0	3
0-2-0	3
1-0-0	4
1-0-1	7
1-1-0	7
1-1-1	11
1-2-0	11
2-0-0	9
2-0-1	14
2-1-0	15
2-1-1	20
2-2-0	21
2-2-1	28
2-3-0	12
3-0-0	23
3-0-1	39
3-0-2	64
3-1-0	43
3-1-1	75
3-1-2	120
3-2-0	93
3-2-1	150
3-2-2	210
3-3-0	240
3-3-1	460
3-3-2	1100
3-3-3	2400

- ***Escherichia coli:***

E. coli se presenta como un microorganismo enteropatógeno. El producto es aceptado cuando no presenta crecimiento microbiológico (The United States Pharmacopeia Convention. 2007).

Muestra	Resultado
XX	Positivo o Negativo

LOTES ANALIZADOS

LOTE	TEMPERATURA	TIEMPO 0 DÍAS	TIEMPO 90 DÍAS	TIEMPO 180 DÍAS
CONTROL	40±2°C	11/05/09	10/08/09	09/11/09
A	40±2°C	11/05/09	10/08/09	09/11/09
B	40±2°C	11/05/09	10/08/09	09/11/09
C	40±2°C	11/05/09	10/08/09	09/11/09

F. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUANTITATIVAS

Tabla No. 1
pH muestra A

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	5.55	5.54	0.0115
	2	5.54		
	3	5.54		
90 días	1	5.53	5.53	0.0058
	2	5.53		
	3	5.55		
180 días	1	5.53	5.55	0.0058
	2	5.53		
	3	5.55		
PROMEDIO				5.54
DESVIACION ESTANDAR				0.0069

Tabla No. 2
pH muestra B

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR
0 días	1	5.40	5.41	0.0058
	2	5.41		
	3	5.50		
90 días	1	5.41	5.41	0.0058
	2	5.41		
	3	5.40		
180 días	1	5.41	5.44	0.0051
	2	5.40		
	3	5.41		
PROMEDIO				5.42
DESVIACION ESTANDAR				0.0173

Tabla No. 3
pH muestra C

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	5.50	5.56	0.0551
	2	5.60		
	3	5.59		
90 días	1	5.59	5.60	0.0058
	2	5.59		
	3	5.60		
180 días	1	5.60	5.59	0.0058
	2	5.60		
	3	5.59		
PROMEDIO				5.58
DESVIACION ESTANDAR				0.0184

Tabla No. 4
DENSIDAD RELATIVA MUESTRA A

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	0.9314	0.9272	0.0037
	2	0.9242		
	3	0.9261		
90 días	1	0.9324	0.9292	0.0029
	2	0.9284		
	3	0.9268		
180 días	1	0.9242	0.9269	0.0031
	2	0.9303		
	3	0.9262		
PROMEDIO				0.9278
DESVIACION ESTANDAR				0.0004

Tabla No. 5
DENSIDAD RELATIVA MUESTRA B

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	0.9324	0.9303	0.0036
	2	0.9262		
	3	0.9323		
90 días	1	0.9252	0.9287	0.0036
	2	0.9285		
	3	0.9323		
180 días	1	0.9228	0.9259	0.0055
	2	0.9226		
	3	0.9323		
PROMEDIO				0.9283
DESVIACION ESTANDAR				0.0011

Tabla No. 6
DENSIDAD RELATIVA MUESTRA C

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	0.9328	0.9314	0.0028
	2	0.9282		
	3	0.9333		
90 días	1	0.9275	0.9302	0.0029
	2	0.9298		
	3	0.9332		
180 días	1	0.9286	0.9310	0.0031
	2	0.9298		
	3	0.9345		
PROMEDIO				0.9309
DESVIACION ESTANDAR				0.0002

Tabla No. 7
GRADO ALCOHÓLICO MUESTRA A

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	56	55.33	0.58
	2	55		
	3	55		
90 días	1	55	54.67	0.58
	2	54		
	3	55		
180 días	1	53	53.33	0.58
	2	53		
	3	54		
PROMEDIO				54.44
DESVIACION ESTANDAR				1.02

Tabla No. 8
GRADO ALCOHÓLICO MUESTRA B

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	56	55.33	0.58
	2	55		
	3	55		
90 días	1	55	54.00	1.00
	2	53		
	3	54		
180 días	1	54	55.33	0.58
	2	53		
	3	53		
PROMEDIO				54.22
DESVIACION ESTANDAR				1.02

Tabla No. 9
GRADO ALCOHÓLICO MUESTRA C

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	56	55.33	0.58
	2	55		
	3	55		
90 días	1	54	53.67	0.58
	2	54		
	3	53		
180 días	1	53	55.33	0.58
	2	54		
	3	53		
PROMEDIO				54.11
DESVIACION ESTANDAR				1.07

Tabla No. 10
SOLIDOS TOTALES MUESTRA A

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	0.0188	0.0173	0.0020
	2	0.0180		
	3	0.0150		
90 días	1	0.0173	0.0176	0.0004
	2	0.0180		
	3	0.0176		
180 días	1	0.0150	0.0173	0.0020
	2	0.0188		
	3	0.0180		
PROMEDIO				0.0174
DESVIACION ESTANDAR				0.0002

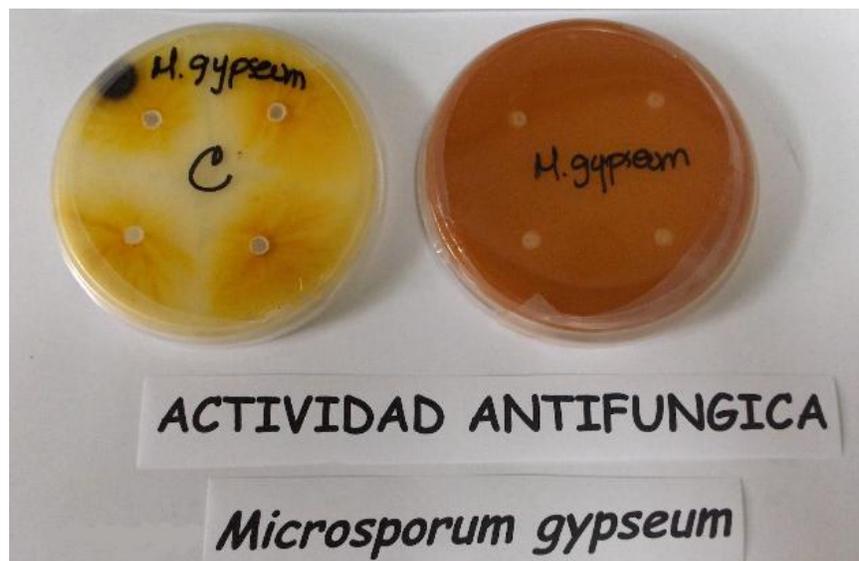
Tabla No. 11
SOLIDOS TOTALES MUESTRA B

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	0.0178	0.0171	0.0013
	2	0.0180		
	3	0.0156		
90 días	1	0.0163	0.0176	0.0013
	2	0.0178		
	3	0.0188		
180 días	1	0.0153	0.0173	0.0018
	2	0.0178		
	3	0.0188		
PROMEDIO				0.0174
DESVIACION ESTANDAR				0.0003

Tabla No. 12
SOLIDOS TOTALES MUESTRA C

TIEMPO DE MEDICIÓN	MEDICIÓN	RESULTADO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
0 días	1	0.0158	0.0159	0.0010
	2	0.0170		
	3	0.0150		
90 días	1	0.0174	0.0161	0.0011
	2	0.0158		
	3	0.0152		
180 días	1	0.0172	0.0164	0.0011
	2	0.0168		
	3	0.0152		
PROMEDIO				0.0163
DESVIACION ESTANDAR				0.0002

G. RESULTADOS PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA



LOTE A



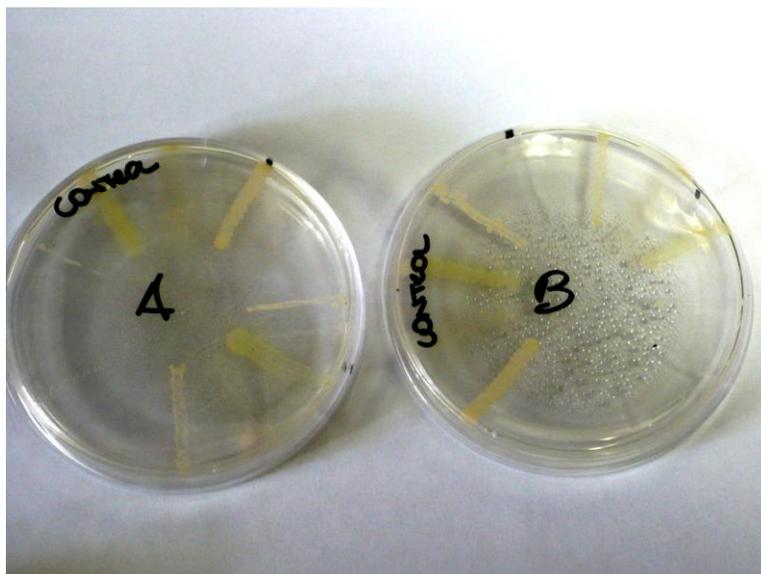
LOTE B



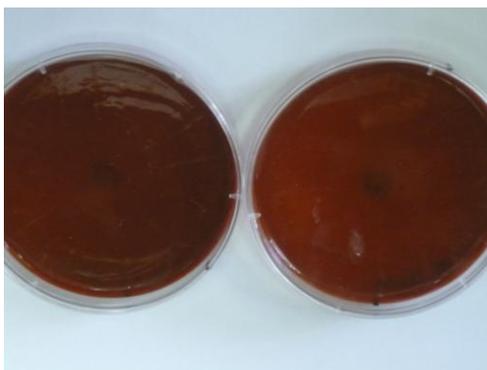
LOTE C



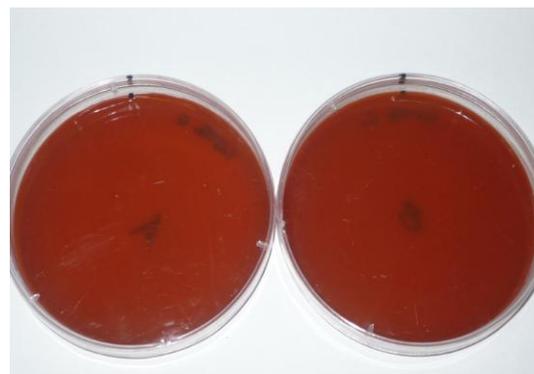
H. RESULTADOS PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTILEVADURA



LOTE A



LOTE B



LOTE C

