

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**

**"MAESTRIA EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y
CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS"**



**ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN EN UNA FORMA
FARMACÉUTICA SEMISÓLIDA PARA EL EXTRACTO ACTIVO
Y CONCENTRADO DE ALCALOIDES TOTALES DE LA ESPECIE
GALIPEA LONGIFLORA KRAUSE KALLUNKI "EVANTA"**

**Tesis de Post grado para optar el título de Magíster en "Tecnología
Farmacéutica y Control de Calidad de medicamentos"**

POSTULANTE : Lic. Beatriz Amparo Rodríguez Olguín

TUTORES : Alberto Giménez Turba. Ph.D

: Francisco López Naranjo. MSc.

**La Paz - Bolivia,
2006**

RESUMEN

El presente trabajo se ha desarrollado en el Instituto de Investigaciones el Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Mayor de San Andrés UMSA, financiado por el Proyecto Multilateral "Aprovechamiento de la flora regional como fuente de moléculas antifúngicas, antiparasitarias y anticancer" (Flora Regional O.E.A.) bajo la coordinación, del Dr Mahubir Gupta, CIFLORPAN, Universidad de Panamá. El trabajo se centra en un estudio de preformulación de dos formas farmacéuticas semisólidas, Emulsión Crema y Lipo Gel, elaborados a partir del extracto crudo diclorometánico (EC), y Alcaloides Quinolínicos Totales (TQA) obtenidos de la corteza de una planta medicinal de la Amazonia *Golipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta).

Se han determinado las características físicas y biológicas de los materiales crudos y de las formulaciones farmacéuticas, ensayos que incluyen: el color, olor, viscosidad, pH, extensibilidad, densidad, residuos sólidos, humedad, refractometría y estabilidad física a la luz UV (254nm), a temperaturas de 4°C (frigorífico) y 45°C con humedad relativa de 75%, por el lapso de 3 meses, de acuerdo a las Normas del Comité Internacional de Armonización (ICH). La actividad biológica de materiales crudos y las formulaciones farmacéuticas se evaluó frente a cepas de promastigote *Leishmania*: *L. Amazonensis* (IFLA / BR / 75 / PH 8) *L. braziliensis* (MHOM / BR / 75 / M 2903) y *L. Donovan* (MHOM / BR / 74 / PP75).

Los valores de $IC_{50\%}$ para los Alcaloides quinolínicos totales (TQA) fueron entre 15,9 y 25,8 $\mu\text{g/mL}$, y entre 82,7 y 101,2 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto crudo (EC). Las formulaciones fueron preparadas a partir del extracto crudo y Alcaloides quinolínicos totales al 5%, y el $IC_{50\%}$ para la crema de extracto osciló entre 72,6 y 125,0 $\mu\text{g/mL}$, y entre 51,6 y 68,0 $\mu\text{g/mL}$ para el Lipogel. Mientras que para las formulaciones preparadas a partir de los Alcaloides quinolínicos totales el $IC_{50\%}$ fue entre 37,5 y 67,3 $\mu\text{g/mL}$ para la Crema, y entre 12,5 y 21,8 $\mu\text{g/mL}$ para el Lipogel.

No se ha verificado ningún cambio en la composición del extracto crudo y Alcaloides quinolínicos totales, ni en los productos Crema y Lipogel, durante las pruebas de estabilidad. Las lecturas fueron hechas por el método espectroscópico UV-visible en el intervalo de longitud de onda entre 180 – 400 nm.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Actualmente ha resurgido el interés por lo natural y es de mucha importancia estudiar aquellas plantas de uso tradicional. Por esta razón, las investigaciones fitoquímicas han alcanzado avances muy significativos en cuanto a las elucidaciones estructurales, síntesis de sus metabolitos, estudios clínicos y toxicológicos.

En este contexto, el estudio de los productos naturales tiene especial importancia también en el área de la industria farmacéutica, ya que constituyen una fuente inagotable de moléculas (metabolitos secundarios), responsables de diferentes actividades farmacológicas, pues los medicamentos sintéticos disponibles en el mercado, en algún momento, han seguido la síntesis de los principios activos a partir del conocimiento de las moléculas presentes en la naturaleza.

Las plantas medicinales han constituido uno de los principales remedios curativos empleados desde la antigüedad por el hombre donde en un principio su uso fue de tipo mágico- religioso. Luego, paulatinamente por ensayo error fue adquiriendo carácter empírico, y a partir de una concepción esotérica de la medicina, Paracelso intuye la existencia de principios activos para cada enfermedad, aislables por medio de técnicas químicas. Ya en el siglo XIX con el desarrollo de la química los estudios experimentales contribuyeron a la explicación de la relación existente entre la composición química de una sustancia y su acción sobre el organismo (1).

En el ámbito mundial existen numerosos grupos de investigadores que continuamente se dedican a la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios para afrontar el desafío de la terapéutica en patologías hasta ahora difíciles de prevenir y tratar, como el: cáncer, SIDA y otros. La búsqueda de sustancias activas se realiza en productos naturales de origen animal y vegetal (2).

En Bolivia el uso tradicional o empírico de diferentes especies vegetales medicinales toma mayor importancia, sobre todo cuando estas plantas ya están registradas en nuestra Farmacopea Tradicional Boliviana y es así también cómo se dispone de algunas Guías de uso para plantas medicinales, razón importante por la que se debe incentivar, aún más en nuestro país, los estudios en el área de fitotecnología, para desarrollar medicamentos a partir de especies vegetales que tienen acción eficaz frente a enfermedades que merecen particular interés y de esta manera, aportar con datos que sirvan a la industria farmacéutica para que desarrollen formas farmacéuticas eficaces y seguras.

Con este enfoque, las plantas consideradas como medicinales (a través de la información etnobotánica y etnofarmacológica) son el punto de partida de las investigaciones fitoquímicas, pues a partir del conocimiento empírico de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen, se someten a ensayos biológicos, separación de metabolitos secundarios y elucidación de estructuras químicas, para la identificación de principios activos de interés farmacológico o para la validación de sus propiedades.

El desarrollo del conocimiento de los productos naturales de interés farmacológico en Bolivia tiene una experiencia de aproximadamente 10 a 15 años, período en el que de manera aislada y en equipos de trabajo multidisciplinarios, dentro de programas de investigación en distintas universidades, se han efectuado numerosos estudios en plantas medicinales.

En el Instituto de Investigaciones Fármaco - Bioquímicas (I.I.F.B.) de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) de la ciudad de La Paz, la línea de investigación de productos naturales iniciada hace más de 10 años, cuenta con antecedentes de estudios fitoquímicos de más o menos 1500 especies de plantas medicinales provenientes de la zona Andina y parte de la Amazonía (3). Otros incluyen estudios de taxonomía, morfología y anatomía de la corteza del tallo y hoja de la Evanta (4), evaluaciones de actividades antibacterianas, antiparasitarias, antifúngicas, citotóxicas y citostáticas a través de ensayos biodirigidos *in vitro*. (5).

Evaluación de la toxicidad *in vivo* en la *Galipea longiflora* Krause (6). Estudios preclínicos de la Evanta mediante modelos toxicocinéticos (7). Evaluación de la actividad biológica *in vitro* en la *Galipea longiflora* Krause Kallunki (8). Se ha avanzado también en la identificación y separación de grupos de metabolitos secundarios, purificación de fracciones e incluso, la elucidación de estructuras químicas de algunas especies de plantas medicinales (9).

En el departamento de Cochabamba, el Programa de Fármacos-Alimentos y Cosméticos, con apoyo del Fondo Nacional del Medio Ambiente (FONAMA), desde hace siete años atrás inicia también actividades preliminares de investigación en el campo de la fitoquímica, con la finalidad de buscar su aprovechamiento en áreas cosmetológicas.

En la ciudad de Santa Cruz se tiene referencias del inicio de estudios en productos naturales desde hace cuatro años atrás, período en el cual se efectuaron bioensayos en extractos de plantas nativas del Oriente Boliviano, con antecedentes de uso medicinal. Se dispone de resultados preliminares de aproximadamente 17- 21 especies (10,11).

En este contexto, existe aún mucho trabajo para desarrollar en el campo de la fitoquímica, sobre todo en especies que tienen perfil elevado de actividad biológica y toxicológicamente inocuos, como también incursionar en un estudio más sistemático para avalar científicamente la utilización empírica tradicional de estas plantas.

Por tanto, al disponer de información suficiente en cuanto a su identificación botánica, taxonomía, morfología, anatomía, composición química, usos en medicina tradicional, estudios citotóxicos, cistostáticos, antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, estudios pre – clínicos en modelos toxicocinéticos, evaluación de la toxicidad *in vivo* y evaluación de la actividad biológica *in vitro* en la especie del género *Galipea longiflora* Krause “Evanta”, se constituye entonces, el inicio de la etapa de concepción y desarrollo de la forma farmacéutica o fitofármaco que se desea lograr.

El “estudio de preformulación” considera las características físico químicas de los fármacos que componen la fórmula desarrollada, estudios de pre – estabilidad, compatibilidad del principio activo con excipientes y envase (12).

El estudio está orientado a proseguir estudios de preformulación del extracto diclorometánico de corteza y del concentrado de alcaloides totales obtenidos (quinolinas alquílicas – arílicas) de la especie antes mencionada, como requisito previo, dentro de las normas de bioética y de desarrollo de un nuevo medicamento, llegando a formular una emulsión crema y lipogel a escala laboratorio; confirmar si mantiene su actividad biológica y física obteniendo una formulación que constituirá referencia básica para continuar con la elaboración a escala piloto y sus posteriores estudios clínicos.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente en Bolivia el área de la etnobotánica ha tenido significativos aportes en la identificación de especies vegetales de uso medicinal, especialmente en la zona Andina y subandina, y no así en los estudios de preformulación, pues todavía el área de tecnología

farmacéutica, debido a la poca inversión, no se ha dedicado al desarrollo de fórmulas nuevas cuyo principio activo es un extracto activo obtenido de una especie vegetal, es entonces el momento en el que se inicia las investigaciones en esta área, obteniendo datos de interés para la industria farmacéutica sugiriendo la elaboración de formas farmacéuticas como fitomedicamentos eficaces, inocuos y seguros.

Entonces, para respaldar el uso en Medicina Tradicional el trabajo actual plantea el estudio de preformulación en una emulsión crema y lipogel de uso tópico, para el extracto activo diclorometánico de la corteza y del concentrado de alcaloides totales (quinolíνας alquílicas- arílicas) de la especie *Galipea longiflora* Krause "Evanta" a escala de laboratorio, confirmando su actividad biológica y su estabilidad física, contribuyendo de esta manera a la validación de sus propiedades farmacológicas atribuidas a las sustancias activas que posee.

1.2.1 Identificación del Problema

La especie elegida para el estudio de preformulación y formulación de la emulsión crema y lipogel, fue seleccionada por presentar actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria, principalmente contra la Leishmaniasis, que son infecciones humanas producidas por protozoarios del género *Leishmania*, cuyas formas clínicas son: lesiones a nivel cutáneo, mucocutáneo y visceral, transmitidas al hombre por la picadura de un insecto vector: el flebótomo, cuya hembra es la única que transmite el parásito, que se infecta picando animales domésticos o salvajes, pueden ser también transmitidas de una persona infectada a otra, a través del flebótomo (13).

La Organización Mundial de la Salud señala que en todo el mundo existen 1.500.000 personas afectadas por las diversas formas de Leishmaniasis con incidencia de 600.000 casos nuevos declarados cada año, distribuidos en 88 países (14).

En Bolivia la enfermedad prevalece en las Llanuras Amazónicas hasta la Cordillera Andina Oriental con incidencia en los departamentos de Pando, Beni, La Paz (en provincias Nor y Sud Yungas), en Santa Cruz (Chiquitos y Ñuflo de Chávez), Cochabamba (Chapare) y

Chuquisaca en la provincia Acero (15,16). Paredes Larrea y col. (17) señalan que se han registrado 6 casos de Leishmaniasis visceral en Bolivia en el Departamento de La Paz (Yungas) además de *L. canina*, y el flebótomo peri doméstico predominante es *Luxomia longipallis* que se ha encontrado infectado naturalmente en 0,2 a 4,0% de los ejemplares examinados.

El tratamiento que se da para la Leishmaniasis cutánea o tópica y la Leishmaniasis mucocutánea o “spundia” es usando derivados pentavalentes de antimonio: Glucantime, Anfotericina B, Aminosidina, SSG (Pentostam^R), medicamentos que producen efectos secundarios, que muchas veces no son tolerados por el paciente, además de su elevado costo (15).

Por todo ello, al ser una enfermedad asociada al área rural y peri urbana, por ende a gente de escasos recursos, además del elevado costo del tratamiento, y conociendo que los comunitarios usan diferentes especies vegetales como: *Galipea longiflora* Krause (Rutácea) para curarse esta enfermedad aplicándose sobre la piel en forma de cataplasma de hojas y corteza, y bebiendo infusiones de las mismas (18), se inician estudios de preformulación en “emulsión crema” y “lipogel” de uso tópico, para el extracto activo y concentrado de sus alcaloides totales de la especie *Galipea longiflora* Krause, que reúna las características físico químicas, seguridad, eficacia y calidad, según los criterios farmacotécnicos para formas farmacéuticas semisólidas de fitomedicamentos y se confirmó su actividad biológica y estabilidad física.

Por las características particulares que presenta la Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea, que son las más frecuentes, se ha considerado como propuesta formular una emulsión crema y lipogel de uso tópico como coadyuvante para el tratamiento.

Debe hacerse notar que el presente estudio será además complementado por investigaciones que se están llevando a cabo paralelamente en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.), sobre dosis y pautas de dosificación,

biodisponibilidad y biotransformación del extracto activo como tal y en producto terminado, para avalar la forma farmacéutica propuesta.

1.2.2. Formulación del Problema

Por lo expuesto, se detecta la necesidad de disponer de una forma farmacéutica semisólida que conserve las propiedades y la actividad del extracto y del concentrado de alcaloides totales y a la vez facilite su dosificación y uso.

Preguntas planteadas para la investigación:

1. ¿Qué formulación semisólida de uso tópico es la más adecuada para el extracto activo y el concentrado de alcaloides totales (quinoleinas alquílicas – arílicas) de la especie *Galipea longiflora* Krause “Evanta”?
2. ¿Estas formulas semisólidas: emulsión crema y lipogel propuestas, conservarán la concentración de actividad biológica que contiene el extracto como tal y el concentrado de alcaloides totales?
3. ¿Estas formulas semisólidas: emulsión crema y lipogel propuestas, conservarán su estabilidad física con el tiempo?

1.2.3. Delimitación del Problema

Ámbito Geográfico

El estudio de investigación se ha realizado en la ciudad de La Paz, Bolivia con muestras colectadas de regiones del Norte, de tres áreas que pertenecen al parque Nacional Madidi Beni.

Ámbito Institucional

El desarrollo de la investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.) Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), complementando algunas pruebas en los laboratorios de la empresa Farmacéutica Boliviana "INTI".

1.2.4. Justificación

1.2.4.1. Relevancia Social

Los estudios fitoquímicos bio-dirigidos orientados a la obtención del extracto y del concentrado de alcaloides totales de la planta seleccionada para el estudio, por tratarse de investigaciones aplicadas, tiene relevancia social cuando este resultado se utiliza para validar su uso terapéutico, ya que el conocimiento de las etnias se les devuelve mejorado y validado para su uso y aplicación en beneficio de la población.

Por otra parte, las investigaciones fitoquímicas de plantas nativas de cada región tiene impacto en el desarrollo de esta área de conocimiento, que en nuestro caso y de acuerdo a la información disponible, está enfocado al estudio y validación de las actividades químicas, biológicas, farmacológicas, toxicológicas y microbiológicas.

La búsqueda de nuevas sustancias químicas de origen vegetal con propiedades farmacológicas, es de interés mundial por lo que la investigación está orientada a contribuir en la selección de plantas con potenciales químicos y propiedades biológicas como las señaladas, pero considerando para ello a especies

nativas de nuestro medio y de esta manera impulsar el desarrollo de los estudios fitoquímicos a nivel nacional e iniciar las investigaciones en el área de tecnología llegando a elaborar una forma farmacéutica de uso tópico a escala laboratorio y proponer como fitomedicamento para su elaboración a escala piloto y presentar una alternativa frente a tratamientos caros.

1.2.4.2. Relevancia Práctica

Los estudios fitoquímicos constituyen la base del conocimiento y desarrollo de los productos naturales de origen vegetal, razón por la que la aplicación práctica del presente estudio es iniciar los estudios de preformulación y formulación de una forma farmacéutica semisólida: “emulsión crema” y “lipogel” a escala de laboratorio, para adoptar decisiones de continuar con los estudios a escala piloto e industriales futuros, si la forma farmacéutica propuesta aún mantiene su actividad biológica y estabilidad física, después de haber sido sometida a los estudios de rigor.

Los ensayos de preformulación y formulación de la: emulsión crema y lipogel a escala de laboratorio, preparados a partir del extracto activo y del concentrado de alcaloides totales de la *Galipea longiflora* Krause “Evanta” permitió explorar el área de tecnología o fitotecnología, en base a datos de laboratorio validados en cuanto a sus actividades biológicas y toxicológicas. (5-8).

1.2.4.3. Relevancia Teórica

Los estudios fitoquímicos en productos naturales, y sobre todo en las plantas, hacen referencia a su composición química y a la presencia de grupos de metabolitos secundarios que se aíslan de sus extractos, contribuyendo de manera significativa al desarrollo de esta área considerada estratégica en muchos países.

Al llegar a confeccionar el expediente o ficha técnica del extracto y del concentrado de alcaloides totales como materia prima, en base a la información obtenida de estudios ya realizados, y los obtenidos del estudio de preformulación de la especie del género *Galipea longiflora* Krause “Evanta” incluyendo la formulación de las formas farmacéuticas propuesta, se constituyen base de información técnica y científica para futuros estudios aplicados en el área de la

tecnología farmacéutica o fitotecnología para la elaboración de fitomedicamentos a escala piloto e industrial.

1.2.4.4. Relevancia Metodológica

Teniendo en cuenta que en los estudios fitoquímicos se aplican diversos métodos fisicoquímicos para el aislamiento y purificación de fracciones de metabolitos secundarios, cuyos procedimientos están estandarizados en algunos centros de investigación del país, y no así en los estudios de preformulación para llegar a formular formas farmacéuticas

adecuadas, cuyo bioactivo es un extracto orgánico, diclorometánico, de una especie vegetal, el estudio permitió la adecuación de técnicas e implementación de procedimientos a escala de laboratorio accesibles, para su aplicación a escala piloto e industrial, en investigaciones futuras en el área de tecnología farmacéutica o fitotecnología.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Realizar un estudio de preformulación de una “emulsión crema” y “lipogel” de uso tópico para el extracto activo y el concentrado de alcaloides totales (quinolinas alquílicas–arílicas) de la especie vegetal, del género *Galipea longiflora* Krause conocida popularmente como “Evanta”.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Realizar estudios físico – químicos del extracto diclorometánico de corteza y del concentrado de alcaloides totales de la especie *Galipea longiflora* Krause “Evanta”, y confeccionar su ficha técnica o expediente.
2. Evaluar la actividad biológica (antiparasitaria) “*in vitro*” del extracto dicloromatánico de corteza y del concentrado de alcaloides totales, de la *Galipea longiflora* Krause “Evanta”
3. Desarrollar formulaciones semisólidas: “emulsión crema” y “lipogel” a escala de laboratorio, preparadas a partir del extracto activo y el concentrado de alcaloides totales.
4. Determinar la estabilidad física, parámetros organolépticos, farmacotécnicos, microbiológicos, evaluar la actividad biológica *in vitro*, ensayos biológicos *in vivo* a la emulsión crema y lipogel según especificaciones.

1.4. HIPÓTESIS

El principio activo natural, vegetal : Extracto diclorometánico de la corteza y el concentrado de alcaloides totales (quinolinas alquílicas – arílicas) de la especie *Galipea longiflora* Krause, “Evanta”, conserva su actividad biológica y estabilidad física en una forma farmacéutica semisólida de uso tópico.

1.5. ESQUEMA DE INVESTIGACIÓN

| | |
|-------------|---|
| TEMA | Estudio de preformulación en una “emulsión crema” y “lipogel” de uso tópico para el extracto activo y concentrado de alcaloides totales de la |
|-------------|---|

| | |
|------------------------------|--|
| | especie vegetal <i>Galipea longiflora</i> Krause “Evanta” |
| OBJETIVOS | <p>General: Realizar un estudio de preformulación en una “emulsión crema” y “lipogel” para el extracto diclorometánico y concentrado de alcaloides totales (quinolinas alquílicas – arílicas) de la especie vegetal, <i>Galipea longiflora</i> Krause “Evanta”.</p> <p>Específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar estudios físico – químicos al extracto diclorometánico de corteza y concentrado de alcaloides totales de la especie <i>Galipea longiflora</i> Krause” Evanta”, y confeccionar su ficha técnica o expediente 2. Evaluar la actividad biológica (antiparasitaria) “<i>in vitro</i>” en el extracto diclorometánico de corteza y del concentrado de alcaloides totales, de la especie del género : <i>Galipea longiflora</i> Krause “Evanta” 3. Desarrollar formulaciones semisólidas: “emulsión crema” y “lipogel” a escala de laboratorio, preparadas a partir del extracto activo y del concentrado de alcaloides totales. 4. Determinar la estabilidad física, parámetros organolépticos, farmacotécnicos, microbiológicos, evaluar la actividad biológica <i>in vitro</i>, ensayos biológicos <i>in vivo</i> a la emulsión crema y lipogel según especificaciones para fitomedicamentos y formas semisólidas regidas en farmacopeas. |
| DELIMITACIÓN DEL TEMA | <p>Recursos materiales: Proyecto Aprovechamiento de la flora regional como fuente de moléculas antifúngicas, antiparasitarias y anticáncer. Proyecto Multilateral (Flora regional O.E.A.)</p> <p>Alcance: Materia prima: corteza del tronco de la especie <i>Galipea longiflora</i> Krause “Evanta”</p> <p>a) principio activo :extracto diclorometanico y alcaloides quinoleínicos (alquílicos - arílicos)</p> <p>b) forma farmacéutica semisólida “emulsión crema” y “lipogel”</p> |
| PROBLEMA | En Bolivia el área de tecnología farmacéutica para el desarrollo de nuevas fórmulas cuyo principio activo es un extracto, obtenido de una |

| | |
|-----------------------------|--|
| | <p>especie vegetal, natural, para tratamiento de enfermedades consideradas endémicas en nuestro país como la Leishmaniasis, no ha tenido significativos aportes. Entonces, para respaldar el uso en medicina tradicional de la especie en estudio se plantea el estudio de preformulación a una emulsión crema y lipogel de uso tópico para el extracto orgánico y concentrado de alcaloides totales a escala de laboratorio, confirmar su actividad biológica y estabilidad física.</p> <p>Elementos:</p> <ul style="list-style-type: none"> *Porcentaje de población infectada con diferentes formas de Leishmaniasis * Población de escasos recursos * Turistas * Medicamentos y tratamiento de elevado costo. * Falta de una forma farmacéutica adecuada para la especie <i>Galipea longiflora</i> Krause “Evanta eficaz e inocua, que garantice las propiedades farmacológicas atribuidas a las sustancias activas que posee y sea a la vez un coadyuvante para el tratamiento. <p>Hipótesis:</p> <p>El principio activo natural, vegetal: extracto orgánico de la corteza y el concentrado de alcaloides totales de la especie <i>Galipea longiflora</i> Krause, “Evanta”, conserva su actividad biológica y estabilidad física en una forma farmacéutica semisólida de uso tópico.</p> |
| <p>MARCO TEORICO</p> | <p>Antecedentes: La farmacopea tradicional Boliviana, dentro de las Normas para Medicamentos Naturales tradicionales y homeopáticos, señala a la <i>Galipea longiflora</i> Krause “Evanta” como una planta con actividad Leishmanicida, con valor etnofarmacológico usado por el grupo étnico Chimanés, actividad que se debe a la presencia de 13 alcaloides quinolínicos, 4 de estos denominados “chimaninas” (A,B,C,D), de los cuales, 9 alcaloides están en la corteza</p> |

| | |
|---------------------|---|
| | <p>Ámbito de estudio: La Paz, provincia Iturralde y Beni, provincia Ballivián</p> <p>Marco Conceptual:</p> <p>Definiciones:</p> <p>Bioextracto: Solución extractiva de fitocomplejos de plantas medicinales obtenidos por maceración o percolación de la droga en un solvente (agua, alcohol, etc.) y posterior concentración de la solución por evaporación parcial o total del disolvente, además que tiene actividad biológica confirmada.</p> <p>Semisólido: Este término denota un comportamiento reológico plástico, es decir retiene su forma hasta que una fuerza externa causa su deformación que es permanente.</p> <p>Emulsión crema: Sistema disperso heterogéneo, emulsificado, no oclusivo y según la orientación o/w ó w/o, sus propiedades físico-químicas son diferentes, termodinámicamente inestable debido a la diferencia en las densidades de las 2 fases que la componen y, al gran número de energía superficial (por la combinación de la tensión superficial y la fase dispersa) Es un sistema difásico.</p> <p>Lipogel: Forma farmacéutica semisólida que se presenta en forma gelificada y que contiene en su formulación una fase oleosa (lipídica).</p> |
| METODOLOGIA | <p>Muestra: Corteza de especie vegetal y fórmula semisólida</p> <p>Métodos de trabajo:</p> <ul style="list-style-type: none"> *Técnicas de investigación fitoquímica *Técnicas químicas: cromatografía, espectroscopía *Técnicas Biológicas: actividad biológica <i>in vitro</i>, toxicológicas <i>in vivo</i> "irritabilidad dérmica", límites microbianos <p>Procesamiento de datos: Mediante tabulaciones</p> |
| RESULTADOS | Por cada objetivo, presentación de cuadros, gráficos y texto |
| CONCLUSIONES | Por cada uno de los objetivos planteados |

Fuente elaboración propia, según modelo de Tamayo y Tamayo 1995

1.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

| Categoría | Variables | Indicador | Valor | Técnica |
|----------------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|--|
| Droga de Origen vegetal: Corteza | extracto diclorometánico | Evaluación de actividad Biológica | Formas promastigotes Leishmania : | Concentración inhibitoria media IC ₅₀ |
| | | Descripción del estado físico y características organolépticas: sabor, olor, color, aspecto e higroscopicidad. | Parámetros Permisibles | Refractometría, sólidos totales, humedad, residuos sólidos |
| | | Cromatografía | adsorción | Capa fina, Espectroscopía UV-VIS |
| | | Estabilidad piloto | °C, %, lúmenes | Temperatura humedad, luz |

| | | | |
|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| Quinoleínas Alquílicas arílicas | Evaluación de actividad Biológica | Formas promastigotes Leishmania | Concentración inhibitoria media IC ₅₀ |
| | Descripción del estado físico y características organolépticas: sabor, olor, color, aspecto e higroscopicidad. | Parámetros Permisibles | Refractome- tría, sólidos totales, hume- dad, residuos sólidos |
| | Cromatografía | Adsorción | Capa fina, Espectroscopía UV-VIS |
| | Estabilidad piloto | °C, %, lúmenes | Temperatura humedad, luz |

| Categoría | Variabes | Indicador | Valor | Técnica |
|---|---|--|--|---|
| Droga de Origen vegetal: Corteza | Forma farmacéutica Preformulación | Descripción del estado físico y características organolépticas: sabor, olor, color, aspecto, Cromatografía | Parámetros Permisibles adsorción | densidad, viscosidad, pH, extensibilidad, signo Capa fina |
| | | Estabilidad física acelerada | °C, % , lúmenes | temperatura, humedad, luz |
| | | Evaluación de actividad Biológica | Formas promastigote Leishmania | Concentración Inhibitoria media IC ₅₀ |

| | | | |
|---|--|--|--|
| Emulsión crema Control de calidad | Actividad biológica Normas técnicas de calidad formas semisólidas Límite microbiano, Irritabilidad dérmica | Parámetros Permisibles UFC, edema Eritema, IC ₅₀ | pH, densidad, sedimentación, extensibilidad, viscosidad Bacterias, hongos, salmonella, S. Aerus, P. Aeruginosa, E. Coli, prueba de parche |
| Lipogel Control de Calidad | pH, densidad, sedimentación, extensibilidad, viscosidad | Parámetros permisibles | Normas técnicas de calidad formas semisólidas |
| | Límite microbiano, Irritabilidad dérmica Actividad biológica | UFC, edema Eritema, IC ₅₀ | Bacterias, hongos, salmonella, S. Aerus, P. Aeruginosa, E. Coli, prueba de parche |

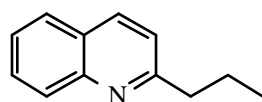
2. MARCO TEORICO

El binomio fundamental de PLANTA en herbolaria (natural) (O MEZCLA DE PLANTAS) + INDICACIÓN TERAPÉUTICA = MEDICAMENTO; emanado de las normativas de la Comunidad Económica Europea y la Ley de Medicamento en su sección IV con el título de Medicamentos de plantas medicinales, publicado en Diciembre de 1990 en España, señala que aquellas plantas (sus mezclas y / o sus derivados) que se ofrezcan explícitamente para la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad serán consideradas medicamentos – en cualquiera de las modalidades que la propia Ley contempla: especialidad, preparación oficial y fórmula magistral - y deberán cumplir con las exigencias requeridas a éstos. Entonces, uno de los problemas que se plantean en la utilización terapéutica de las plantas medicinales radica en la elección apropiada de sus distintas

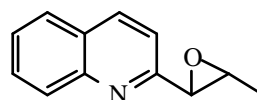
formas de elaboración y presentación, todo ello sugiere la necesidad imperiosa de profundizar en la investigación de los aspectos farmacológicos y galénicos de la Fitoterapia, al objeto de establecer las formas de aplicación óptimas para cada especie vegetal y poniendo a disposición de los pacientes, medicamentos eficaces y seguros (19).

La Farmacopea Tradicional Boliviana, dentro de las Normas para Medicamentos Naturales Tradicionales y Homeopáticos, señala a la especie (*Galipea longiflora*) “Evanta” como una planta con actividad *Leishmanicida* con valor etnofarmacológico, usado por el grupo étnico “Chimanés”, esta actividad Leishmanicida se debe a la presencia de 13 alcaloides quinolínicos presentes en la corteza, raíces y hojas, sus moléculas activas son quinolinas, cuatro de estas se denominan chimaninas (A,B,C y D) en homenaje a la etnia Chimané y están protegidas mediante una patente internacional (IBBA / ORSTOM .1990-1992).

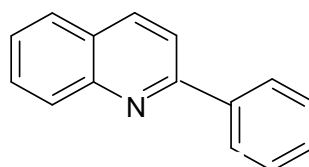
De la corteza de *Galipea longiflora* se han aislado 9 alcaloides quinoleícosⁱ, siendo la 2- fenilquinolina y la Chimanina D (presente en las hojas), los más activos frente a las formas promastigote y amastigotes de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania venezuelensis* y *Leishmania donovani* (15).



2-n-propilquinolina



Chimanina D



2-Fenilquinolina

2.1. DESCRIPCIÓN BOTANICA Y QUIMIOSISTEMÁTICA DEL GÉNERO ANGOSTURA LONGIFLORA KRAUSE KALLUNKU “EVANTA”

La *Angostura longiflora* Krause, es conocida con el nombre de “Evanta o yuruma huana epuna” (20).

Es un arbusto o árbol de 10 a 15 m de altura difusamente ramificado, de madera muy dura, corteza frecuentemente pálida, presenta hojas trifoleadas alternas o superpuestas

sobre la misma rama, conocida en Bolivia en las selvas tropicales de los Yungas, en los departamentos de La Paz y Beni (21, 22).

2.1.1. Clasificación Taxonómica (Killen y col. 1993)

| Reino : Vegetal | |
|-----------------------|--|
| División | : Magnoliophyta |
| Sub clase | : Rosidae |
| Orden | : Sapindales |
| Familia | : Rutáceas |
| Género | : Galipea |
| Especie | : longiflora krause |
| Sinónimo | : Angostura longiflora (Kallunki pirani,1998) |
| Nombre común | : Yuruma huana epuna |
| Usos tradicionales | : leishmanicida, antianémico |
| Vermífugo y amebicida | |

Fuente: Killen y col. 1993, "Guía de árboles de Bolivia"

2.1.2. Caracteres Generales

El reconocimiento vegetal del género *Galipea* es generalmente por la puntuación glandulosa, con olor a cítrico, caracterizado por sus troncos y hojas espinosas. Las hojas varían de simples a unifoliadas, compuestas, palmadas, pinnatifoliadas o bipinnatifoliadas, opuestas o alternas aún en el mismo género.

Las flores varían de pequeñas y uniformes hasta alargadas con pétalos blancos o rojos. Los frutos pueden ser pequeños, bayas redondas grandes y carnosos con pulpa comestible (23).

La especie *Galipea longiflora* Krause presenta flores de mayo a junio y frutos de junio a julio, en los bosques húmedos de llanos y montaña, se caracteriza el género como compuestos de árboles pequeños o arbustos, hojas alternas u opuestas, flores encima, panícula o racimos, el fruto una cápsula esquizocárpica (21).

Las moléculas descubiertas son quinolínas (compuestos de la familia de la quinina). A nivel del segundo átomo de carbono lleva (una cadena de tres carbonos cadenas

alquílicas o arílicas). Cuatro fueron denominadas Chimaninas (A,B,C,D), éstas moléculas son características de la Rutáceas especialmente del género *Galipea* (15).

2.2. LEISHMANIASIS

Son infecciones humanas producidas por protozoarios del género *Leishmania*, sus formas clínicas son: lesiones a nivel cutáneo, mucocutáneo y visceral). Estas infecciones son transmitidas por la picadura de un insecto vector: el flebótomo, cuya hembra es la única que transmite el parásito. La enfermedad se conoce con el nombre de “lepra blanca”.

Morfológicamente la *Leishmania* se presenta en 2 formas:

- Promastigote: Forma móvil flagelada que se encuentra en el vector.
- Amastigote: Forma inmóvil intracelular no flagelada, se encuentra en el hombre y mamíferos (24).

2.2.1. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud señala que en todo el mundo existen 1.500.000 personas afectadas por las diversas formas de Leishmaniasis con incidencia de 600.000 casos nuevos declarados cada año, distribuidos en 88 países (14).

En Bolivia la enfermedad prevalece en las llanuras amazónicas hasta la cordillera andina oriental (15). Sin embargo Muñoz (16) detalla la incidencia en los departamentos de Pando, Beni, La Paz (en provincias Nor y Sud Yungas), en Santa Cruz (Chiquitos y Ñuflo de Chávez), Cochabamba (Chapare) y Chuquisaca (Acero).

En Bolivia, la especie de *Leishmania brasiliensis* que provoca la lesión conocida como “Espundia” es considerada la más importante y es el parásito más frecuentemente aislado en lesiones humanas en América de Sur, la gravedad del tipo de Leishmaniasis que produce esta especie, es el riesgo de evolución hacia lesiones metastásicas en mucosas en un 2 – 7% de los pacientes, en un tiempo variable de 6 meses a 30 años, después de la lesión primaria (25).

Las diferentes cepas de *Leishmania* se clasifican de acuerdo a la patología que producen: Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis mucocutánea y Leishmaniasis visceral.

CUADRO Nº 1
Clasificación de la Leishmaniasis y Leishmania

| Leishmaniasis Cutánea | Leishmaniasis Mucocutánea | Leishmaniasis Visceral |
|--------------------------|------------------------------|---------------------------|
| <i>L. Trópica</i> | <i>L. mexicana</i> | <i>L. donovani</i> |
| <i>L. major</i> | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. infantum</i> |
| <i>L. aethiopica</i> | <i>L. braziliensis</i> | <i>L. chagasi</i> |

Desjeux y Torres han aislado e identificado de 1982 a 1988, dos cepas de *Leishmania*: *Leishmania (V) braziliensis*, en la región amazónica que es agente de la Leishmaniasis Cutáneo Mucosa (LCM) y *Leishmania (L) amazonensis* agente de Leishmaniasis Cutánea (LC) y Cutáneo Difusa (LCD) ; a partir de un caso humano en el Departamento de Santa Cruz (14, 24).

Se ha registrado 6 casos de Leishmaniasis visceral en Bolivia en el Departamento de La Paz (Yungas) además de Leishmaniasis canina. El flebótomo peridoméstico predominante es *Luxomia longipallis* que se ha encontrado infectado naturalmente en 0,2 a 4,0% de los ejemplares examinados (17).

2.2.2. Quimioterapia y Tratamiento Tradicional

El tratamiento que se da para la Leishmaniasis cutánea y la Leishmaniasis mucocutánea es usando derivados pentavalentes de antimonio, Glucantime, anfotericina B, Aminosidina, SSG (Pentostam^R). Todos estos medicamentos producen efectos secundarios que muchas veces no son tolerados por el paciente, además de su elevado costo (15).

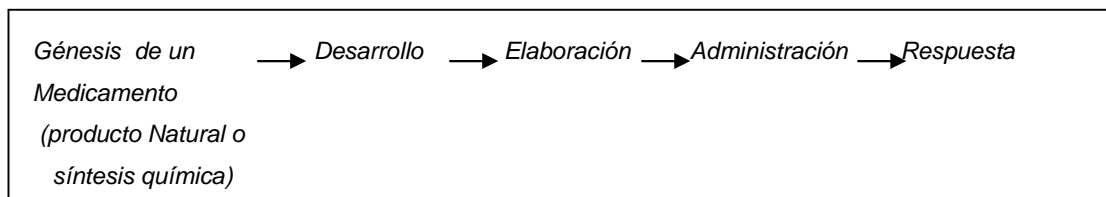
En nuestro País, donde la Leishmaniasis es endémica, la infraestructura sanitaria inapropiada, además del elevado costo del tratamiento, ha obligado a los comunitarios usar diferentes especies vegetales para combatir la enfermedad y las formas de aplicación son:

sobre la piel cataplasma de las hojas. Por la información recolectada de los Chimanés se ha descrito 3 plantas utilizadas en las diferentes formas de Leishmaniasis, donde se utilizan en forma de cataplasma la corteza de los troncos molida, las cuales son: *Galipea longiflora* (Rutáceae), *Pera benensis* (Euphorbiaceae) y *Ampelocera edentula* (Ulmaceae) (26).

2.3. DESARROLLO DE FORMAS FARMACÉUTICAS

La finalidad de la disciplina denominada como: Farmacia Galénica es la transformación de drogas y principios activos en medicamentos fácilmente administrables al organismo y que proporcionen una adecuada respuesta terapéutica.

La problemática del medicamento se puede representar en el siguiente esquema donde se señala las fases más significativas:



Según Cadórniga, se puede comprender que existen 3 áreas que configuran la preparación y manipulación de los medicamentos: área química, área tecnológica y área biológica (27).

El proceso de transformación de un principio activo en medicamento implica la incorporación de una serie de sustancias auxiliares, denominadas excipientes, y de una serie de procesos que a su vez están constituidos por operaciones llamadas: operaciones unitarias u operaciones básicas.

Los excipientes son sustancias o mezclas de sustancias que por sí mismas no tienen actividad farmacológica pero que usadas conjuntamente con un principio activo, facilitan la preparación y empleo del medicamento, además también posibilita la obtención de una determinada forma de dosificación o forma farmacéutica, estos excipientes además ayudan a mantener la integridad del principio activo (27).

2.3.1. Estudios de preformulación

Son etapas que se deben seguir para la obtención de un medicamento seguro y eficaz. Esto abarca el conocimiento de las características básicas tanto biofarmacéuticas como fisicoquímicas, que influirán en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento.

CUADRO Nº 2
ASPECTOS QUE AFECTAN EN EL DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO

| CONSIDERACIONES PREVIAS | |
|---|-----------------|
| Propiedades Farmacodinámicas: | |
| Finalidad terapéutica | Efectos tóxicos |
| Reacciones adversas | Dosis |
| Características farmacocinéticas | |
| Frecuencia de administración | |
| Características de los enfermos a los que se dirige: | |
| Aceptación y comodidad del medicamento | |
| Coste del medicamento | |
| | |

| CONSIDERACIONES BIOFARMACÉUTICAS | |
|---|-----------------|
| Biodisponibilidad | |
| Vía de administración | |
| Características biofarmacéuticas de la formulación | |
| CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOTÉCNICAS | |
| Cristalinidad y polimorfismo | Estabilidad |
| Punto de Fusión | Compactabilidad |
| Solubilidad | |
| Fluidez | |

Fuente: VILA, J.L.(2001). Tecnología Farmacéutica, Vol. II. Madrid. Ed. Síntesis

2.3.2. Metodología para el estudio de Plantas Medicinales como Materia Prima Farmacéutica

La siguiente guía metodológica es publicada por el Ministerio de Salud Pública de Cuba y Dirección de Ciencia Técnica (Abril,1998)

CUADRO Nº 3 METODOLOGIA PARA ESTUDIAR PLANTAS MEDICINALES COMO MATERIA PRIMA

| Etapa 1.- Caracterización Fitoquímica Preliminar | Contempla la Revisión bibliográfica que permite la identificación botánica de la planta a estudiar y su composición. Tamizaje fitoquímico que es una investigación preliminar química, para determinar |
|---|--|

| | |
|---|--|
| | principales grupos químicos que presenten reacciones generales lo suficientemente sensibles como para ser utilizadas en pequeñas cantidades en los medicamentos. |
| Etapa 2.- Establecimiento de las especificaciones de calidad del material vegetal y de sus extractos | El reconocimiento del compuesto debe ir gradualmente dirigido hacia la especificidad de los métodos de extracción y caracterización. Una vez reconocido el metabolito responsable de la actividad farmacológica, se desarrollará un método de análisis químico que nos permita cuantificar el mismo, técnicas tales como: volumétricas, cromatográficas y espectrofotométricas, que cumplirán con los criterios de validación de un método analítico. |
| Etapa 3.- Establecimiento de las especificaciones de calidad del fitomedicamento | Esta etapa contempla todos los aspectos importantes de la calidad de los fitomedicamentos en conformidad con las prácticas adecuadas de fabricación, donde se determinará la forma farmacéutica más aconsejable de acuerdo con el uso terapéutico para el cual se destine, luego se procederá a desarrollar los métodos analíticos que permitan establecer las especificaciones de calidad del medicamento con vistas a su normalización y registro, una vez que se haya desarrollado el proceso tecnológico adecuado para la elaboración del mismo. |
| Etapa 4.- Aislamiento y elucidación estructural del principio activo | Esta etapa de profundizar el conocimiento del principio activo y / o de la elucidación de la estructura química se ejecutará si se considera de interés por los resultados alcanzados y por la factibilidad del mismo. |

Fuente: Guía metodológica para Investigación Fitoquímica en plantas medicinales (12)

2.3.3. Estudios en Producto semi terminado

2.3.3.1. Metodología para el Desarrollo de las Investigaciones Tecnológicas en Formas Farmacéuticas terminadas

La siguiente guía metodológica es publicada por el Ministerio de Salud de Cuba y Dirección de Ciencia Técnica (Abril, 1998).

CUADRO Nº 4
METODOLOGÍA PARA DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN
TECNOLÓGICA EN FORMAS FARMACÉUTICAS TERMINADAS

| | |
|---|---|
| Etapa 1.-Revisión Bibliográfica | Comienza con una revisión de la literatura relacionada con el tema a desarrollar. |
| Etapa 2.- Estudios de preformulación | Estudios de las características físico químicas del o de los fármacos que componen la fórmula a desarrollar Estudios de compatibilidad (principios activos- sustancias auxiliares, principios activos – envase y sustancias auxiliares – envase) Concepción y desarrollo del método analítico a utilizar en el diseño de formulación. |
| Etapa 3.- Estudios microbiológicos | Comprobar la resistencia a la contaminación microbiana. |
| Etapa 4.- Estudios Biológicos | Se realizaran pruebas preliminares toxicológicas, crónicas y agudas de irritabilidad dérmica y oftálmica si así se requiere, además de otros ensayos como sustancias presoras y toxicidad indebida que |

| | |
|---|--|
| | aparecen reportados en farmacopeas para algunos preparados inyectables. |
| Etapa 5.- Estudios tecnológicos de formulación | Comprobación de la fórmula y la técnica de preparación concebida Estudios de estabilidad de la forma farmacéutica en el tiempo. |
| Etapa 6.- Estudios de estabilidad química del principio activo en la formulación | Del o de los principios activos que componen la fórmula, utilizando el método acelerado(isotérmico) durante 6 meses y el método de vida de estante por lo menos 1 año si es que no se hizo el acelerado, además de métodos estadísticos se utilizarán en vida de estante, para abreviar el tiempo de estudio y predecir la fecha de vencimiento. |
| Etapa 7.- Comprobación de la estabilidad microbiológica seleccionada en función del tiempo | Comprobación de la efectividad antimicrobiana del agente o sistema de agentes antimicrobianos. |
| Etapa 8.- Comprobación del comportamiento biológico de la formulación en función del tiempo | Analizar si los estudios biológicos realizados con la formulación en estudio en la etapa de preformulación, es conveniente efectuarlos con la formulación seleccionada. |
| Etapa 9.- Verificación del método analítico desarrollado, utilizando la formulación en estudio | Verificación del o de los métodos analíticos desarrollados para controlar la calidad del producto. |
| Etapa 10.- Escalado piloto | Consiste en elaborar 1 ó 3 lotes del medicamento que se propone, en un volumen no menor del 10% del tamaño del lote que se pretende fabricar a nivel industrial. |
| Etapa 11.- Pruebas clínicas (ensayo clínico, biodisponibilidad, | Se realizará en aquellos medicamentos que lo necesiten como requisito para la aprobación de su registro. |

| bioequivalencia) | |
|--|--|
| Etapa 12.- Escala Industrial | Debe ser de 3 lotes, se debe tomar muestras suficientes para utilizarlas en el estudio de vida útil del medicamento. |
| Etapa 13.- Confección y presentación del expediente de Registro de Medicamentos | Se realizará con toda la información recopilada generada durante el cumplimiento de todas las etapas de investigación anteriormente descritas. |

Fuente : Guía metodológica para Investigación Fitoquímica en plantas medicinales (12)

3. DISEÑO METODOLÓGICO

La metodología empleada cumple las especificaciones para medicamentos a base de preparados vegetales, Normas técnicas y procedimientos para formas farmacéuticas semisólidas, Guía metodológica para investigación fitoquímica en plantas medicinales, Norma oficial Mexicana NOM-039-SSA1,1993, Norma Cubana NC90-13-13, NRSP312 y NRSP309,1992, Técnicas y procedimientos en formulaciones magistrales dermatológicas y aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos “estudios de preformulación”.

Todos los reactivos químicos utilizados son de línea “Biopack”, los solventes se purificaron por destilación con ebullición controlada, los medios de cultivo utilizados son de Laboratorio “Britania”, las estufas de secado y cultivo son de marca “Faeta” Argentina.

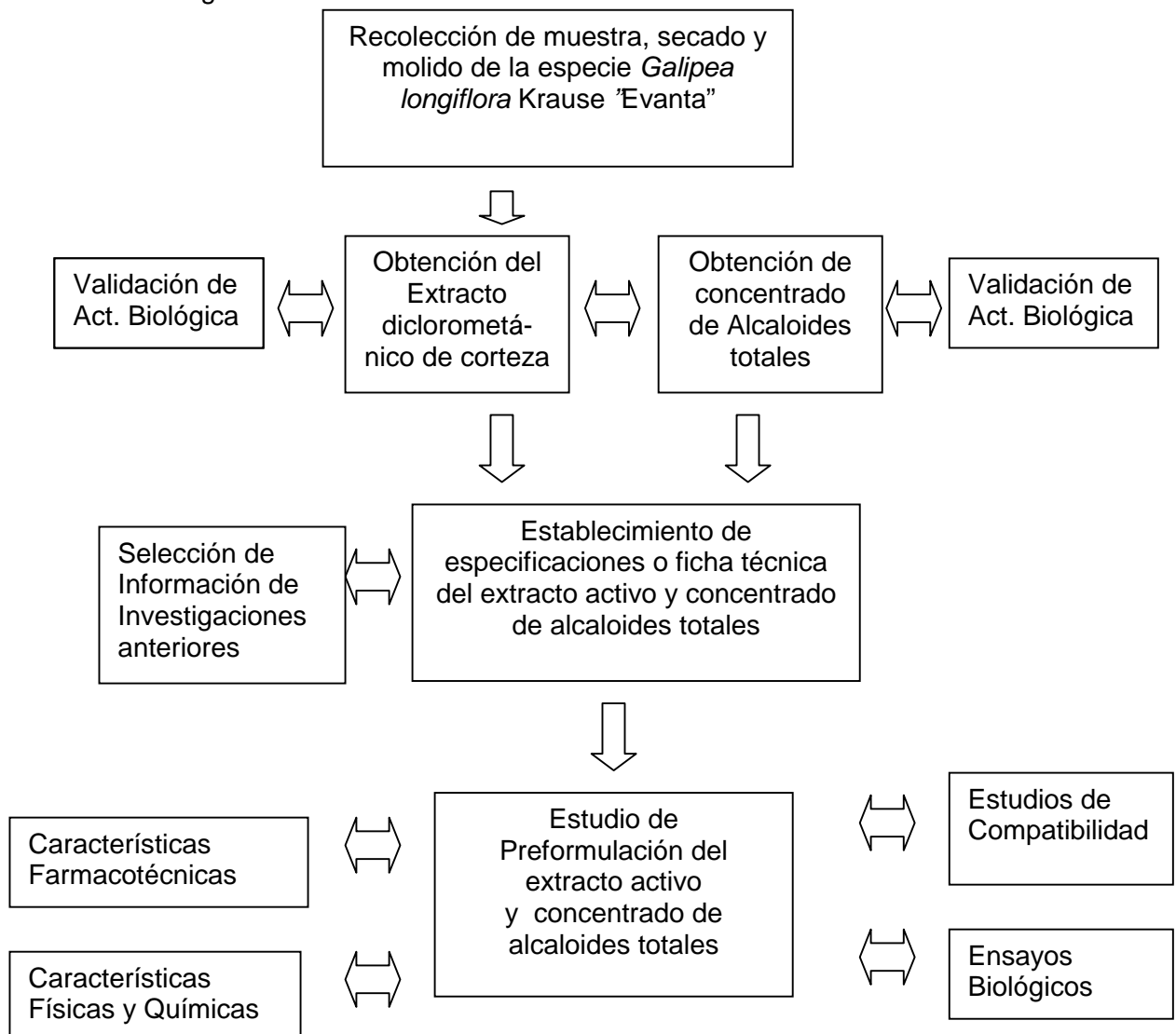
3.1 Materiales, reactivos y equipo

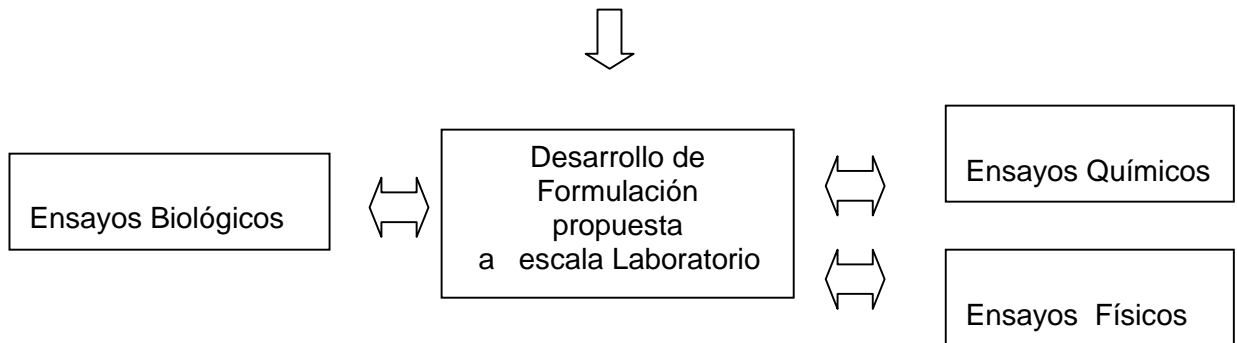
| | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Medio de cultivo Agar Nutritivo | Alcohol cetílico, estearílico |
| Medio de cultivo Agar Saboraud | Vaselina sólida, glicerina |
| Dimetil sulfóxido p.a. | Laurilsulfato de sodio |
| Caldo peptonado, tetracionato | Propilénglicol |
| Agar Manitol, cetrimide, makonkey | Propilparabeno |
| Agar salmonella y shiguella (SS) | Metilparabeno |
| Gentamicina | Ácido Etilendiamin tetracético |

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Diclorometano, éter de petróleo | Carbopol 940 |
| Trietanolamina | Aceite de oliva |
| Polisorbato 80 | Agua destilada |
| Estufas | Autoclave |
| Balanza analítica | Rota evaporador |
| Cámara de flujo laminar | Espectrofotómetro UV/ VIS |
| Termómetro | Cajas petri |
| Placa de cultivo microplaca TC24 | Micro pipetas de 50, 200, 1000 uL |
| Tips para micropipetas | Probetas graduadas |
| Tubos de ensayo | Matraces Erlen meyer |
| Viales de vidrio | Percoladores acero inox. |
| Espátulas | Baño María, baño de arena |
| Viscosímetro de Brokfield | Potenciómetro Metrohm Herisau E 510 |
| Sol. 0,1N y 1N ácido clorhídrico | Sol. 0,1N hidróxido de sodio |
| Acetato de etilo | cromatoplaca |
| Refractómetro | Cámara para estabilidad controlada |
| Reactivo Fischer | Picnómetro |
| Materiales de vidrio aforados | Filtro millipore Swinnex-25 |

3.2. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

El proceso que se siguió para el desarrollo de las formulaciones propuestas fue el siguiente:





3.3. Estudios fitoquímicos

3.3.1. Recolección de muestra, secado y molido

La colecta de la planta en estudio, se hizo de diferentes regiones del norte de La Paz, provincia Iturralde y el Beni provincia Ballivián, perteneciente a la región Amazónica Andina (28). Se colectó de tres áreas que pertenecen al parque Nacional Madidi Beni, Santa Rosa de Maravillas (ubicada a 75 Km de San Buenaventura) y comunidad Santa Rosa de Maravillas en (Agosto 2004), se hizo el reconocimiento del lugar por un grupo calificado del I.I.F.B., entrenado para este fin y comunarios originarios de la zona de las poblaciones o manchas. Se eligieron regiones al azar y se tomaron coordenadas con GPS, la identificación morfológica y taxonómica de la *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae) se hizo en el Herbario Nacional de La Paz, donde se encuentra registrada como AS49, Caquiahua, SD17, Santa Rosa de Maravillas.

El secado de la planta se realizó en ambientes adecuados y temperatura ambiente, el molido de la corteza (muestra) en un molino de cuchillas.

3.3.2. Preparación del extracto

Para el estudio se utilizó la corteza molida, se sometió a maceración en percoladores de acero inoxidable 316 L, con (CH₂ Cl₂) purificado por destilación con ebullición controlada por 72 horas, a temperatura ambiente, luego se filtró y se evaporó en un rotavapor "Laborata 400 Heidolph" a 25 °C hasta sequedad. (Unidad Fitoquímica- IIFB, 2005).

3.4. Estudios biológicos

Los extractos han sido evaluados en la unidad de quimioterapia experimental de parasitología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas I.I.F.B.

3.4.1. Valoración Actividad Biológica (in vitro)

En la valoración de la actividad biológica, se utilizó formas promastigotes de *Leishmania*: *L. donovanni*: (MHOM/ 74/ PP75), *L. braziliensis*: (MHOM/ BR/ 75/ M2903) y *L. amazonensis* : (IFLA/ BR/ 75/ PH8), técnica estandarizada por la unidad de quimioterapia experimental y parasitología I.I.F.B.(2004) (29)

3.5. Estudio químico

3.5.1. Extracción de alcaloides de la corteza con Ácido clorhídrico

El procedimiento de optimización para la extracción de los alcaloides quinolínicos de la Evanta (*Angostura longiflora* Krause Kallunki) se encuentra en proceso de publicación como artículo, en la revista BIOFARBO Órgano Oficial del colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia.
(Unidad de Fitoquímica; I.I.F.B. 2005)

3.5.2. Estudio cromatográfico

Las muestras del extracto de corteza y concentrado de alcaloides quinolínicos que para este estudio se utilizaron como materia prima o principio activo en las diferentes etapas del estudio, fueron sometidas a cromatografía en capa fina utilizando como sistema de elución (éter de petróleo – acetato de etilo) (90 – 10), la muestra se aplicó a la cromatoplaqueta previamente disuelta en diclorometano, se dejó secar a la corriente de aire y se observó bajo una lámpara UV 254-366nm.

Para lecturas al espectrofotómetro se preparó concentraciones de (0,0133 mg / mL) de muestra en solución 0,1N de ácido clorhídrico, y se leyó en cubetas de cuarzo al espectrofotómetro UV / VIS marca "CINTRA 5 GBC" a longitud de onda de 234 y 262 nm. Como referencia se utilizó el mismo extracto diclorometánico como tal, y el concentrado de alcaloides quinoleínicos, muestras que no fueron sometidas a ningún stress físico y fueron resguardadas a la luz, con los que se hizo una curva de calibración (Unidad de Fitoquímica, I.I.F.B. 2005).

3.6. Estudios de preformulación

3.6.1. Características Farmacotécnicas del extracto activo y concentrado de Alcaloides quinoleínicos

3.6.1.1. Caracteres organolépticos

Las Determinaciones se hicieron en base a la norma NRSP 312 para extractos fluidos y tinturas (30).

Como parámetro de referencia se empleó el mismo extracto diclorometánico y concentrado de alcaloides quinoleínicos, que no fueron sometidas a ningún stress físico y se resguardaron a la luz.

3.6.2. Características Físicas

3.6.2.1. Determinación de Sólidos totales

Determinación en base a la Guía metodológica para Investigación fitoquímica en plantas medicinales y la Norma 309 para Medicamentos de origen vegetal (12, 31).

3.6.2.2. Estabilidad piloto acelerada del extracto activo y concentrado de alcaloides quinoleínicos

Para esta fase se utilizó cromatografía en capa fina TLC, lámpara UV 254 – 366nm, el sistema de elución fue: éter de petróleo – acetato de etilo (90 – 10) respectivamente y las lecturas al espectrofotómetro UV / VIS marca CINTRA 5 GBC, con lecturas a 234 y 262 nm de longitud de onda.

Cada mes se extrajo de las muestras una determinada cantidad, para someterla a los diferentes estudios.

Para estabilidad a la luz, temperatura y humedad se utilizó la cámara- estufa marca BINDER modelo KBWF 720 de laboratorios INTI.

3.6.2.3. Estabilidad a la temperatura y humedad

En un vial de vidrio transparente sin tapa, se introdujo 0,5 g. del extracto y en otro 0,5 g. del concentrado de alcaloides, se colocó en una estufa a temperatura de 45°C a una humedad de 75% por el lapso de 3 meses.

Como referencia se pesó 0,5 g. de cada muestra en viales de vidrio, se sellaron las tapas y se conservaron a 4°C en el refrigerador, por 3 meses.

Los resultados se compararon con los obtenidos de las muestras conservadas a 4°C en el refrigerador y con la muestra de referencia que no fue sometida a ningún stress físico y se resguardo de la luz, el estudio se realizó, a los tres meses.

(Unidad de Fitoquímica, I.I.F.B. 2005)

3.6.2.4. Determinación del contenido de agua: Humedad

Se determinó por el método químico de valoración Karl Fischer, semi micro determinación de cantidades de agua por debajo del 0.1%, acorde a las farmacopeas USP y Española (Laboratorios INTI).

3.6.2.5. Determinación de Refractometría y Residuos Sólidos

La determinación se realizó en Laboratorios INTI, para tal caso se utilizó un refractómetro, se preparó la muestra a una concentración de 2,66 mg/ mL en solución 0.1N de ácido clorhídrico, 1 mL de la solución muestra se colocó sobre la placa del refractómetro y se realizó la lectura, la numeración superior corresponde al valor del índice de refracción (ND) y la numeración inferior corresponde a la lectura de residuos sólidos.

3.6.2.6. Estabilidad a la Luz

La muestra separada para el estudio de estabilidad a temperatura y humedad señalada en el punto (3.6.2.3), se expuso a luz ultra violeta, dentro de una cámara de estabilidad a temperatura controlada de 45°C y humedad de 75% (Laboratorio INTI).

Para lectura al espectrofotómetro y cromatografía en capa fina, se procedió con la misma técnica que se describe en el punto (3.5.2).

El estudio se realizó a los 3 meses, comparando con la muestra de control oscuro (Unidad de Fitoquímica, I.I.F.B. 2005).

3.7. Estudios de Compatibilidad

Para este propósito se evaluaron en muestras de emulsiones cremas y lipogel, preparadas a partir del extracto activo y concentrado de alcaloides, paralelamente con los estudios de estabilidad en producto terminado, donde se analizó las posibles interacciones y cambio de fases.

3.8. Estudios en Producto semi terminado “Emulsión Crema y Lipogel”

3.8.1. Metodología de elaboración para “emulsión crema y lipogel “

La preparación de las muestras fue a escala laboratorio, por tanto el material utilizado en la preparación de la emulsión crema y lipogel, fueron vasos de acero inoxidable de 250 cc, probetas de vidrio, espátulas de plástico, termómetro, hornilla eléctrica y balanza electrónica.

Emulsión crema

- Se pesó exactamente todas las materias primas por separado, fase oleosa y fase acuosa.
- Se calentó la fase oleosa y acuosa por separado a 70°C.
- Se añadió la fase acuosa lentamente a la fase oleosa, en agitación e inmediatamente se incorporó el extracto activo ó el concentrado de alcaloides quinoleínicos previamente calentado a una temperatura de no más de 30°C, y se agitó constantemente hasta el enfriamiento.

Lipogel

- Se pesó exactamente todas las materias primas por separado, fase oleosa y fase acuosa.

- En un vaso de precipitado se dejó en reposo durante una hora, el carbopol en agua destilada.
- Se calentó por separado ambas fases a 70 °C.
- Una vez disuelto el carbopol, se añadió la fase acuosa a temperatura determinada agitando lentamente, luego la fase oleosa junto con el extracto activo ó el concentrado de alcaloides quinoleínicos previamente calentado a una temperatura de no más de 30°C, finalmente se añadió la trietanolamina y se completó el resto con agua destilada, se mezcló sobre baño de agua fría hasta que tomó consistencia.

3.8.2 Ensayos Físicos en producto semi terminado

3.8.2.1. Determinación de las características Organolépticas

Determinación en base a la Norma NRSP 312, MIN SAP - Cuba (30).

3.8.2.2. Determinación de pH

Se hizo la lectura en un potenciómetro calibrado marca "Metrohm Herisau E 510" (Laboratorio INTI) (33).

3.8.2.3. Determinación de la densidad

Se utilizó un pequeño picnómetro de vidrio, donde se introdujo la muestra semisólida, se tapo y se pesó.

Se registró el peso del picnómetro vacío

Se registró el peso del picnómetro más la muestra

Se registró el peso del picnómetro más agua

Y se realizó el cálculo.

(Laboratorio INTI).

3.8.2.4. Determinación de Viscosidad "Brookfield"

Se utilizó el viscosímetro de Brookfield, modelo LVF serie 57822 para esto se tomó una probeta de vidrio y se llenó con la muestra + / - unos 200 cc , se eligió el husillo o aguja más adecuada, de tal manera que la lectura no salga de los parámetros, se utilizó la aguja N° 4 , el ensayo se inició con la menor velocidad, se dejó rotar durante 3 minutos y se tomó la lectura y así sucesivamente hasta la velocidad mas alta, luego se dejó reposar durante 15 minutos y se realizó nuevamente el ensayo en sentido inverso, de la velocidad mayor a la menor, se realizó los cálculos y se construyó la gráfica de viscosidad aparente, esfuerzo de corte vs velocidad de deformación.

Para realizar la gráfica o reograma se hizo los siguientes cálculos:

Se hizo la conversión de rpm a radianes

Para el cálculo del esfuerzo de corte se utilizó la siguiente relación:

$$t = 2 \mu \times \left[\frac{1}{1-k^2} \right]$$

t = esfuerzo de corte

μ = viscosidad calculada por el equipo

= radianes

$$k^2 = R / r \quad , \quad y = t / \mu$$

R = radio de probeta

r = radio del husillo

y = velocidad de deformación

3.8.2.5. Determinación del tipo de emulsión

Se cargó un vaso de precipitación con 30 mL de agua destilada, se añadió 1 g de la muestra semisólida, se agitó levemente y se observó, si la emulsión se

difunde en el agua, la emulsión es fase externa acuosa (o / w), si no se difunde y queda en la superficie, la fase externa es aceite (w / o) (34, 35).

3.8.2.6. Determinación de Extensibilidad

Se marcó los extremos de un portaobjetos sobre un papel milimetrado y se trazó sus diagonales para obtener la intersección como punto central de referencia, se colocó el portaobjetos sobre el papel milimetrado justo donde se marcó los extremos, luego se depositó en el centro unos 25 mg de emulsión, se colocó otro portaobjetos (de peso conocido) suavemente por encima de la muestra, se esperó 1 minuto y se anotó los 2 diámetros del círculo formado, respecto al punto de intersección de las diagonales trazadas, se calculó el valor medio y se dividió entre 2.

Se obtuvo el radio medio del círculo, se siguió el mismo procedimiento a intervalos de 1 minuto, utilizando 2 pesas de 2 g y finalmente 1 pesa de 5 g.

Con los radios obtenidos se calcularon las superficies correspondientes, el ensayo se realizó a temperatura ambiente y por triplicado.

Finalmente se calculó la media de cada grupo de determinaciones y se realizó la gráfica de extensibilidad, en el eje de ordenadas se situó los valores medios de extensibilidad y en el eje de las abscisas, los distintos pesos situados en el portaobjetos superior (35,40)

3.8.2.7. Controles de estabilidad piloto acelerada

Test de estabilidad acelerada, de acuerdo a las Normas ICH y los esquemas propuestos en el trabajo “ Diseño y Formulación de emulsiones” elaborado por la Q.F.MSc. Ponce D’León.L.F. y Q.F. Rodríguez . H. A.

Se hizo una parte en laboratorio INTI y la otra parte en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

3.8.2.7.1. Test de Estabilidad Física acelerada

- La emulsión no debe presentar signos visibles de separación de las fases dentro de 60 a 90 días cuando se almacena entre 45°C y 50°C.
- El tiempo de estabilidad debe incrementarse entre 5 y 6 meses, cuando la temperatura de almacenamiento es de 37°C.
- El producto no debe presentar signos de inestabilidad después de un mes de almacenamiento a 4°C.
- Una emulsión debe resistir por lo menos de 6 a 8 ciclos de calentamiento (45°C) y enfriamiento (refrigerador), manteniendo el producto por no menos de 48 horas en cada condición.
- Una emulsión aceptable no debe presentar serios signos de inestabilización cuando se somete a centrifugación entre 2000 a 3000 rpm.

Durante el período de los ensayos descritos, las muestras se observaron cuidadosamente y se evaluaron los siguientes parámetros:

- ✓ Cambio en la viscosidad
- ✓ Recuento microbiano
- ✓ Cambio de inestabilidad física, mediante el indicador cualitativo (cromatografía en capa fina)
- ✓ Aspecto (36).

Para lecturas al espectrofotómetro, se preparó concentraciones de 0,013 mg / mL de las muestras semisólidas, se añadió un medio ácido para separar las fases, luego se filtró por filtro millipore “ swinnex- 25 “ se leyó en cubetas de cuarzo al espectrofotómetro a longitud de onda 234 y 262 nm (Unidad de Tecnología Farmacéutica- I.I.F.B. 2005).

3.9.3. Ensayos Biológicos

3.9.3.1. Límite microbiano

3.9.3.1.1. Determinación cualitativa de bacterias

Se tomó 2 mg de muestra semisólida y se diluyó en 500 uL DMSO (dimetil sulfoxido).

Se preparó 15 mL de medio de cultivo agar Nutritivo (según prospecto del envase), luego de sacar del autoclave, se esperó que se atempere a 45°C, se añadió inmediatamente la muestra diluida, se mezcló y se vació en cajas petri (estériles) de un diámetro de 10 cm aproximadamente, se dejó solidificar el medio y finalmente se incubó a 25°C por 48 horas.

El crecimiento bacteriano se evaluó por la formación de colonias (29).

3.9.3.1.2. Determinación cualitativa de hongos

Se tomó 2 mg de muestra semisólida y se diluyó en 500 ul DMSO.

Se preparó 15 mL de medio de cultivo agar Saboraud (según prospecto del envase), luego de sacar del autoclave, se esperó que se atempere a 45°C, se añadió inmediatamente la muestra diluida, se mezcló y se añadió (gentamicina) como antibiótico 75 ul x 100 ml de medio de cultivo, se mezcló y se vació en cajas petri (estériles) de un diámetro de 10 cm aproximadamente, se dejó solidificar el medio y se incubó a 25°C por 7 días (29).

3.9.3.1.3. Ensayo para *Staphilococcus Aureus* y *Pseudomona Aeruginosa*

Se pesó 10 g de muestra, se diluyó en 90 ml de caldo peptonado, se dejó por 24 h a 35°C , para *Staphilococcus aureus* se utilizó agar manitol, luego de 24 horas a 35°C no se observó colonias típicas, para confirmar la ausencia se hizo la tinción de: gram y prueba de la catalasa.

Para *Pseudomona aeruginosa* se utilizó agar cetrimide, para confirmar la ausencia de alguna colonia, se hizo las pruebas bioquímicas: gram, oxidasa (37).

3.9.3.1.4. Ensayo para *Escherichia Coli* y *Salmonella*

Se pesó 10 g de muestra, se diluyó en 90 ml de caldo peptonado, se dejó por 24 h a 35 °C, para *Salmonella* se utilizó caldo tetracionato y agar salmonella shiguella (SS) y luego de 24 h a 35 °C para confirmar la ausencia, se hizo repiques en agar nutritivo y las pruebas bioquímicas: Gram, TSI.

Para *Escherichia coli* se utilizó agar Makonkey, para confirmar la ausencia se hizo las pruebas bioquímicas: Gram, Indol, TSI (37).

3.9.3.2. Estudio Toxicológico in vivo: determinación de irritabilidad dérmica

3.9.3.2.1. Prueba del Parche

Se utilizaron conejos albinos hembras, adultos jóvenes, con un peso no menor de 2 Kg, se aclimataron los animales a las condiciones de laboratorio 5 días antes del ensayo, el acceso a alimento y agua fue *ad libitum*.

Se usó 3 animales para el análisis de las muestras semisólidas.

Un día antes del ensayo se rasuran los conejos en un área de 14 x 10 cm².

Se utilizó 3 sitios por cada muestra, los sitios de aplicación se cubrió con una gasa de 2.5 x 2.5 mm² y se ajustó al animal mediante el empleo de un esparadrapo hipoalérgico. La muestra semisólida se dejó en contacto con la piel por 4 horas. Al final de éste tiempo se removió las paredes y se marcó el sitio expuesto. El material se eliminó con agua, como blanco se utilizó la emulsión crema y lipogel, base (sin bioactivo)

Se anotó la reacción de la piel en cada sitio a las 5, 10, 24, 48, 72 horas después de la remoción del parche (38,39).

3.9.4. Valoración Actividad Biológica (in vitro)

Se evaluó siguiendo el mismo procedimiento de la técnica descrita en el punto (3.2.1.).

4. PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de estudios de preformulación en el extracto activo y alcaloides quinoleinicos

Los estudios se iniciaron con el extracto diclorometánico y concentrado de alcaloides totales que químicamente se denominan: quinolínas alquílicas - arílicas como materia prima, en los cuales se determinaron algunos ensayos que se adecuaron al tipo de muestra vegetal y se diseñó la ficha técnica de especificaciones, tal como se puede ver a continuación

CUADRO Nº 5

CARACTERES ORGANOLÉPTICOS DEL EXTRACTO ACTIVO Y ALCALOIDES QUINOLEINICOS- ARILICOS

| Principio activo | Aspecto | Color | Olor | Sabor |
|--|---|------------|----------|-------------------------|
| Extracto diclorometánico de corteza | Pastoso semisólido con presencia de cristales y líquido | Café pardo | A tierra | Picante amargo aceitoso |

| | | | | | |
|--|---|--------------|------------|----------------|----------------|
| | aceitoso a temperatura de 30°C | | | | |
| Concentrado de Alcaloides totales | Sólido a temperatura de 15°C y aceitoso a temperatura de 30°C | líquido a de | Café claro | característico | Picante amargo |

Como se puede observar en el cuadro N° 5 y 6, las muestras presentan caracteres organolépticos y características físicas diferentes, principalmente en su aspecto.

CUADRO N° 6

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL EXTRACTO ACTIVO Y ALCALOIDES QUINOLEINICOS (ALQUILICOS – ARÍLICOS)

| Determinaciones | Extracto activo orgánico de corteza | Alcaloides Quinoleinicos Alquilicos - arílicos de corteza |
|---|-------------------------------------|---|
| Contenido de agua- Humedad | Karl Fischer 3.1975 % | Karl Fischer 2.3685% |
| Ablandamiento | 25°C | 25°C |
| Sólidos Totales | 8,69 | 4,73 |
| Residuos sólidos | 2, 0 | 0, 9 |
| Refractometría/ índice de Refracción (ND) | 1,3359 | 1,3342 |

Analizando los caracteres organolépticos y físicos, el extracto activo presenta un aspecto pastoso semisólido con cristales muy finos en la superficie y propiedades físicas diferentes tal como se puede ver, además se debe tener muy claro que se trata de un extracto de origen vegetal, diclorometánico cuyo solvente se ha eliminado por rotaevaporación es decir, es una mezcla de alcaloides y otros componentes típicos de un vegetal, sin embargo el concentrado de alcaloides quinoléinicos por el

proceso mismo de extracción y por los tres lavados con solución de ácido clorhídrico hasta obtener la fase orgánica completamente seca por rotaevaporación tiene un aspecto más seco, compacto y duro por eso la variabilidad de sus características organolépticas, si tomamos como parámetro el punto de ablandamiento, no se puede saber a que componente se debe el comportamiento del extracto activo, pues simplemente con el calor de la manipulación ya empieza a cambiar de aspecto convirtiéndose en un líquido aceitoso color café marrón, al igual que el concentrado de alcaloides totales que al tener un aspecto más seco y duro, también se convierte en un líquido aceitoso de similares características.

4.2. Resultados de pruebas biológicas en el extracto activo y alcaloides quinolinicos

En el extracto orgánico de corteza, se comprobó la actividad antiparasitaria *in vitro* frente a promastigotes de tres cepas de *Leishmania*, obteniéndose un IC_{50} entre 82,7 y 101,19 $\mu\text{g} / \text{mL}$

En los alcaloides totales (quinoleínas alquílicas – arílicas) se obtuvo valores de IC_{50} entre 15,9 y 25,8 $\mu\text{g} / \text{mL}$

CUADRO N° 7

Evaluación de la Actividad Biológica in vitro sobre promastigotes de Leishmania en el extracto activo y Alcaloides quinoleínicos

| Nº | Compuesto | LEISHMANIA | | |
|----|--|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | | IC 50 (µg/ml) | | |
| | | PH8(<i>L. amazonensis</i>) | M2903(<i>L. brasiliensis</i>) | PP75(<i>L. donovani</i>) |
| | extracto / Corteza | 101,19 | 82, 69 | 86, 9 |
| | Alcaloides/ Quinoleínas (Alquilicas –Arllicas) de corteza | 15, 9 | 25 | 25, 8 |
| | Alcaloides Totales de corteza (BLANCO) | 21, 8 | 22, 1 | 26, 5 |
| | | | | |

Fuente: Unidad de Quimioterapia Experimental – I.I.F.B.

Como se puede observar la actividad biológica en los alcaloides quinoléinicos frente a tres cepas de *Leishmania*, presentó mayor actividad comparado con el extracto diclorometánico, principalmente frente a la cepa de *L. amazonensis* y con valores incluso menor o igual a la concentración inhibitoria de 50% (IC₅₀) del blanco que se toma como referencia, esto significa que los alcaloides quinoléinicos extraídos del extracto diclorometánico con solución de ácido clorhídrico, son los más adecuados como principio activo para la elaboración de formas farmacéuticas.

CUADRO Nº 8

Evaluación de la Actividad Biológica in vitro sobre promastigotes de Leishmania en Control Oscuro

| Nº | Compuesto | LEISHMANIA | | |
|----|---|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | | IC 50 (µg/ml) | | |
| | | PH8(<i>L. amazonensis</i>) | M2903(<i>L. brasiliensis</i>) | PP75(<i>L. donovani</i>) |
| | Alcaloides totales (quinoleinas) de corteza Control oscuro 6 meses | 26, 6 | 48, 8 | 27, 08 |
| | Alcaloides totales quinoleinas (alquílicas- arílicas) de corteza BLANCO | 21, 8 | 22, 1 | 26, 4 |
| | | | | |

Fuente: Unidad de Quimioterapia Experimental – I.I.F.B.

El concentrado de alcaloides totales de corteza como control oscuro por el lapso de 6 meses presentan muy buena actividad frente a las tres cepas de estudio, especialmente para la cepa *L. amazonensis*, con valores cercanos al IC₅₀ del blanco que se toma como control de referencia.

Con este enfoque es que se tomaron más en cuenta los resultados obtenidos de los alcaloides quinolínicos, además de utilizar como blanco una muestra del mismo, así la evaluación de la actividad biológica a los 6 meses dan como resultado una visión general de su estabilidad, pues analizando y comparando con los resultados a tiempo cero y del blanco, vemos que los valores son relativamente constantes.

4.3. Resultados de estudios de estabilidad acelerada en el extracto activo y alcaloides quinolinicos

4.3.1. Estudios cromatográficos

La placa fina demuestra que aparentemente la elución de las muestras (extracto activo y quinoleinas alquílicas- arílicas) fue uniforme y el valor del factor de retención (Rf) fue reproducible para ambas, el extracto activo con Rf de 0,52 ; 0,33 y 0,19 cm, la distancia de migración del disolvente de 3,6 cm, para las tres manchas de cada una de las muestras.

En los alcaloides quinolínicos el valor del factor de retención (Rf) fue de 0,59, 0,39 y 0,23 cm para las tres manchas de cada una de las muestras, siendo la distancia de migración del disolvente 4,2 cm, tal como se puede observar en las figuras, (Anexo N° 1, Figura N° 3 y 4) por tanto se puede predecir que cualitativamente no hubo cambios en las muestras luego de ser sometidas a los ensayos de estabilidad física acelerada.

Por tanto, la migración de las tres manchas en el extracto activo y alcaloides quinolínicos, demuestra la presencia de tres, de los cuatro alcaloides, que están en mayor concentración, de los 9 alcaloides presentes en la corteza, sin embargo se ha determinado que una mezcla (70/30) del sistema de elución da lugar a una separación más clara de las manchas en la placa cromatográfica.

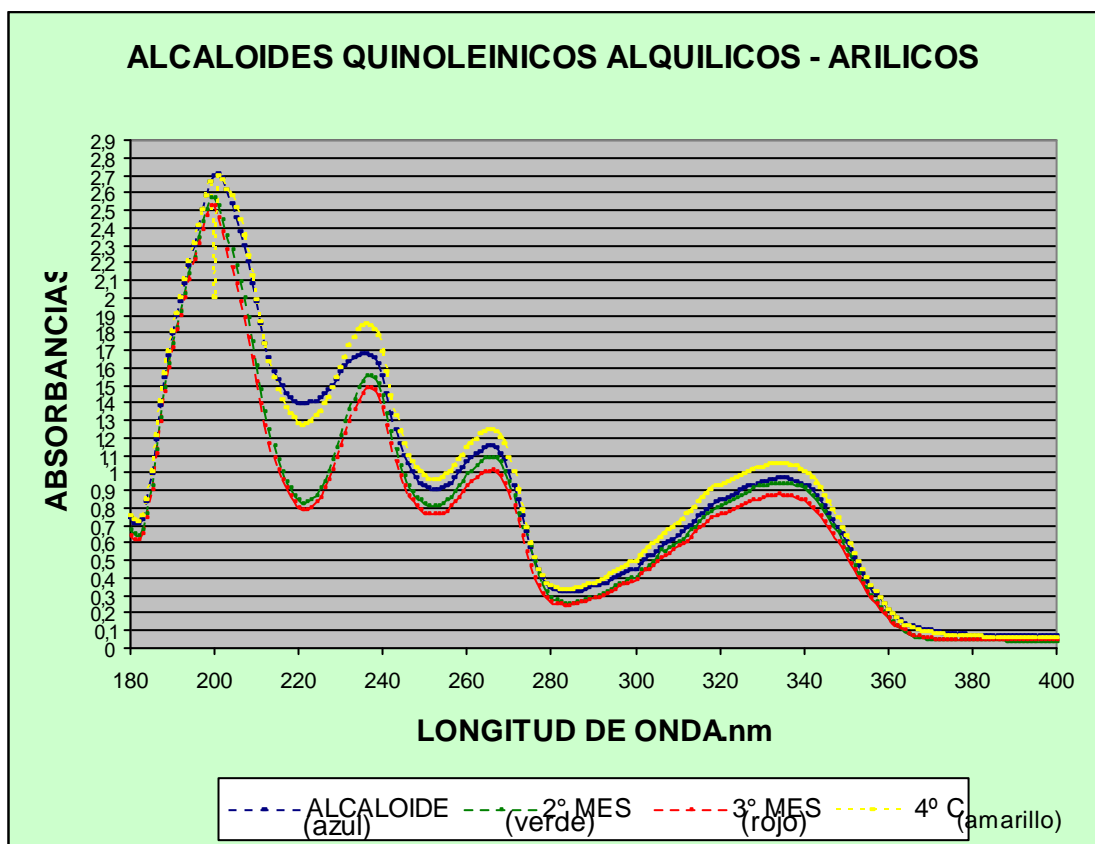
Como es de conocimiento, según revisión bibliográfica, esta planta fue estudiada por investigadores franceses y por el IBBA (Instituto Boliviano de Biología de la Altura) de donde se conoce la presencia de 13 alcaloides quinolínicos presentes en las hojas, corteza y raíces, identificados espectroscópicamente como alcaloides quinolínicos, con sustitución en el carbono 2, de todos estos, 4 alcaloides fueron denominados Chimaninas (A,B,C,D), en la corteza están presentes 9 alcaloides siendo la 2-fenilquinolina la de mayor concentración 47,7% y la Chimanina A en 2,4% (Patente PCT/ FR)/ 00903) (6).

4.3.2. Lecturas al espectrofotómetro

GRÁFICA N° 1

ESTABILIDAD ACELERADA DE ALCALOIDES TOTALES (QUINOLINAS ALQUILICAS- ARILICAS)

La gráfica corresponde al ensayo de estabilidad física acelerada realizada por el lapso de 3 meses, en condiciones de : humedad 75%, temperatura 45°C, en cámara acondicionada para estudios de estabilidad, con lámpara ultra violeta.



Espectros de absorción de alcaloides quinoleínicos: barrido en el intervalo de 180 – 400 nm sobre muestras a (0.013mg / mL)

TABLA N° 1
RESULTADOS DE ALCALOIDES QUINOLÍNICOS
LUEGO DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD

| Alcaloides Quinolínicos | Alcaloides Quinolínicos Control en fase oscuro | Alcaloides Quinolínicos 2º Mes | Alcaloides Quinolínicos 3º Mes | Alcaloides Quinolínicos 4ºC |
|----------------------------|---|---|---|--|
| Absorbancia 234 nm | 1,67 | 1,48 | 1,41 | 1,81 |
| Absorbancia 262 nm | 1,11 | 1,04 | 0,97 | 1,19 |
| Dilución | 0,0133 mg/mL | 0,01331 mg/mL | 0,0135 mg/mL | 0,0136 mg/mL |
| Rendimiento % | | 98,4 % | 101,5 % | 102 % |

Se ha elegido para la lectura de absorbancias las longitudes de onda de 234 y 262 nm, considerando los espectros de absorción de los alcaloides quinolínicos, se ha evaluado la variación porcentual en el tiempo y la temperatura de las muestras.

Los datos del alcaloide quinolínicos al 2º y 3º mes leídos a longitud de onda de 234 y 262 nm, no revela una disminución significativa de los valores de absorción en relación al control en fase oscura lo que significa que no se ha producido ninguna alteración durante los tres meses de control.

Mientras que la muestra sometida a 4º C por el lapso de tres meses tampoco revela un aumento significativo de la absorción a las longitudes de onda de 234 y 262 nm y en todo el intervalo del espectro considerado, tal como se puede observar en la gráfica N° 1 las tres muestras mantienen el mismo perfil a través del tiempo, lo que denota que no hay alteración (descomposición) de los alcaloides quinolínicos.

Para el cálculo de rendimiento porcentual se utilizó la siguiente relación:

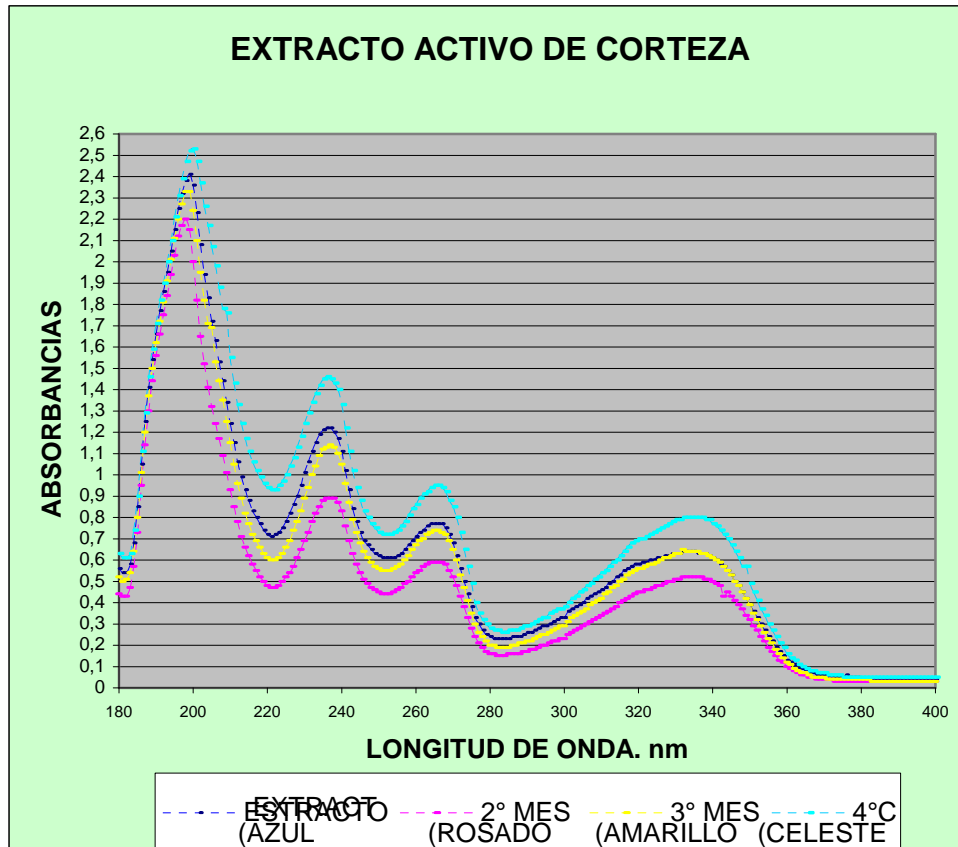
$$R \% = \frac{C_{MUESTRA}}{C_{PATRON}} \times 100$$

Y/o

$$\frac{C_{MUESTRA}}{C_{PATRON}} = \frac{Abs_{MUESTRA}}{Abs_{PATRON}}$$

GRAFICA N° 2
ESTABILIDAD ACELERADA DEL EXTRACTO ACTIVO DE CORTEZA

La gráfica corresponde al ensayo de estabilidad física acelerada realizada por el lapso de 3 meses, en condiciones de: humedad 75%, temperatura 45°C, en cámara acondicionada para estudios de estabilidad, con lámpara ultra violeta.



Espectros de absorción del extracto activo de corteza, barrido en el intervalo de 180 – 400 nm sobre muestras a (0,013 mg/mL)

Los espectros de absorción indican de forma general que no hay ninguna modificación gradual en el tiempo, pues mantienen el mismo perfil en todo el intervalo del espectro considerado.

TABLA N° 2
RESULTADOS DE EXTRACTO ACTIVO DE CORTEZA
LUEGO DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD

| Extracto Activo de Corteza | Extracto Activo de Corteza Control en fase oscuro | Extracto Activo de Corteza 2º Mes | Extracto Activo de Corteza 3º Mes | Extracto Activo de Corteza 4ºC |
|----------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Absorbancia 234 nm | 1,19 | 0,85 | 1,09 | 1,42 |
| Absorbancia 262 nm | 0,74 | 0,57 | 0,70 | 0,91 |
| Dilución | 0,0133 mg/mL | 0,0135 mg/mL | 0,0134 mg/mL | 0,0139 mg/mL |
| Rendimiento % | | 101 % | 101,7 % | 104 % |

Considerando las variaciones porcentuales en el tiempo y temperaturas, respecto a los valores de absorción que corresponden a las lecturas a longitudes de onda de 234 y 262 nm, se reporta que no hay cambios en el periodo de estudio.

La muestra sometida a 4ºC revela el mismo comportamiento, no hay variación porcentual significativa respecto a los valores de absorción, sin embargo estos datos dan una visión general del comportamiento del extracto activo y alcaloide quinolínico.

La elección de muestras para lecturas al espectrofotómetro y el criterio para trabajar con longitudes de onda 234 y 262nm fue optativo, por que al hacer un barrido con los controles oscuros y tomar en cuenta concentraciones entre 0,05 y 0,379 mg / mL reportó R^2 entre 0,97 y 0,99, como se puede ver en las gráficas N°3 y N° 4 y (Anexo N° 9) además de la relación de absorbancias (tabla N° 3) que dio un enfoque más claro para trabajar con esas longitudes de onda, por tanto se puede decir que no hubo ningún cambio cuantificable o degradación en el extracto activo y alcaloides quinolínicos luego de los ensayos de estabilidad física acelerada,

Entonces, estaríamos confirmando de que se trata de un compuesto físicamente y químicamente estable, como se puede observar en los espectros de absorción.

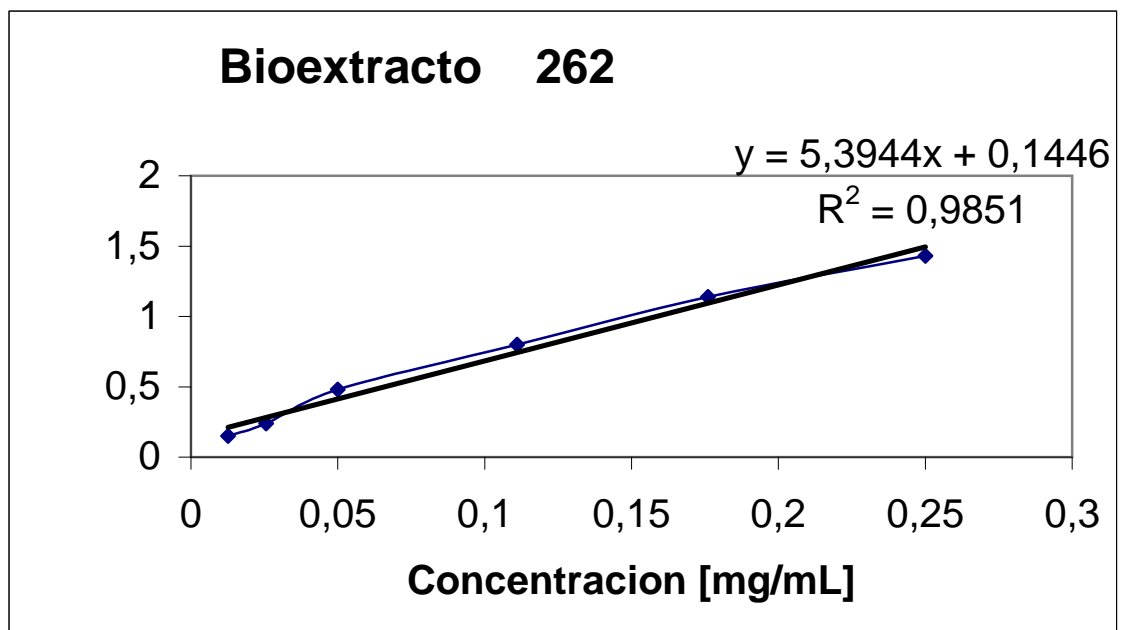
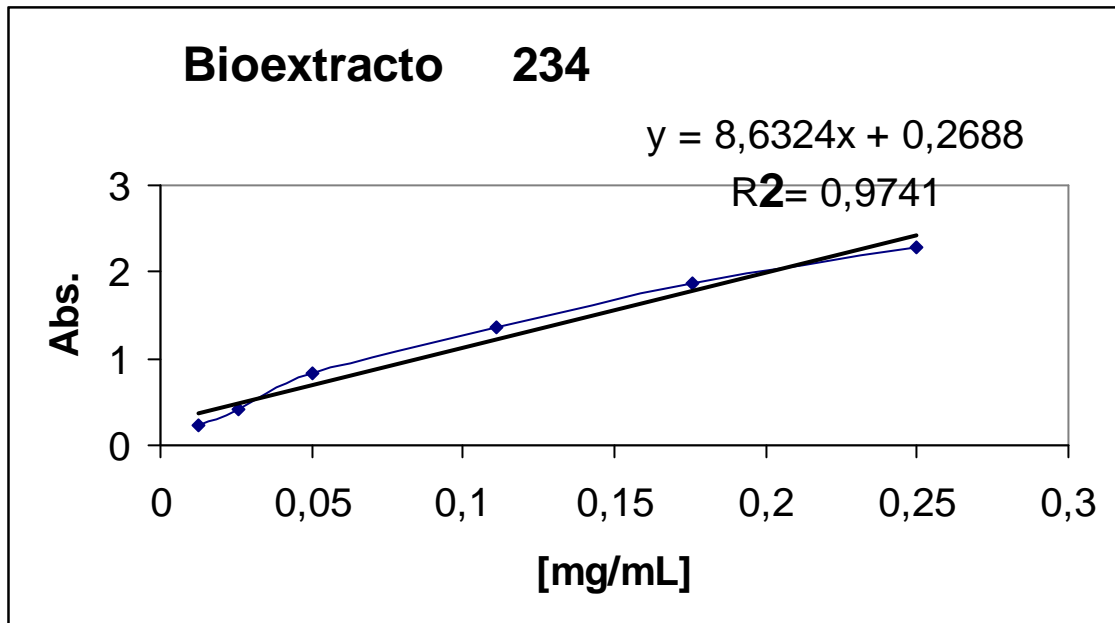
Para el cálculo de rendimiento porcentual se utilizó la siguiente relación:

$$R \% = \frac{C_{\text{MUESTRA}}}{C_{\text{PATRON}}} \times 100$$

Y/o

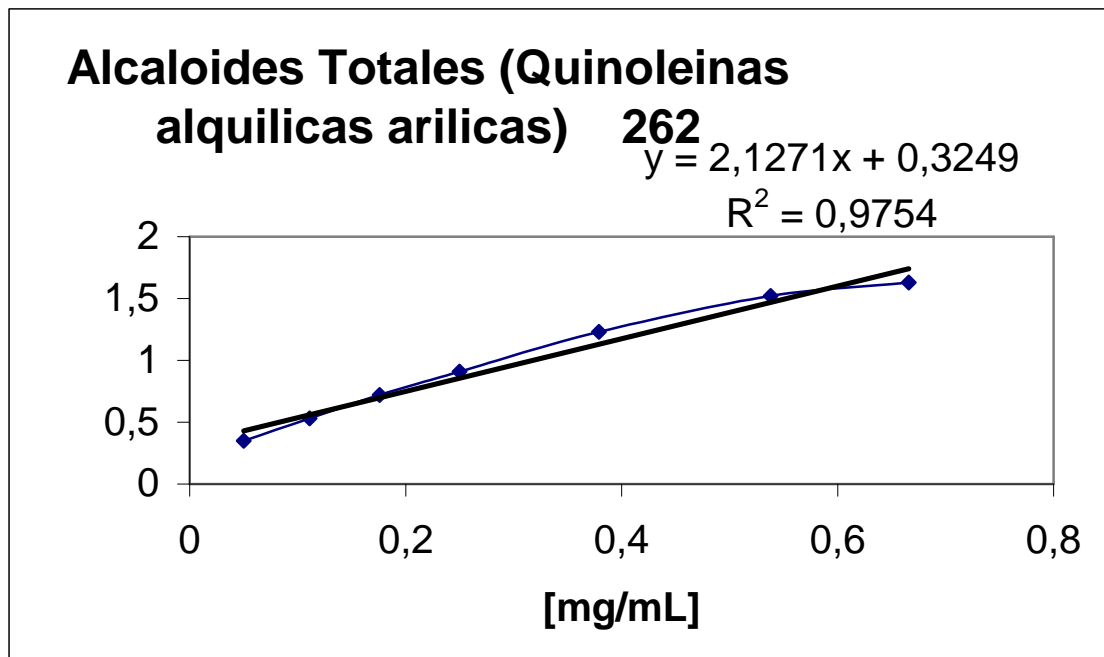
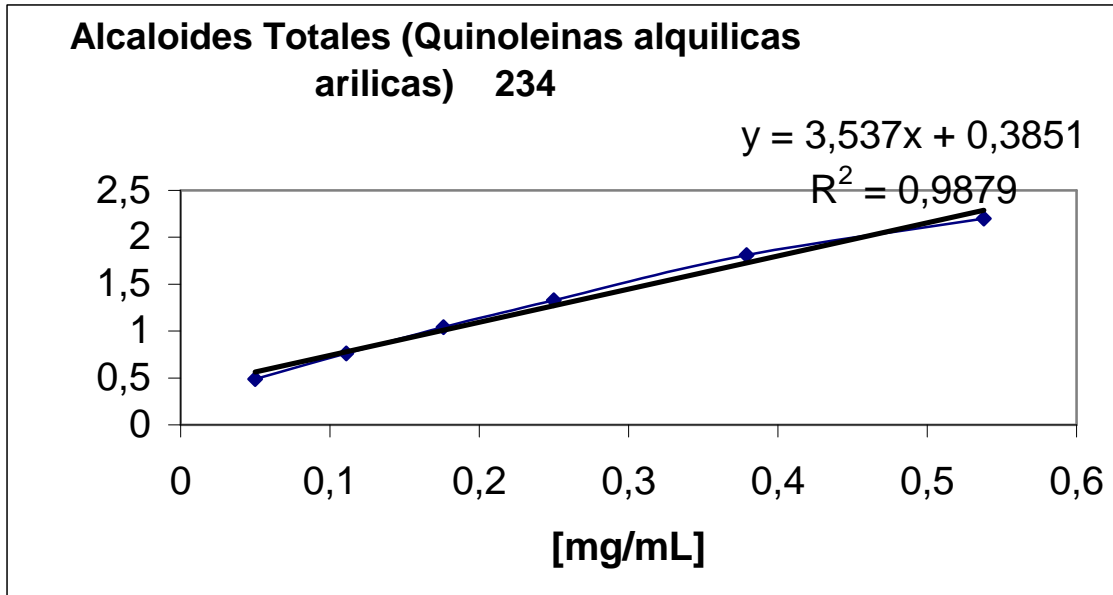
$$\frac{C_{\text{MUESTRA}}}{C_{\text{PATRON}}} = \frac{\text{Abs}_{\text{MUESTRA}}}{\text{Abs}_{\text{PATRON}}}$$

GRAFICA N° 3
ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL EXTRACTO ACTIVO CONTROL



Espectro de absorción del extracto a longitud de onda de 234 y 262 nm como se puede observar cumplen la Ley de Lambert y Beer, presentan un r^2 de 0,97 y 0,98

GRAFICA N° 4
ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE ALCALOIDES TOTALES
QUINOLÍNAS (ALQUÍLICAS – ARÍLICAS) CONTROL



Espectros de absorción de los alcaloides quinolínicos a longitud de onda de 234 y 262 nm, como se puede ver cumplen la Ley de Lambert y Beer, presentan un r^2 de 0.987 y 0.97

TABLA N° 3

**RELACIÓN DE ABSORBANCIAS DEL EXTRACTO ACTIVO CONTROL
A LONGITUDES DE ONDA DE 234, 262, 331 nm**

| [c] | abs 234 nm | abs 262 nm | Relación |
|-------|------------|------------|----------|
| 0,05 | 0,82 | 0,48 | 1,7 |
| 0,111 | 1,37 | 0,8 | 1,7 |
| 0,176 | 1,88 | 1,14 | 1,6 |
| 0,25 | 2,29 | 1,43 | 1,6 |
| 0,379 | 2,71 | 1,83 | 1,5 |
| 0,538 | 2,96 | 2,15 | 1,4 |
| 0,666 | 3,05 | 2,31 | 1,3 |

| [c] | abs 234 nm | abs 331 nm | Relación |
|-------|------------|------------|----------|
| 0,05 | 0,82 | 0,39 | 2,1 |
| 0,111 | 1,37 | 0,67 | 2,0 |
| 0,176 | 1,88 | 0,96 | 2,0 |
| 0,25 | 2,29 | 1,23 | 1,9 |
| 0,379 | 2,71 | 1,63 | 1,7 |
| 0,538 | 2,96 | 1,95 | 1,5 |
| 0,666 | 3,05 | 2,16 | 1,4 |

| [c] | abs 262 nm | abs 331 nm | Relación |
|-------|------------|------------|----------|
| 0,05 | 0,48 | 0,39 | 1,2 |
| 0,111 | 0,8 | 0,67 | 1,2 |
| 0,176 | 1,14 | 0,96 | 1,2 |
| 0,25 | 1,43 | 1,23 | 1,2 |
| 0,379 | 1,83 | 1,63 | 1,1 |
| 0,538 | 2,15 | 1,95 | 1,1 |
| 0,666 | 2,31 | 2,16 | 1,1 |

| [c] | abs 234 nm | abs 262 nm | abs 331 nm | Relación |
|-------|------------|------------|------------|----------|
| 0,05 | 0,82 | 0,48 | 0,39 | 4,4 |
| 0,111 | 1,37 | 0,8 | 0,67 | 2,6 |
| 0,176 | 1,88 | 1,14 | 0,96 | 1,7 |
| 0,25 | 2,29 | 1,43 | 1,23 | 1,3 |
| 0,379 | 2,71 | 1,83 | 1,63 | 0,9 |
| 0,538 | 2,96 | 2,15 | 1,95 | 0,7 |
| 0,666 | 3,05 | 2,31 | 2,16 | 0,6 |

La relación entre absorbancias a longitudes de onda de 234 y 262 nm muestran diferencia entre 1.4 y 2.1 y relacionando las tres longitudes de onda 234, 262, 331nm vemos que la relación no es constante.

A longitudes de onda a 262 y 331nm se ve una relación casi uniforme, sin embargo para las lecturas en el trabajo, se tomó en cuenta la relación de absorbancias a longitudes de onda de 234 y 262 nm que también presentan una relación casi constante.

4.4 Resultados de pruebas preliminares de control de calidad en producto semiterminado

4.4.1. Formulaciones

En el siguiente cuadro se detalla las formulaciones seleccionadas preparadas a partir del extracto activo y alcaloides quinolínicos, por presentar mayor grado de estabilidad.

Las fichas técnicas de las materias primas (Anexo N° 5)

CUADRO N° 9
MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA FORMULACIÓN DE LA EMULSIÓN
CREMA Y LIPOGEL

| FORMULA | A | B |
|--|---------------|---------------|
| Alcohol Cetílico | 5,5 g | 5 g |
| Alcohol Estearílico | 5,5 g | 8 g |
| Laurilsulfato de Na | 2,5 g | - |
| Vaselina sólida | 5,5 g | - |
| Propilenglicol | 10 g | 6 g |
| Metilparabeno | 0,2 g | 0,2 g |
| Propilparabeno | 0,1 g | 0,1 g |
| EDTA | 0,01g | - |
| Carbopol 940 | - | 0,1 g |
| Trietanol amina | - | 0,7g |
| Aceite de oliva | - | 5 g |
| Extracto activo ó concentrado de alcaloides quinolínicos | 5 g | 5 g |
| Twen 80 | - | 2 g |
| Agua destilada | Csp. 100 g | Csp. 100 g |

La formulación A. cualitativa y cuantitativa, corresponde a la “emulsión crema” preparada a partir del extracto activo y concentrado de alcaloides totales.

La formulación B. cualitativa y cuantitativa, corresponde al “lipogel” preparado a partir del extracto activo y concentrado de alcaloides totales.

En los estudios de la etapa de preformulación, se toma como referencia las concentraciones ya trabajadas (7) tomando como parámetro el valor de 5% obtenido a través de estudios preclínicos toxicogenéticos en modelo “ratas”, los resultados demostraron que la dosis 5 g / kg peso por vía sistémica no es tóxico, entonces mucho menos será por vía tópica.

Se trabajó a esta concentración para las formulaciones, mientras se tenga resultados de trabajos de investigación que se están procesando, para conocer más sobre el comportamiento farmacocinético del extracto diclorometánico como tal y del concentrado de alcaloides quinolínicos como: liberación, distribución, metabolización, eliminación (LADME), coeficiente de reparto, difusión constante o pasiva, solubilidad, que son factores que afectan la transferencia percutánea.

La elaboración de las formulaciones fue pequeña a escala “laboratorio”, una producción de 200g debido principalmente a la disponibilidad de extracto diclorometánico y concentrado de alcaloides quinolínicos, se utilizó envases de polipropileno con contratapa y tapa rosca, la elección de este envase primario fue a prueba y, por los resultados reportados se puede considerar como una opción, sin embargo aún falta respaldar estos resultados con los ensayos de estabilidad a largo plazo, que se encuentran en proceso de estudio, cabe aclarar que, durante la medición del extracto activo y alcaloides quinolínicos al ser los mismos de naturaleza oleosa y viscosa puede manifestarse errores de variabilidad en la concentración declarada en la formulación.

4.4.2. Resultado de controles organolépticos

Las características organolépticas en la emulsión crema y lipogel, se evaluaron al inicio y final de los ensayos de estabilidad.

CUADRO N° 10

**CONTROLES ORGANOLEPTICOS EN PRODUCTO SEMI TERMINADO
EMULSIÓN CREMA Y LIPOGEL
EXTRACTO ACTIVO**

| Producto | Aspecto | Color | Olor | Textura |
|-----------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Emulsión crema | Homogéneo pastoso | Amarillo verdoso | Característico a tierra | Refrescante, levemente untuosa |
| Lipogel | Homogéneo | Amarillo cristalina | Característico a tierra | Refrescante |

Como se puede observar en el cuadro N° 10 y N° 11, los productos presentan características organolépticas propias de esos sistemas fisicoquímicos.

CUADRO N° 11

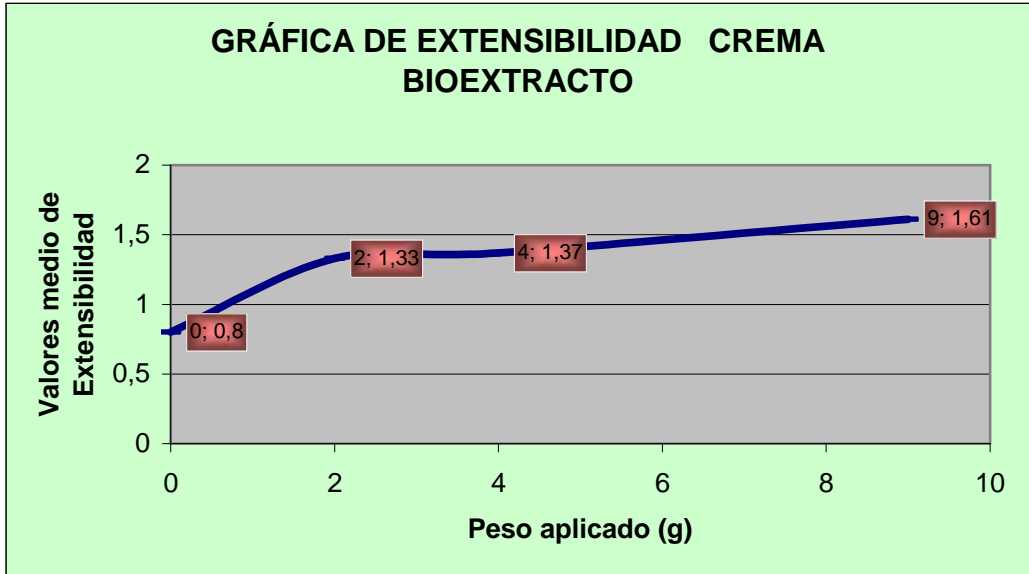
**CONTROLES ORGANOLEPTICOS EN PRODUCTO SEMI TERMINADO
EMULSIÓN CREMA Y LIPOGEL
QUINOLINAS ALQUILICAS ARILICAS**

| Producto | Aspecto | Color | Olor | Textura |
|-----------------------|-------------------|----------------|-------------------------|--------------------------------|
| Emulsión crema | Homogéneo pastoso | Amarillo claro | Característico a tierra | Refrescante, levemente untuosa |
| Lipogel | Homogéneo | Marfil | Característico a tierra | Refrescante |

Características aceptables en base a las referencias básicas para determinar los mismos, según las normas técnicas de Calidad para formas semisólidas y su apreciación a través de los órganos de los sentidos que nos permiten determinar ciertas características

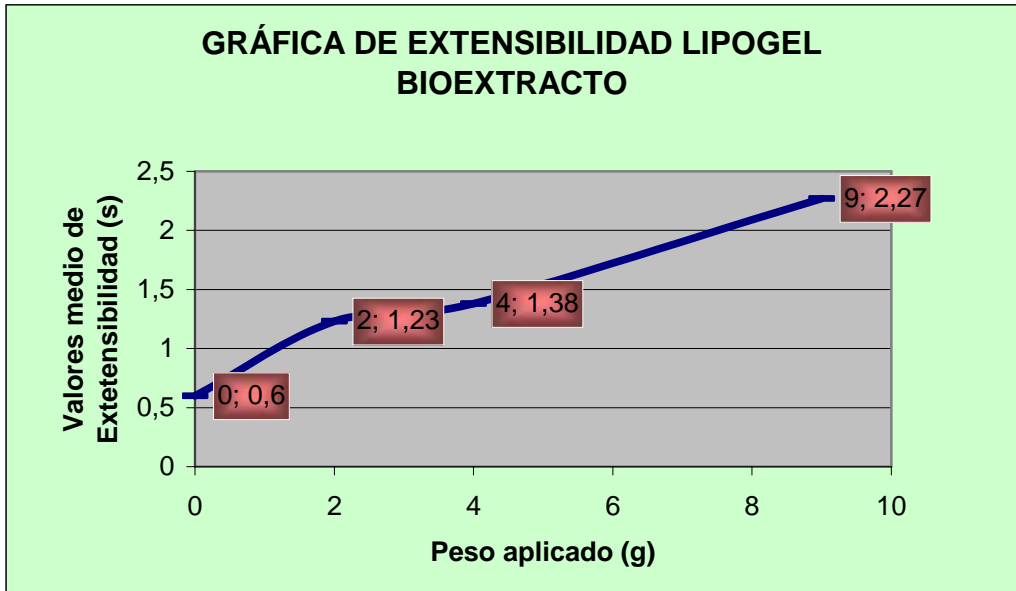
GRÁFICA N° 5

EXTENSIBILIDAD - CREMA EXTRACTO ACTIVO



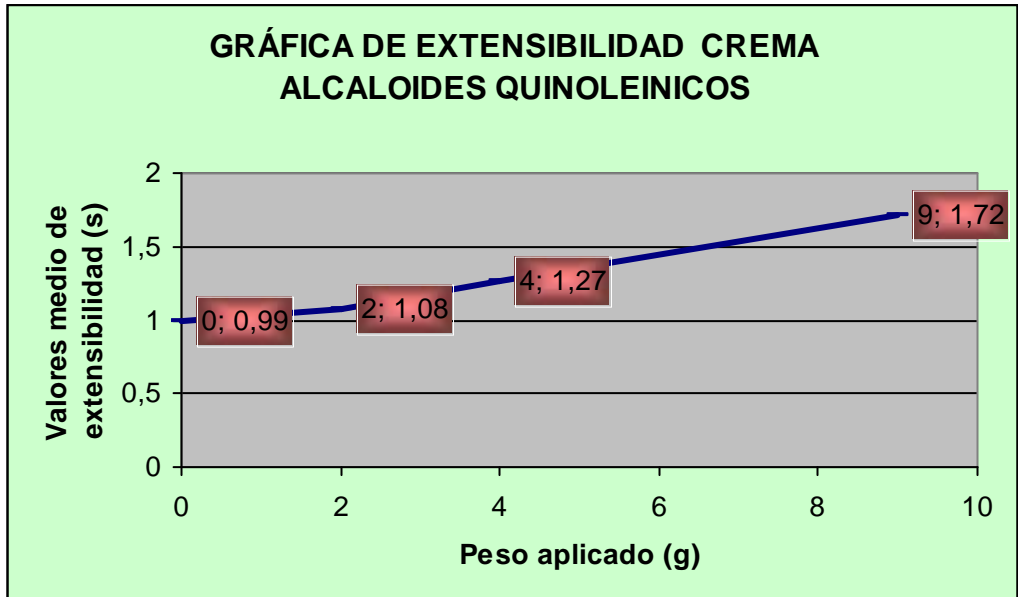
GRAFICA N° 6

EXTENSIBILIDAD- LIPOGEL EXTRACTO ACTIVO

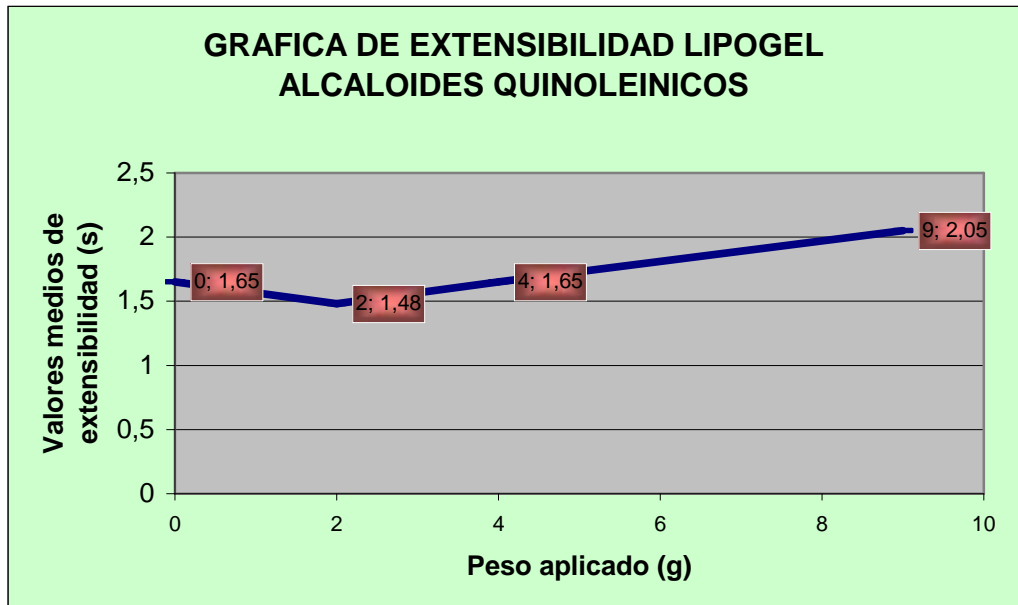


El ensayo de extensibilidad es una prueba reológica, se realizó la gráfica con: valores medios de extensibilidad vs. peso empleado, a intervalos de un minuto

GRAFICA N° 7
EXTENSIBILIDAD - CREMA ALCALOIDES QUINOLÍNICOS



GRAFICA N° 8
EXTENSIBILIDAD - LIPOGEL ALCALOIDES QUINOLÍNICOS



Con el valor del radio medio del círculo, se calcula la superficie que corresponde a los valores medio de extensibilidad

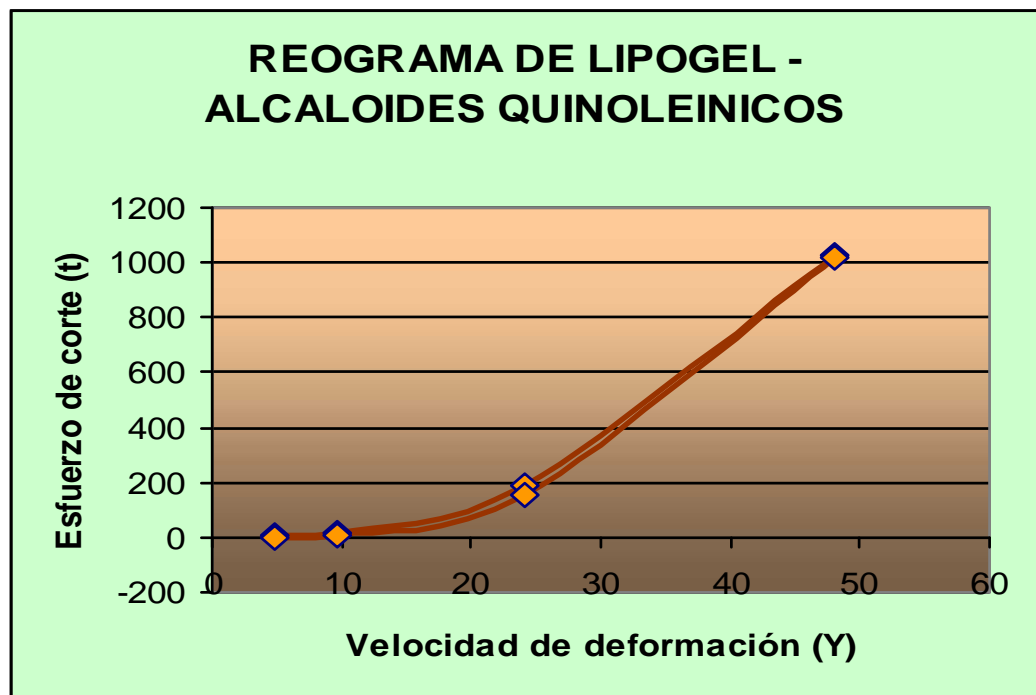
La extensibilidad de una forma farmacéutica semisólida depende de la composición de la formulación ya que dependiendo del número y de la cantidad de sustancias incorporadas puede variar la viscosidad, densidad, humectación, facilidad de aplicación, penetrabilidad tópica (absorción), por otra parte, cuanto más acuoso sea un sistema más se facilitará su distribución en ciertas superficies, pudiendo presentar en la piel una sensación de frescura, y un sistema oleoso puede dejar una capa grasosa en la superficie que ocluya los poros y dificulte su absorción.

Tomando en cuenta que no existe bibliografía que señale parámetros de referencia respecto a la extensibilidad, fue necesario definir especificaciones propias a los productos, por tanto se concluye que analizando los resultados obtenidos ciertamente se puede decir que los valores de extensibilidad para las cremas están entre 0,81cm y 1 cm al aplicarse un peso de 5g por el lapso de 1 minuto. Para los productos lipogel entre 0,60 cm y 1,65 cm al aplicarse un peso de 5g por el lapso de 1 minuto.

Valores que, aparentemente, revelan que los productos son materiales viscosos que sin embargo al aplicarse sobre la piel se extienden sin dificultad.

La reología como ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia y principalmente el campo de la biorreología que enfoca el estudio en materias semisólidas y fluidos viscosos, analizando el comportamiento o propiedades intermedias que pertenecen a un conjunto muy amplio conocidos genéricamente como viscoelásticos o elasticoviscosos (40) se ha determinado también en los productos una propiedad reológica como la viscosidad.

GRAFICA Nº 9
REOGRAMA DEL "LIPOGEL" DE ALCALOIDES QUINOLEINICOS



La gráfica representada por el Esfuerzo de Corte (t) vs Velocidad de deformación, revela que al decrecer la velocidad de deformación (Y) la viscosidad se recupera como se puede observar, ambas curvas la ascendente y la descendente, coinciden.

El valor de viscosidad no sólo incluye la información de la rapidez de deformación a la que corresponde, sino también de si corresponde a la curva ascendente o descendente(40)

Por tanto haciendo una relación, tomando como base las características viscosas y como variable independiente la rapidez de deformación se ha clasificado al producto lipogel elaborado a partir de los alcaloides quinoléinicos, como un fluido pseudoplástico por que su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de deformación, y al ser un fluido que su viscosidad depende de la velocidad de deformación, se concluye que también que el fluido tiene comportamiento no Newtoniano.

Controles farmacotécnicos

Las características farmacotécnicas en la emulsión crema y lipogel, se evaluaron al inicio y al final de los ensayos de estabilidad

CUADRO Nº 12
CONTROLES FARMACOTÉCNICOS EN PRODUCTO
SEMI TERMINADO
EMULSIÓN CREMA Y LIPOGEL
EXTRACTO ACTIVO Y QUINOLEÍNAS ALQUÍLICAS – ARÍLICAS
AL INICIO DEL ESTUDIO

| Producto | pH extracto activo | pH Quinoleínas alquílicas – arílicas | Tipo de emulsión | Aspecto | Microbiología Hongos/ bacterias |
|----------------|--------------------|--------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|
| Emulsión crema | 6,2 | 6,9 | W / O | Homogéneo pastoso | Ausencia |
| Lipogel | 8 | 8,6 | O / W | Homogéneo | Ausencia |

CUADRO Nº 13
EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOTÉCNICOS
EN EMULSIÓN CREMA Y LIPOGEL
DESPUES DE SER SOMETIDOS AL ESTUDIO DE
ESTABILIDAD FISICA ACELERADA

| Parámetros | Emulsión crema Extracto Activo | Lipogel Extracto Activo | Emulsión crema Quinoleínas Alquílicas – Arílicas | Lipogel quinoleínas Alquílicas – Arílicas |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|--|---|
| Conteo microbiano | Sin contaminación | Sin contaminación | Sin contaminación | Sin contaminación |
| Aspecto | Ninguna modificación visible | Ninguna modificación visible | Ninguna modificación visible | Ninguna modificación visible |
| Densidad g/mL | 0,496 | 0,960 | 0,870 | 0,960 |
| pH | 6,2 | 8 | 6,9 | 8,6 |

Se observó también que en los productos crema y lipogel, no hay presencia de exudados en la superficie que es lo más frecuente cuando se presenta una inestabilidad física que además se acelera, cuando se conserva a temperaturas elevadas .

Los valores de pH al inicio y final del ensayo no han tenido ningún cambio, el producto emulsión crema es levemente ácido, sin embargo para los productos lipogel, reportan un pH alcalino, esto se debe a la presencia de trietanolamina y carbopol.

Los valores de densidad para el producto lipogel elaborado a partir del extracto y alcaloides quinolínicos, son iguales, sin embargo resultaron más viscosos los productos emulsión crema, debido a la presencia de componentes oleosos en mayor proporción.

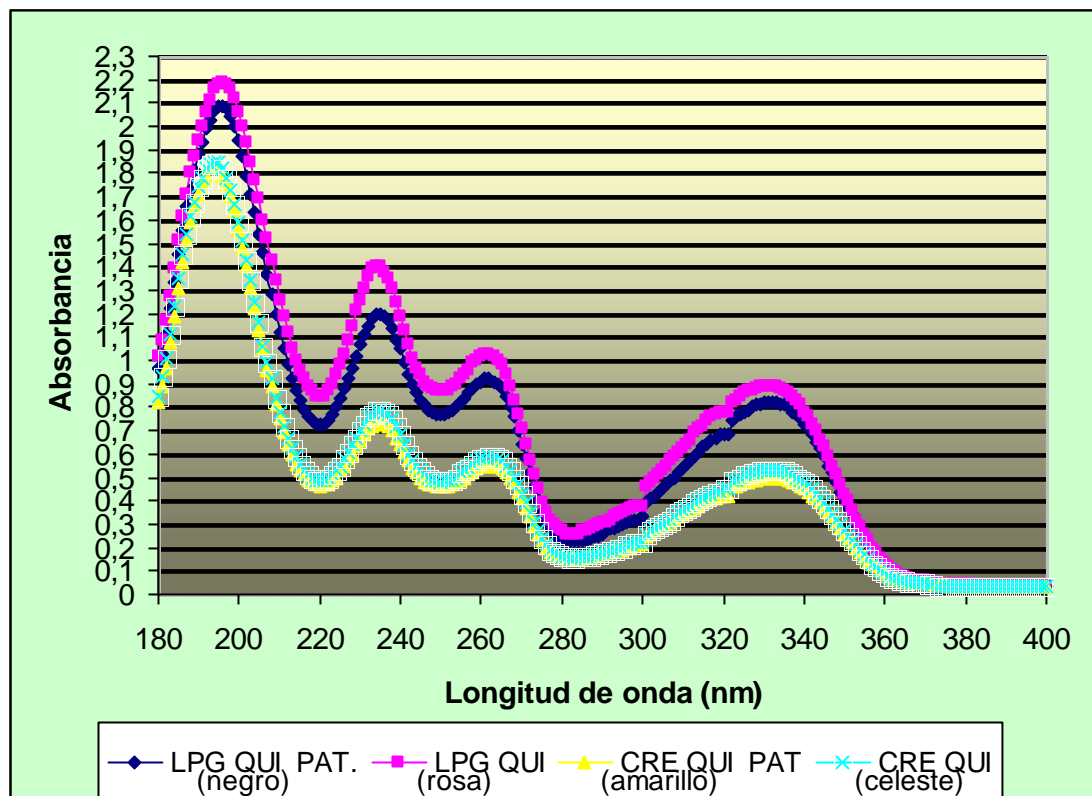
La presencia del laurilsulfato de sodio en la “crema” es uno de los factores que incrementa esta viscosidad, por ser un emulsificante forma complejos interfaciales con los alcoholes grasos de la fase oleosa y por tanto modifica su consistencia y propiedades reológicas, y la presencia del petrolato o vaselina blanca como espesante aumenta la viscosidad (27).

4.4.3. Resultado de controles de Estabilidad Física acelerada en producto semiterminado

Las lecturas al espectrofotómetro de los productos crema y lipogel, se evaluaron con el mismo criterio que para el extracto activo y alcaloides quinolínicos, a longitudes de onda 234 y 262 nm.

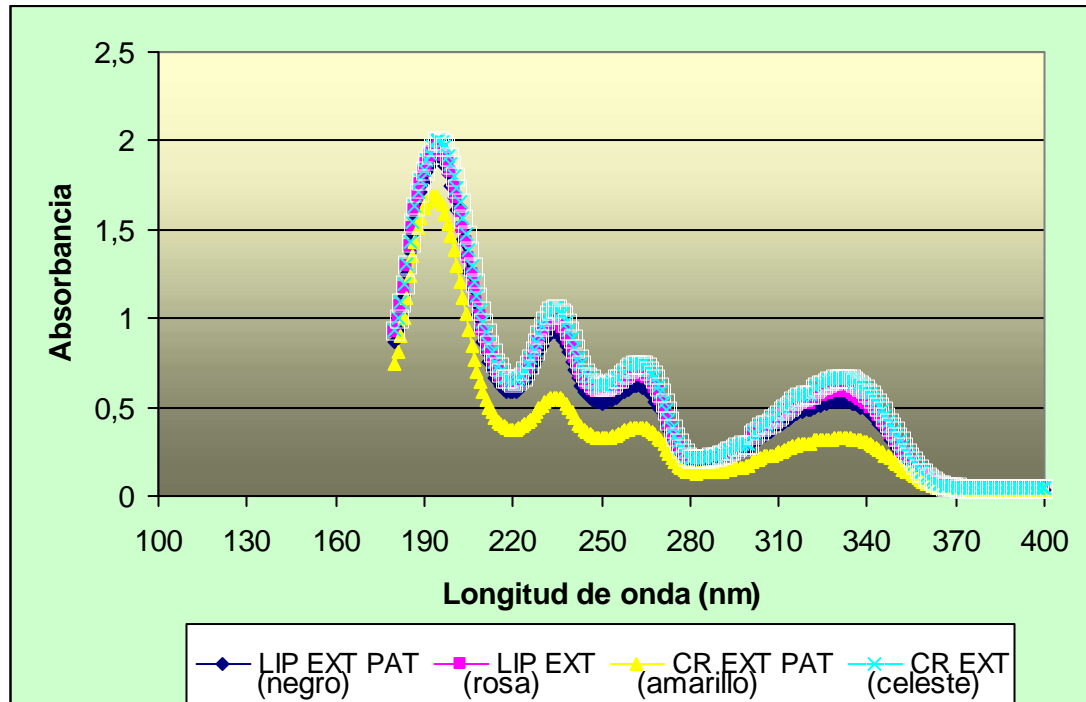
GRAFICA Nº 10

ESTABILIDA FISICA ACELERADA EN CREMA Y LIPOGEL DE QUINOLINAS ALQUILICAS – ARILICAS FRENTE A SUS BLANCOS



Espectros de absorción de los productos “crema y lipogel” elaborados a partir de alcaloides quinolínicos, frente a sus patrones, luego del Test de estabilidad acelerada, leídas en el intervalo de longitud de onda entre 180 y 400 nm.

GRAFICA Nº 11
ESTABILIDAD FISICA ACELERADA EN
CREMA Y LIPOGEL DEL EXTRACTO ACTIVO
FRENTE A SUS BLANCOS



Mediante el gráfico 9 y 10 se han obtenido los espectros de absorción de las muestras patrón y de cada una de las muestras en estudio, sometidas al ensayo de estabilidad física acelerada en condiciones de:

- temperatura de 45°C por 3 meses
- temperatura de 4°C por 1 mes
- 8 ciclos de (48 horas) a 45°C y 4°C
- Centrifugación a 3000 rpm / 1 hora

TABLA N° 4
RESULTADOS DE PRODUCTOS
EMULSION CREMA Y LIPOGEL, PREPARADOS A PARTIR DEL
EXTRACTO ACTIVO Y DE ALCALOIDES QUINOLEÍNICOS, FRENTE A
LOS BLANCOS DESPUES DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD FÍSICA

| | Blanco Extracto activo sin Stress | Blanco Alcaloide quinoleinico Sin Stress | Prod. Crema Extracto + Stress | Prod. Lip.Gel Extracto + Stress | Prod. Crema Alcaloides Quinoleinicos + Stress | Prod. Lip.Gel Alcaloides Quinoleinicos + Stress |
|------------------------|--|---|--|--|--|--|
| Absorbancias 234 nm | Cre: 0,66 L.G: 0,97 | Cre: 0,67 L.G: 1,09 | 0,99 | 0,85 | 0,66 | 1,22 |
| 262 nm | Cre: 0,45 L.G: 0,65 | Cre: 0,51 L.G: 0,85 | 0,69 | 0,58 | 0,49 | 0,91 |
| Dilución | Cre: 0,014mg/mL | Cre: 0,01396mg/mL | | | | |
| | Lip.Gel: 0,01392mg/mL | Lip.Gel: 0,01395mg/mL | 0,01392 mg / mL | 0,01393 mg / mL | 0,01396 mg / mL | 0,01391 mg / mL |
| Rendimiento % | | | 99,4 % | 100 % | 99,98 % | 99,7 % |

Como blanco o patrón se utilizó una muestra del mismo producto que no fue sometido a ningún ensayo de estabilidad.

Considerando los espectros de absorción de los productos frente a sus blancos, se ha evaluado la variación porcentual en la concentración luego del test físico de estabilidad, respecto a los valores de absorción que corresponden a las longitudes de onda 234 y 262 nm.

De hecho, las muestras de los productos crema y lipogel no han sufrido variaciones cuantificables de absorción, analizando los resultados, ciertamente confirmamos la estabilidad de los productos, ya que la concentración del extracto activo y alcaloides quinolínicos, mantienen la concentración establecida de 90 y 110 % parámetros que señala la farmacopea USP respecto a las concentraciones de principios activos en formulaciones farmacéuticas.

4.4.3.1. Escala de evaluación de la Estabilidad física acelerada en Emulsión Crema y Lipogel

La siguiente escala se ha adoptado para calificar el Test de estabilidad acelerada:

1. Ninguna modificación visible, producto estable
2. Leve evidencia de falta de homogeneidad
3. Inicio de separación de fases
4. Separación marcada de fases
5. Separación total de fases

CUADRO Nº 14

EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD FISICA ACELERADA EN EMULSIÓN CREMA Y LIPOGEL DEL EXTRACTO ACTIVO

| Ensayo | Emulsión crema | Lipogel |
|---|----------------|---------|
| 90 días a 45°C | 1 | 1 |
| 6 meses a 37°C | 1 | 1 |
| 1 mes a 4°C | 1 | 1 |
| 8 ciclos(48 horas) a 45°C y Refrigeración | 1 | 1 |
| Centrifugación a 3000 rpm / 1 hora | 1 | 1 |

Como se puede observar los productos elaborados a partir del extracto activo, son físicamente estables por que según la escala de evaluación, no presentaron ninguna modificación visible.

CUADRO N° 15

**EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD FÍSICA ACELERADA EN EMULSIÓN
CREMA Y LIPOGEL
QUINOLINAS ALQUILICAS - ARILICAS**

| Ensayo | Emulsión crema | Lipogel |
|---|-----------------------|----------------|
| 90 días a 45°C | 1 | 1 |
| 6 meses a 37°C | 1 | 1 |
| 1 mes a 4°C | 1 | 1 |
| 8 ciclos(48 horas) a 45°C y Refrigeración | 1 | 1 |
| Centrifugación a 3000 rpm / 1 hora | 1 | 1 |

Los resultados de estabilidad física de los productos elaborados a partir del concentrado de alcaloides totales (quinolíνας alquílicas – arílicas), según la escala de evaluación, no han tenido ningún cambio.

La calificación obtenida en los productos, confirma el resultado cualitativo obtenido en los espectros de absorción, donde se puede observar que los espectros de las muestras y los patrones son similares, por tanto se confirma también que hubo compatibilidad entre (principio activo-excipientes-envase) (27) pues no se reportó ninguna interacción o cambio de fases.

4.5. Resultados de ensayos biológicos in vivo e in vitro en producto semiterminado

Los ensayos de irritabilidad dérmica aplicados a los productos “emulsión crema y lipogel” elaborados a partir del extracto activo y concentrado de alcaloides totales se calificó según los resultados obtenidos, para los cuatro productos como: no irritantes para el caso de las cremas y ligeramente irritantes para los productos lipogel

En el siguiente cuadro se detalla los resultados de los ensayos biológicos

CUADRO N° 16
PARAMETROS BIOLÓGICOS EN EMULSIÓN CREMA
LIPOGEL

| Parámetros | Emulsión crema Extracto Activo | Lipogel Extracto Activo | Emulsión crema Concentrado de Alcaloides Totales | Lipogel Concentrado de Alcaloides Totales |
|--|---|--------------------------------------|---|--|
| Bacterias Hongos Irritabilidad dérmica (in vivo) | Ausencia Ausencia No irritante | Ausencia Ausencia No irritante | Ausencia Ausencia No irritante | Ausencia Ausencia ligeramente irritante |

Este cuadro detalla por separado la emulsión crema y lipogel, preparados a partir del extracto activo y del concentrado de alcaloides totales.

CUADRO N° 17

Evaluación de la Actividad Biológica in vitro sobre promastigotes de Leishmania en producto semiterminado

| N° | Compuesto | LEISHMANIA | | |
|----|---|---|---------------------------------|----------------------------|
| | | IC 50 (µg/ml) PH8(<i>L. amazonensis</i>) | M2903(<i>L. brasiliensis</i>) | PP75(<i>L. donovani</i>) |
| | Emulsión crema / Extracto activo | 72, 6 | 100, 9 | 125 |
| | Lipogel / Extracto Activo | 51, 6 | 55, 5 | 68,0 |
| | Emulsión crema/ Alcaloides Quinolinas (Alquilicas-Arilicas) | 67, 3 | 37, 5 | 67, 3 |
| | Lipogel/ Alcaloides Quinolinas (Alquilicas- Arilicas) | 12, 5 | 12, 5 | 21, 8 |
| | | | | |
| | Alcaloides Totales de corteza BLANCO | 21, 8 | 22, 1 | 26, 4 |

Fuente: Unidad de quimioterapia experimental I.I.F.B.

Tomando en cuenta los valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria) del blanco como referencia, vemos que los productos lipogel, principalmente el que esta elaborado a partir de los alcaloides totales, presentan buena actividad biológica e incluso con valores por debajo de la concentración inhibitoria.

CUADRO N° 18
ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO EN EMULSIÓN CREMA ELABORADA A
PARTIR DE UNA
MEZCLA DE EXTRACTO ACTIVO DE CORTEZA Y EXTRACTO ACTIVO DE HOJA
(25 / 5)

| N° | Compuesto | LEISHMANIA | | |
|----|--|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | | IC 50 (µg/ml) | | |
| | | PH8(<i>L. amazonensis</i>) | M2903(<i>L. brasiliensis</i>) | PP75(<i>L. donovani</i>) |
| | Emulsión crema / Extracto Mezcla (extracto de corteza – extracto de hoja) | 42,7 | 42,7 | 55,7 |
| | Alcaloides Totales de Corteza BLANCO | 21,8 | 22,1 | 26,4 |

Fuente: Unidad de quimioterapia experimental- I.I.F-B.

Resultados obtenidos de una muestra de prueba que se hizo solo con el extracto diclorometánico donde se mezcló una relación de 25 / 5 de extracto de corteza / extracto de hojas y como se puede observar la actividad es buena frente a las tres cepas en estudio, con valores cercanos al IC₅₀ del blanco que se toma como referencia.

A manera de comparar, el aumento de la actividad biológica del producto crema elaborado a partir del extracto mezcla (cuadro N° 18) y extracto puro de corteza (cuadro N° 17), se debe a que en las hojas se encuentran los alcaloides con mayor concentración y actividad, sin embargo, una limitante para elegir esta emulsión crema, fue el color verde intenso, propio de la clorofila presente en las hojas de la planta, pero no se descarta la opción de que una vez que se consiga separar la clorofila del extracto de hoja, sea la combinación ideal como extracto activo, para elaborar las formas farmacéuticas propuestas, trabajo que aún se halla en proceso en el I.I.F.B.

CUADRO N° 19
ANALISIS MICROBIOLOGICO EN PRODUCTO CREMA Y LIPOGEL
(ALCALOIDES QUINOLINICOS)
MUESTRAS LLEVADAS A RURRENABAQUE Y SANTA ROSA DE MARAVILLAS

| CREMA EVANTA QUINOLINAS (Alquílicas – Arílicas 5%) | |
|--|---|
| MEDIO DE CULTIVO | RESULTADO |
| Agar Nutritivo | Crecimiento de colonias pequeñas, blanquecinas. Tinción Gram: bacilos gram negativos. |
| Agar Salmonella – Shiguela | No se observa crecimiento |
| Agar Manitol Salado | No se observa crecimiento |
| Agar Mac Conkey | Crecimiento de colonias grandes rojas Tinción Gram: bacilos gram negativos. |
| Agar Cetrimide | No se observa crecimiento |
| Prueba Bioquímica de Colonia proveniente de Agar Mac Conkey | |
| TSI | Lactosa (+), Glucosa (+), SH ₂ (-) con gas |
| SIM | Sulfuro |
| | Indol |
| | Motilidad |
| | - |
| | + |
| | + |

Comentario: Se observó crecimiento en medio nutritivo y en medio Mac Conkey, de colonias características de *E. Coli*, al realizar las respectivas pruebas bioquímicas y tinción de gram, se concluye que se trata de *Escherichia coli*.

| LIPOGEL DE EVANTA QUINOLINAS (Alquilicas – Arílicas) 5% | |
|--|--|
| MEDIO DE CULTIVO | RESULTADO |
| Agar Nutritivo | Crecimiento colonias incoloras y transparentes y pequeñas Tinción Gram: bacilos gram negativos |
| Agar Salmonella – Shiguela | Crecimiento colonias incoloras y transparentes y pequeñas Tinción Gram: bacilos gram negativos |
| Agar Manitol Salado | No se observa crecimiento |
| Agar Mac Conkey | Crecimiento colonias incoloras y transparentes y pequeñas Tinción Gram: bacilos gram negativos |
| Agar Cetrimide | No se observa crecimiento |
| Prueba Bioquímica de Colonia proveniente de Agar S-S | |
| TSI | Lactosa (-), Glucosa (+), SH₂ (-) con o sin gas |
| Lisina | Alcalina (color púrpura) en la superficie inclinada. - Ácida (amarillo) en el fondo. - Sin Producción de SH ₂ (ennegrecimiento del fondo del tubo). |

Comentario: Por las características presentadas en el cultivo en Agar S-S- y Mac Conkey, resultados de pruebas bioquímicas y tinción de gram se concluye la presencia de *Shigella sp.* (en muestras que se llevaron para prueba a la zona de Rurrenabaque y Santa Rosa de Maravillas)

CUADRO N° 20
ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTO CREMA Y LIPOGEL
(EXTRACTO ACTIVO DE CORTEZA)
EN MUESTRAS QUE SE LLEVARON A RURRENABAQUE Y SANTA ROSA DE
MARAVILLAS

| CREMA EVANTA EXTRACTO ACTIVO DE CORTEZA 5% | |
|--|---|
| MEDIO DE CULTIVO | RESULTADO |
| Agar Nutritivo | No se observa crecimiento |
| Agar Salmonella – Shiguela | No se observa crecimiento |
| Agar Manitol Salado | No se observa crecimiento |
| Agar Mac Conkey | No se observa crecimiento |
| Agar Cetrimide | No se observa crecimiento |
| LIPOGEL EVANTA EXTRACTO ACTIVO DE CORTEZA 5% | |
| MEDIO DE CULTIVO | RESULTADO |
| Agar Nutritivo | Crecimiento de colonias pequeñas, blanquecinas. Tinción Gram: bacilos gram negativos. |
| Agar Salmonella – Shiguela | No se observa crecimiento |
| Agar Manitol Salado | No se observa crecimiento |
| Agar Mac Conkey | Crecimiento de colonias grandes rojas Tinción Gram: bacilos gram negativos. |
| Agar Cetrimide | No se observa crecimiento |
| Prueba Bioquímica de Colonia proveniente de Agar Mac Conkey | |
| TSI | Lactosa (+), Glucosa (+), SH ₂ (-) con gas |
| SIM | Sulfuro - |
| | Indol + |
| | Motilidad + |

Comentario: Se observa crecimiento en medio nutritivo y en medio Mac Conkey, con colonias características de E. Coli, al realizar las respectivas pruebas bioquímicas y tinción de gram, se concluye que se trata de *Escherichia coli*.

Respecto al análisis microbiológico de productos (cuadros N° 19 y N° 20), se presentó colonias típicas de *Escherichia coli*, cuya presencia es una señal de alerta, pues la contaminación proviene del producto ya terminado, que ya viene condicionado principalmente por la manipulación inadecuada de los productos, pues el extracto activo y concentrado de alcaloides quinoleínicos, antes de la preparación de los productos “crema y lipogel”, presentaron un nivel mínimo de contaminación microbiológica “contaminación microbiológica de alerta (x)” (cuando el contenido bacteriano es $> x$ pero $< \text{o} = a 5x/g$ los hongos y levaduras han de ser ensayados) y se realizó además, el ensayo de ausencia de organismos indicadores tal como señala la farmacopea Europea 1997 y la revista Forum. Volumen 18, N° 14, Julio 1992, para ingredientes naturales, excipientes y principios activos, ya que es un requisito señalado en farmacopeas que la calidad microbiológica que deben cumplir los medicamentos a base de plantas, señala ausencia de organismos indicadores, sin embargo, como control inicial de proceso del material vegetal, sería importante realizar un lavado en agua potable y desinfección con hipoclorito de sodio el momento de la colecta de la planta misma, ya que la presencia de estos microorganismos se debe también al lugar de origen donde se cultiva la planta, métodos de desecación (artesanal), temperatura de secado generalmente menor a 30°C, inadecuado almacenamiento de corteza, hojas y órganos de la planta en general, y para aclarar, la presencia de *Shiguella* en uno de los productos se debe también una contaminación post- proceso, pues se trata de muestras que fueron llevadas a la zona de Rurrenabaque y Santa Rosa de Maravillas, y que fueron sometidas a un stress físico por los comunarios de la zona, para que periódicamente las expongan a medio ambiente “como manipulan normalmente cuando se aplican algún producto” sin embargo la presencia de *Escherichia Coli* y *Shiguella* no se consideró como carga microbiana importante, justamente por el origen de la contaminación, además debe destacarse la actividad antiparasitaria que tiene el extracto diclorometánico activo como tal, frente a las amebiasis, sin embargo, será importante tomar en cuenta la forma de aplicación sobre la piel, para garantizar la acción y la eficacia, al igual que cualquier otro medicamento de uso tópico.

CUADRO Nº 21
EVALUACIÓN DE PRUEBA DE IRRITACIÓN EN PIEL DE CONEJOS
(PRUEBA DEL PARCHÉ)

| Producto en estudio | Eritema | Edema | Prurito | Categoría |
|--|---------|-------|---------|-----------|
| Emulsión crema Extracto activo de corteza | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Lipogel Extracto activo de corteza | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Emulsión crema Alcaloides quinoleínicos | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Lipogel Alcaloides quinoleínicos | 2 | 0 | 2 | 1,1 – 2 |

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

EVALUACIÓN PRUEBA DE IRRITACIÓN EN PIEL DE CONEJOS (PARCHÉ)

| CATEGORIA | ESCALA |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 0 – 1 | No irritante |
| 1,1 – 2 | Ligeramente irritante |
| 2,1 – 5 | Moderadamente irritante |
| 5,1 – 6 | Irritante de moderado a severo |
| 6,1 – 8 | Irritante severo |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | |

En cuanto a los ensayos de irritabilidad dérmica realizados con los productos se pudo observar que 2 conejos reaccionaron a la sensación de prurito, durante la primera hora, sin llegar a provocarles “stress” pero, esto dio lugar a que a las 24 horas, se presente un eritema bien definido que desapareció a las 72 horas, esta reacción de

prurito se presentó con mayor intensidad en el producto "lipogel" elaborado a partir de los alcaloides quinolínicos esto se debe a que tienen un pH más alcalino debido a la presencia de la trietanolamina y el carbopol y a la presencia misma de los alcaloides y para las "cremas" la sensación de prurito fue muy leve, casi imperceptible, sin embargo esto no significa que los productos "lipogel" sean irritantes, es más, esa reacción pudo deberse a que la piel del conejo es extremadamente sensible y muy delgada y como para realizar el ensayo se rasura dejando la zona libre, es posible que haya quedado ciertas abrasiones en la piel del conejo, pero si tomamos en cuenta un proceso de Leishmaniasis cutánea donde la piel en esa región esta dañada, y como en todo proceso donde hay un daño en las capas epidérmica y dérmica, entonces las terminaciones nerviosas y corpusculares obviamente están dañadas, por tanto una reacción de sensibilidad al producto será levemente irritante.

4.6. Cumplimiento de los Objetivos planteados

| OBJETIVO GENERAL | RESULTADO DE LA INVESTIGACIÓN |
|--|--|
| <p>Estudio de preformulación a una “emulsión crema” y “lipogel” de uso tópico para el extracto activo de corteza y concentrado de alcaloides totales (quinolinas alquílicas – arílicas) de la especie vegetal: <i>Galipea longiflora</i> krause “Evanta”</p> | <p>Se consiguió realizar el estudio de preformulación en la “ emulsión crema” y “lipogel” de uso tópico</p> |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS | RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN |
| <p>Evaluar la actividad biológica (antiparasitaria) <i>in vitro</i> sobre promastigotes de tres cepas de <i>Leishmania</i> en el extracto diclorometánico y concentrado de alcaloides totales de la <i>Galipea longiflora</i> krause “evanta”.</p> | <p>Se ha presentado buena actividad en los alcaloides quinolínicos, frente a las cepas de estudio y el blanco como también con relación al extracto diclorometánico de corteza.</p> |
| <p>Realizar estudios físico- químicos al extracto diclorometánico y concentrado de alcaloides totales de la <i>Galipea longiflora</i> krause “evanta”.</p> | <p>Se realizaron satisfactoriamente los ensayos correspondientes al extracto y concentrado de alcaloides totales y se ha determinado que aparentemente son físicamente estables.</p> |
| <p>Desarrollar formulaciones semisólidas “emulsión crema” y “lipogel” a escala laboratorio preparada a partir del extracto activo y concentrado de alcaloides totales.</p> | <p>Se consiguió preparar la crema y lipogel, estable físicamente elaborada a partir del extracto y alcaloides quinolínicos.</p> |
| <p>Determinar: estabilidad física, parámetros organolépticos, farmacotécnicos, microbiológicos, evaluar la actividad biológica <i>in vitro</i>, ensayos biológicos <i>in vivo</i> a la emulsión crema y lipogel según especificaciones.</p> | <p>Se realizaron todos los ensayos, los resultados demostraron que son productos que cumplen con las especificaciones para formas semisólidas.</p> |

4.7. Validación de la hipótesis

Al trabajar este proyecto de investigación con un producto natural *Galipea longiflora* krause Kallunki “Evanta”, se comprobó satisfactoriamente la actividad biológica *in vitro*, frente a promastigotes de *Leishmania*, del extracto orgánico activo y alcaloides quinolínicos y se pudo desarrollar de manera correcta las formas farmacéuticas semisólidas (emulsión crema y lipogel) para uso tópico, que conservan además su actividad biológica y estabilidad física.

5. CONCLUSIONES

Analizando los parámetros físicos, químicos y evaluando la actividad biológica *in vitro*, del extracto diclorometánico y alcaloides quinolínicos, ciertamente podemos confirmar la estabilidad física y terapéutica, cuando nos referimos a la actividad biológica, por definición internacional.

Los espectros de absorción del extracto activo y alcaloides quinolínicos como control, barrido en el intervalo de 180 y 400 nm respecto a los valores de absorbancia Vs concentración, cumplen la ley de Lambert y Beer, por que presentan un "r²" de 0,98 y 0,99, por tanto, servirán de base para los estudios de estabilidad química.

Los datos obtenidos en relación al extracto activo y alcaloides quinolínicos en general, dan como resultado una visión más amplia y servirán de base para ulteriores estudios en el desarrollo de la Fitotecnología

Considerando los resultados que emergen de las formulaciones estudiadas, se concluye que son buenas formulaciones y que presentan resultados satisfactorios.

Cabe aclarar que no se realizaron algunas pruebas complementarias para conocer más sobre el extracto diclorometánico activo y alcaloides quinoleínicos y para completar el estudio de preformulación, debido a la falta de experiencia, tiempo, además principalmente por la cantidad de muestra disponible para el estudio.

La elaboración de las formulaciones fue a escala laboratorio y experimental como principio del desarrollo galénico, por tanto, el método de elaboración no está validado, los resultados obtenidos son solo indicativos, no representativos por que se elaboró cantidades muy pequeñas y como " el tipo de información necesaria, dependerá de la forma de dosificación que se vaya a desarrollar" se concluye que: el presente trabajo es una base de información técnica y científica para la manipulación y formulación de futuros estudios aplicados en el área de la Fitotecnología.

Considerando que como toda técnica de laboratorio, tiene un porcentaje de error de aproximadamente un 2% (materiales, trabajo de operador, condiciones de ambiente, equipos, etc) se concluye que el (extracto activo y alcaloides quinoleínicos) en los productos “crema y lipogel” puede tener una desviación de $\pm 5\%$.

Los esquemas de estudios de estabilidad física acelerada realizados en el presente trabajo cumplen la normativa elaborada por el Comité Internacional de Armonización (ICH) , relativas a las condiciones en las que deben llevarse a cabo los estudios de estabilidad de nuevos principios activos y medicamentos.

Se concluye además que los productos lipogel elaborados a partir del extracto activo de corteza y alcaloides quinoléinicos principalmente, son la elección indicada, para la forma farmacéutica, por que presentan mayor actividad biológica que los productos crema, son estables físicamente aunque ligeramente irritantes.

Ambas formulaciones fueron estables físicamente en el periodo de estudio y cumplen las especificaciones para formas semisólidas, sin embargo exceptuando el lipogel elaborado de alcaloides quinoléinicos, los demás productos presentan cierto grado de viscosidad, razón por la cual no se pudo realizar sus respectivos Reogramas.

Para concluir, este tipo de estudios sistematizados, permite conocer y manejar la tradición etnobotánica de nuestras culturas que constituye un orgullo para el pueblo Boliviano.

Además promueven el desarrollo de la fitotecnología, principalmente en países como el nuestro donde los recursos naturales son la fuente principal de desarrollo.

6. RECOMENDACIONES

Se sugiere que los estudios farmacocinéticos se realicen en el concentrado de los alcaloides quinolínicos y / o del alcaloide que presente mayor actividad biológica, por que trabajar sobre un extracto crudo de origen vegetal, resulta muy complejo por la presencia de otros componentes que de alguna manera interfieren en los resultados, lo cual hace su valoración extremadamente inexacta.

Se sugiere conocer más sobre las características físico químicas del extracto y / o alcaloides quinolínicos, conociendo además la constante y grado de ionización, coeficiente de partición que es la medida de la lipofilia de un compuesto, y los factores que afectan la transferencia percutánea, condicionan la dosis y la forma farmacéutica final como las características biofarmacéuticas.

La información de estabilidad acelerada debe incluir resultados de los estudios a largo plazo donde se incluirá resultados de por lo menos 3 lotes elaborados a escala piloto, por esta razón se recomienda continuar con el presente estudio.

También será importante desarrollar un método de análisis químico para cuantificar el principio activo, que necesariamente deberá ser estandarizado para que sea repetible y reproducible y por tanto, validado.

Se sugiere además que para las evaluaciones de actividad biológica *in vitro*, frente a promastigotes de *Leishmania* se utilice también como blanco o patrón una muestra de extracto activo de corteza para que la apreciación de los resultados sean más exactos, además de establecer como en todo método analítico el error porcentual de variabilidad, para así valorar los resultados de la actividad biológica *in vitro* con mayor exactitud.

El tipo de trabajo realizado marca el inicio del desarrollo tecnológico por parte de la universidad que en base a la información etnobotánica y medicina tradicional, valida científicamente el uso de plantas medicinales, lo importante sería que se siga financiando y se continúe con las investigaciones y de esta manera la universidad pueda aportar información tecnológica científicamente desarrollada de las especies vegetales, con propiedades farmacológicas, a la Industria Farmacéutica Nacional y ésta a la vez, desarrollar fitomedicamentos potencializando el mercado Nacional con productos eficaces, seguros y a precios accesibles, no solo con la finalidad de lucro sino por el hecho de que países como el nuestro en vías de desarrollo y donde la Leishmaniasis es endémica, sería de mucho valor contar con un fitomedicamentos cuya finalidad sea erradicar este tipo de enfermedad y a la vez ofrecer garantía a los turistas.

Para concluir, el tratamiento para la Leishmaniasis mucocutánea y Leishmaniasis visceral es por vía sistémica, debido a que el parásito se aloja en los cartílagos del macizo facial y en las vísceras (hígado, bazo) por lo que el tratamiento debe ser por vía sistémica y complementado por vía tópica para el caso de la Leishmaniasis mucocutánea, por tanto, la forma farmacéutica propuesta en el presente estudio, es un coadyuvante para el tratamiento de la Leishmaniasis mucocutánea y cutánea ,aunque en esta última la erupción en la piel, muchas veces se cura espontáneamente.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ARTECHE, G. A. ; Y COL. *“La Fitoterapia en Medicina”* 1ª Ed. Bilbao- España. Editorial: CITA. 1992. Pág: 13,14, 21,27, 33, 35.
2. GROS, E. G, POMILLO, A. B; SIELDES, A. M. Y BURTON, G. (1979). *Introducción al Estudio de Productos Naturales*. Serie de química OEA. Washington D.C.
3. ARRAZOLA, S; MORETIC, C, NAESSANY,L. (1990) *“ Plantas Medicinales del Oriente Boliviano”* Publicación de la Facultad de Ciencias y Tecnología, serie científica. UMSS- CBBA- Bolivia. Pág 1,4,7,8.
4. GUTIERREZ, I. (2001). *“Estudio de la Evanta (Galipea longiflora Krause) en la región Amazónica- Andina de Bolivia”*. Tesis de Licenciatura. UAGRM. Santa Cruz de la Sierra-Bolivia.
5. PAZ, N. M. (1998). *“Evaluación de la Actividad Citostática / Citotóxica, Antibacteriana, Antifúngica y cultivos in Vitro de Galipea longiflora Krause”*. Tesina de Licenciatura. UMSA. La Paz- Bolivia.
6. RODRÍGUEZ, M. (2000) *“Determinación de la Actividad Antibacteriana de especies Guaranies y Evaluación de la toxicidad in Vivo de Angostura longiflora Krause Kallunki”* Tesis de Licenciatura. UMSA, La Paz – Bolivia
7. AVILA, I. J. A.(2000) *“Estudio Preclínico de la Evanta Galipea longiflora Krause, mediante modelos toxicocinéticos”* Tesis de Maestría, (UASB) Sucre – Bolivia
8. SALAMANCA, C. E.; (2005) *“Evaluación de la Actividad Biológica in vitro sobre formas parasitarias de tripanosoma Cruzi y Leishmania de Angostura longiflora (Krause) (Kallunki)”* Tesina de Licenciatura UMSA- La Paz –Bolivia
9. GIMENEZ, A. (1996) Valoración Etnobotánica.”*Conservación Ambiental a través de la Valoración Etnobotánica y Etnofarmacológica en Bolivia”*. Revista Boliviana de Química. Vol. 13, Pág. 36, 39, 45, 49.
10. GUTIERREZ, A.(2000) *“Evaluación de Actividades Antifúngicas. Antibacterianas y toxicidad in vitro, en plantas medicinales espontáneas del Jardín Botánico Noel Kempff Mercado”*. Tesis de Licenciatura UEB. Santa Cruz de la Sierra Bolivia.
11. LOPEZ, J. B. Y ION HA, K. W. (2001): *“ Valoración Biológica de Extractos Acuosos de doce especies de plantas medicinales de la chiquitania”*. Tesis de Licenciatura UEB, Santa Cruz de la Sierra – Bolivia.

12. Dirección Ciencia Técnica, Ministerio de Salud Pública MSP- Cuba (1998) "Guía metodológica para Investigación Fitoquímica en Plantas medicinales"; Pág: 53,121
13. BOURDY, G. et. al. (1998). "Guía de salud; Utilización de las plantas medicinales Tacana y de algunos remedios de la farmacia". UMSA, IIFB, IIQ, IBBA,
14. DESJEUX. P., *Leishmaniosis*, (1993), WHO/ CTD/ MIP/ WP, 93,8.
15. FOURNET, A., R. HOCQUEMILLER, F. ROBLOT, A. CAVE; P. RICHOMME & J. BRUNETON. (1993). *Les chimanines, nouvelles quinoleines substituées en 2, isléés d' une plante bolivienne antiparasitaire: Galipea longiflora*. Journal of Natural Products 56(9): 1547.
16. MUÑOZ. O., V. (1987). "Obtención de la fracción y estudio de actividad leishmanicida in vitro sobre promastigotes de la especie vegetal *Munnozia maronii*". Tesis de licenciatura, UMSA, La Paz- Bolivia.
17. PAREDES LARREA, M. V., J. RIOS BARRAGÁN & R. ANGLÉS. (1997) "Manual de normas Técnicas y procedimientos para vigilancia y control de la Leishmaniasis". Hepta Producciones, La Paz.
18. GIMENEZ, A. (1998): "Utilización de Plantas Medicinales Tacana y algunos remedios de la farmacia" 1º.Ed. Amigos del Libro. La Paz – Bolivia. Pág. 139, 146.
19. GUENECHEA. S.J. 1992 "La Fitoterapia en Farmacia" en Fitoterapia en Medicina. 1º Ed. CITA
20. UMSA: IIFB, IIQ, IBBA, ORSTOM, CIPTA. "Conservación ambiental a través de la valoración etnobotánica y etnofarmacológica en Bolivia II. " Estudio en la étnia Tacana 1996
21. KILLEN, T.E., GARCIA & S. BEECK (1993) "Guía de árboles de Bolivia". 1ª Ed., Herbario Nacional de Bolivia/ Missouri Botanical Garden. La Paz .
22. KALLUNKI, J.A. & J.R. PIRANI.(1998). "Sinopsis of *Angostura* Roem. & Shult. and *Conchocarpus* J.C. Mikan (Retaceae). Kew Bulletin 53(2):257-334.
23. GENTRY, A.H.1993." A Field Guide to the Families and Genera Of Woody Plants of Northwest South America" Conservación International, Washington. D.C.


24. FLORES. Q. E. N. (2000) *“Metabolitos bioactivos aislados de cinco especies Piper con Actividad Antifúngica y /o Leishmanicida”* Tesis de maestría Universidad de La Laguna- Instituto Bioorgánico “Antonio Gonzáles”- UMSA- La Paz - Bolivia
25. Andersen, K.et.al.(1990) “ Detectión of leishmania in the blood of early Kala - azar patients with the aid of the polymerase chain redaction” 133-135
26. TACANA (1999) *Ecuánasha aquí, ecuanasha id’rene cuana, me schnapaque (conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas)”* Editores: UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA-EIA. La Paz- Bolivia
27. VILA, J. L. (2001) *Tecnología Farmacéutica*, Vol. II. Madrid. Ed. Síntesis : 51,52
28. NAVARRO, G. (1997) *“Contribución a la clasificación ecológica y florista de los bosques de Bolivia”*, Rev. Boliviana de ecolg y cons. ambiental. 3 - 37
29. GIMENEZ, A; RUIZ, G; VARGAS, F; (2004) *“Manual de técnicas de laboratorio para la evaluación de sustancias Tripanocidas y Leishmanicidas”* Ed.Prisa Ltda. La Paz- Bolivia.
30. Norma NRSP312; MIN SAP-Cuba; (1992) *“Extractos fluidos y tinturas. Proceso tecnológico. Medicamentos de origen vegetal. :121*
31. Norma NRSP 309; MIN SAP-Cuba; (1992) *“Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda, métodos de ensayo”*
32. SALAZAR, R. (2001) *Gestión de calidad en el desarrollo y fabricación Industrial de medicamentos*. Barcelona: Romagraf; Vol 1, : 98,108,121,126
33. Norma NC90-13-13.; MIN SAP-Cuba; (1992) *“Aseguramiento petrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH”*
34. Aspectos fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos (2001), Estudios de preformulación.; Cap.1:Ed: Síntesis: 43,44, 57, 58.
35. FERNANDEZ, E. M. (2003). *Técnicas y procedimientos en formulaciones magistrales dermatológicas*. Ed. E.Alía México
36. PONCE. D. LEÓN, L. F.; RODRÍGUEZ. H. A. (2000) ; *“Diseño y Formulación de Emulsiones”*, :Publicación de la Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia :19-21.

37. *“Métodos Microbiológicos aplicados al Control de Calidad de fármacos y cosméticos”*; (2000), Curso de postgrado, Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología
38. Norma Oficial Mexicana NOM- 039-SSA1-(1993), *“Bienes y servicios. Productos de Perfumería y Belleza. Determinación de los Índices de irritación ocular, primaria dérmica y sensibilización”*.
39. PERDAMO. L. Y COL.; (1998).; *“Diseño de Ungüento”*, Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de Habana- Cuba.
40. CHAVEZ C; NOGUEZ M; RUBIO M; BURGOS J.;(2003); *“Reología y sistemas farmacéuticos ”* 1º Ed.; Asociación Farmacéutica Mexicana A.C.; México.
41. TAMAYO Y TAMAYO. ; (1995); *“El Proceso de la Investigación Científica”* 3º Ed. Limusa, S.A. de C. V. México

APENDICE

APENDICE Nº 1

FICHA TÉCNICA O EXPEDIENTE DEL EXTRACTO DICLOROMETANICO ACTIVO
DE CORTEZA

| | | |
|---|---|---|
| <p>IIFB Instituto Investigación Fármaco - Bioquímico</p> | <p>ESTUDIO FISICO -QUIMICO DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE CORTEZA</p> |  |
|---|---|---|

DATOS DE PREFORMULACIÓN

Investigador / es: _____

Fecha de inicio: _____

Nomenclatura

Nombre INN del compuesto: _ *Galipea longiflora* Krause_ "evanta" _ _

Nombre químico: Quinoleinas Alquílicas - Arílicas_ _

Número de lote: _ _ _ _0001 corteza_ _ _ _ _

Fórmula estructural:

Al tratarse de un extracto orgánico, diclorometánico, es una mezcla de todos los compuestos propios de de una especie vegetal

Alcaloides presentes en la corteza:

| | |
|--|--------|
| 2- fenilquinoleína | 47,7% |
| 4- Metoxi-2- fenilquinoleína | 2,8 % |
| 2- (3, 4 – dimetoxifeniletilquinolina | 1,1 % |
| 2- (3, 4 – metilen dioxifeniletilquinolina | 10,2 % |
| 4 – metoxi- 2 – (3' , 4' - dioxifeniletil | 3,1 % |
| 4 – metoxi- 2- n- pentilquinolina | 1,0 % |
| 2 – n – pentilquinolina | 2,4 % |
| 2 – n – propilquinolina | 1,3 % |
| Chimanina A | 2,4 % |

CARACTERES ORGANOLÉPTICOS DEL EXTRACTO ACTIVO**Aspecto y Color:**

Material pastoso, semisólido a temperatura ambiente, con presencia de cristales, color café pardo y líquido aceitoso a temperatura de 30°C

Olor:

Característico a tierra

Sabor:

Picante, amargo, aceitoso

CARACTERES FÍSICOS DEL EXTRACTO ACTIVO**Ablandamiento:**

Características especiales de ablandamiento: A temperatura ambiente (15°C) tiene consistencia pastosa, a temperatura de 25 – 30 °C se diluye, transformándose en un líquido café – pardo, aceitoso.

Contenido en agua : (humedad Karl Fischer): 3,1975 %

Sólidos totales: 8,69

Residuos sólidos: 2,0

Índice de refracción: 1,335

Cromatografía en capa fina TLC :

El extracto deberá diluirse en dicloro metano para la aplicación en cromatoplaaca y el sistema de elución debe ser éter de petróleo / acetato de etilo (9 / 1) ó (7 / 3).

Cromatografía por Espectroscopia :

La concentración óptima para observar el espectro de absorción a las longitudes de onda de (234, 262, 331) nm deberá ser: 0.01333 mg/ mL y el barrido será en intervalos de longitudes de onda de 180 – 400 nm.

Evaluación Estabilidad acelerada**Temperatura, humedad y diferentes medios**

| Condición Exposición | Tiempo | % Recuperado Degradación | % Productos | Aspecto |
|----------------------|---------|--------------------------|-------------|------------|
| 45°C / 75 %H | 3 meses | - | - | Sin cambio |
| 37°C° | 6 meses | | | Sin cambio |
| 4°C | 3 meses | - | - | Sin cambio |

Estabilidad a la luz

| | Lámpara U.V. | |
|----------------------|---------------------|--|
| Aspecto | Sin cambio aparente | |
| % bioactivo: | - | |
| % Prod. Degradación: | - | |

Conclusiones

APENDICE Nº 2
FICHA TÉCNICA O EXPEDIENTE DEL ALCALOIDE QUINOLEINICO

IIFB
 Instituto
 Investigación
 Fármaco -
 Bioquímico

**ESTUDIO FISICO QUIMICO
 DE ALCALOIDES QUINOLEINICOS
 (ALQUÍLICOS - ARÍLICOS)**



DATOS DE PREFORMULACIÓN:

Investigador / es: -----

Fecha de inicio: -----

Nomenclatura

Nombre INN del compuesto: _ *Galipea longiflora* Krause_ "evanta" _ _

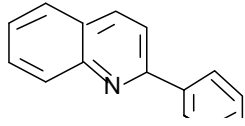
Nombre químico: Quinoleinas Alquílicas - Arílicas _ _

Número de lote: 0001 concentrado de alcaloides quinoleínicos
 (alquílicos – arílicos)

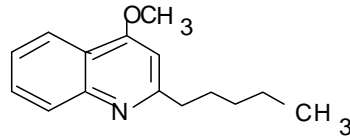
Fórmula estructural:

Al tratarse del concentrado de los alcaloides totales de la *Galipea longiflora* Krause "Evanta" se considera también una mezcla de todos los alcaloides presentes en la corteza

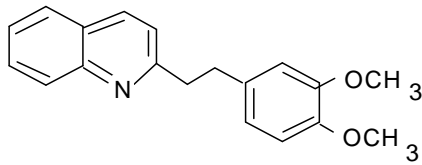
ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS ALCALOIDES PRESENTES EN LA CORTEZA



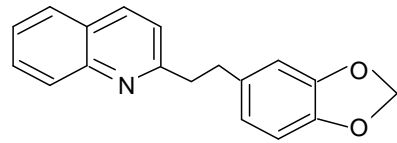
2-fenil-quinolina



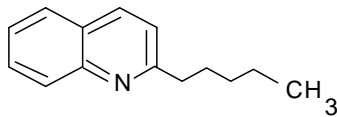
4 -Metoxi-2-n- pentil-quinolina



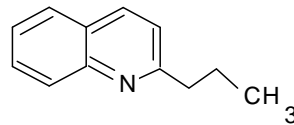
2-(3,4- Dimetoxifeniletíl)- quinolina



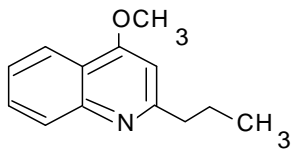
2-(3,4-Metilendioxifenil-etil)-quinolina



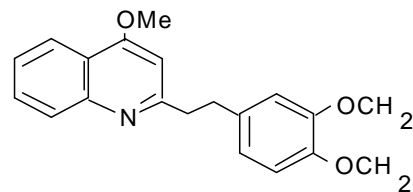
2-n-pentil- quinolina



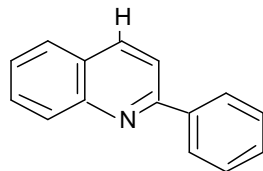
2-n-propil-quinolina



CHIMANINA - A



4-metoxi-2-n-(3',4'metilendioxifeniletíl)quinolina



4-metoxi-2-fenilquinolina

CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS

Aspecto y Color:

material sólido - pastoso seco a temperatura ambiente de 15°C, con presencia de cristales color café amarillento, y a temperatura de 25 ° - 30° C tiene consistencia líquida, color café pardo, aceitoso

Olor: característico picante

Sabor: picante amargo

Fotografía de concentrado de alcaloide totales (quinoleínas alquílicas – arílicas)



CARACTERES FISICOS

Ablandamiento:

Características especiales de ablandamiento: A temperatura ambiente 15°C tiene consistencia pastosa, seca, a temperatura de 25° – 30 °C se diluye, transformándose en un líquido café pardo, aceitoso

Contenido en agua (humedad Karl Fischer): 2,37 %

Sólidos totales: 4,73

Residuos Sólidos: 0,9

Índice de refracción: 1,334

Cromatografía en capa fina TLC :

El concentrado de alcaloides totales (quinoleínas alquílicas- arílicas) deberá diluirse en dicloro metano para la aplicación en la cromatoplaça, el sistema de elución debe ser éter de petróleo / acetato de etilo (9 / 1) ó (7 / 3)

Cromatografía por Espectroscopía :

La concentración óptima para observar el espectro de absorción a las longitudes de onda de (234, 262, 331) nm. deberá ser : 0.0133 mg/ mL y el barrido será en intervalos de longitudes de onda de 180 – 400 nm.

Evaluación Estabilidad acelerada

Temperatura, humedad y diferentes medios

| Condición Exposición | Tiempo | % Recuperado Degradación | % Productos | Aspecto |
|----------------------|---------|--------------------------|-------------|------------|
| 45°C / 75 %H | 3 meses | - | - | Sin cambio |
| 37°C | 6 meses | - | - | Sin cambio |
| 4°C | 3 meses | - | - | Sin cambio |

Estabilidad a la luz

| | | |
|----------------------|---------------------|--|
| | Lámpara U.V. | |
| Aspecto | Sin cambio aparente | |
| % bioactivo: | | |
| % Degradación: Prod. | | |

Conclusiones _____

APENDICE Nº 3
FICHA TÉCNICA GENERAL DE PRODUCCIÓN “ LIPOGEL ”

| I.I.F.B. – UMSA | | | |
|--|--|----------|---------------------------|
| INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS | | | |
| AREA DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA | | | |
| FICHA TECNICA DE PRODUCCION | | | |
| PRODUCTO : <i>Lipogel de Evanta (Galipea longiflora Krause)</i> | | | LOTE : 001 |
| PRESENTACION : <i>Pomo de 42g</i> | | | FECHA : 02 – 05 |
| CODIGO DE PRODUTO : <i>LGE</i> | LOTE : <i>200 cc.(5 pomos)</i> | | HOJA Nº : 1 |
| FORMULA MAESTRA Nº 2 : | | | PROD.: <i>Escala Lab.</i> |
| FORMULA <i>Cualitativa 100 cc.</i> | | | |
| CODIGO | MATERIA PRIMA | CANTIDAD | Nº CONTROL |
| | <i>Alcohol Cetílico</i> | 5,0 % | |
| | <i>Alcohol Estearílico</i> | 8,0 % | |
| | <i>Carbopol 940</i> | 0,1% | |
| | <i>Propilenglicol</i> | 6,0 % | |
| | <i>Metilparabeno</i> | 0,2 % | |
| | <i>Propilparabeno</i> | 0,1 % | |
| | <i>Aceite de oliva</i> | 5,0 % | |
| | <i>Trietanolamina</i> | 0,7 % | |
| | <i>Extracto activo ó alcaloides quinolínicos</i> | 5,0 % | |
| | <i>Polisorbato 80</i> | 2,0 % | |
| | <i>Agua Destilada</i> | c. s. p. | |
| MATERIAL PESADO POR : | | | |
| MATERIAL IDENTIFICADO | SI | NO | |
| PRECAUCIONES : | | | |
| <i>Mantener las condiciones de higiene recomendadas</i> <i>Acondicionar las etiquetas después de producción</i> <i>Emplear normas BPM durante el proceso de producción</i> | | | |
| MATERIALES : | | | |
| <i>Vasos precipitados de acero inoxidable de capacidad adecuada</i> <i>Pipetas de vidrio de 1, 5, 10 ml.</i> <i>Probetas de 50 y 100 ml.</i> | | | |

APENDICE Nº 4

FICHA TÉCNICA GENERAL DE PRODUCCIÓN “EMULSIÓN CREMA”

| I.I.F.B. – UMSA | | | |
|---|--|----------|---------------------------|
| INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS | | | |
| AREA DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA | | | |
| FICHA TECNICA DE PRODUCCION | | | |
| PRODUCTO : <i>Emulsión Crema Evanta (Galipea longiflora Krause)</i> | | | LOTE : 001 |
| PRESENTACION : <i>Pomos de 42 g.</i> | | | FECHA : 02 – 05 |
| CODIGO DE PRODUTO : <i>ECE</i> | LOTE : <i>200 cc.(5 pomos)</i> | | HOJA Nº : 1 |
| FORMULA MAESTRA Nº 1 : | | | PROD.: <i>Escala Lab.</i> |
| FORMULA : <i>Cualitativa para 100 cc.</i> | | | |
| CODIGO | MATERIA PRIMA | CANTIDAD | Nº CONTROL |
| | <i>Alcohol Cetílico</i> | 5,5 % | |
| | <i>Alcohol Estearílico</i> | 5,5 % | |
| | <i>Laurilsulfato de Sodio</i> | 2,5 % | |
| | <i>Vaselina Sólida</i> | 5,5 % | |
| | <i>Propilenglicol</i> | 10,0 % | |
| | <i>Metilparabeno</i> | 0,2 % | |
| | <i>Propilparabeno</i> | 0,1 % | |
| | <i>EDTA</i> | 0,01 % | |
| | <i>Extracto activo ó</i> <i>Alcaloides quinolínicos</i> | 5,0 % | |
| | <i>Agua Destilada</i> | c. s. p. | |
| MATERIAL PESADO POR : | | | |
| MATERIAL IDENTIFICADO : | | SI : | NO : |
| PRECAUCIONES : | | | |
| <p align="center"><i>Mantener las condiciones de higiene recomendadas</i> <i>Acondicionar las etiquetas después de producción</i> <i>Emplear normas BPM durante el proceso de producción</i></p> | | | |
| MATERIALES : | | | |
| <p align="center"><i>Vasos precipitados de acero inoxidable de capacidad adecuada</i> <i>Pipetas de vidrio de 1, 5, 10 ml.</i> <i>Probetas de 50 y 100 ml.</i> <i>Espátulas</i> <i>Termómetro (De 0 a 100 °C)</i> <i>Hornilla</i> <i>Varillas</i></p> | | | |

APENDICE Nº 5
FORMULA MAESTRA “EMULSIÓN CREMA”

| CREMA - EXTRACTO ACTIVO DE EVANTA |
|---|
| PROTOCOLO DE MANUFACTURA |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Realizar la limpieza de todo el material a utilizar</i> 2. <i>Realizar el pesaje de los excipientes</i> 3. <i>Separar los excipientes de fase oleosa</i> 4. <i>Separar los excipientes de fase acuosa</i> 5. <i>Preparar y pesar el bioactivo</i> 6. <i>Calentar ambas fases a temperatura de 70°C</i> 7. <i>Añadir lentamente la fase acuosa sobre la fase oleosa</i> 8. <i>Añadir el extracto activo, previamente calentado a no más de 30°C</i> 9. <i>Agitar constantemente hasta enfriamiento</i> 10. <i>Acondicionar los envases plásticos y añadir la emulsión crema</i> 11. <i>Controlar el peso</i> 12. <i>Identificar los envases con las etiquetas</i> |
| <p>Observaciones: <i>La preparación de la " emulsión crema" es a escala laboratorio, por tanto el material a utilizar, excipientes, forma de preparación, etiquetas, envases, son a prueba, hasta confirmar con los estudios a escala piloto.</i></p> |
| ACONDICIONAMIENTO |
| <p><i>El envase primario es de polipropileno, pomos x 40 g, tapa rosca,</i></p> |
| ESPECIFICACIONES DE LA CREMA DE EXTRACTO EVANTA |
| <p>Producto: <i>Emulsión crema</i></p> <p>Bioactivo: <i>extracto activo de corteza</i></p> <p>Lote Nº: <i>0001</i></p> <p>Envase: <i>pomo x 40 g</i></p> |

Parámetros Organolépticos

Aspecto: *semisólido*

Color: *amarillo verdoso*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : 6,2

Viscosidad: 6661,66 cps

Densidad: 0,496 g/L

Identificación del principio activo: *(en proceso de desarrollo)*

Valoración microbiológica

Límites microbianos

Escherichia Coli

* Ausencia en 1 g

Salmonella

* Ausencia en 10 g

Pseudomona aeruginosa

** Ausencia en 1 g

Staphylococcus Aureus.

** Ausencia en 1 g

Hongos /lev.

* Menor a 10⁴ UFC / g

* Farmacopea Europea 1997, productos a base de plantas

** Parámetros microbiológicos para productos farmacéuticos (disposición ANMAT 3908 / 98 anexo 1)

Actividad Biológica: LEHISMANIA IC 50 ug / ml

PH8 (L. amazonensis)

M2903 (L. brasiliensis)

PP75 (L. donovani)

72, 6

100, 9

125

**PRUEBAS PRELIMINARES DE CONTROL DE CALIDAD
CREMA DE EXTRACTO ACTIVO DE EVANTA**

Parámetros organolépticos:

Aspecto: *Ninguna modificación visible*

Color: *amarillo verdoso*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : *6,2*

Viscosidad: *6661,66 cps*

Densidad: *0,496 g /L*

Identificación del principio activo: (en proceso de desarrollo)

Valoración microbiológica

Límites microbianos

Escherichia Coli

ausencia

Salmonella

ausencia

Pseudomona Aeruginosa

ausencia

Staphylococcus Aureus

ausencia

Hongos / lev.

ausencia

APENDICE Nº 6
FORMULA MAESTRA "LIPOGEL"

LIPOGEL - EXTRACTO DE EVANTA

PROTOCOLO DE MANUFACTURA

1. *Realizar la limpieza de todo el material a utilizar*
2. *Realizar el pesaje de los excipientes*
3. *Separar los excipientes de fase oleosa*
4. *Separar los excipientes de fase acuosa*
5. *Preparar y pesar el bioactivo*
6. *Remojar el carbopol en agua 30 minutos antes*
7. *Calentar ambas fases a temperatura de 70°C*
8. *Añadir lentamente la fase acuosa sobre la fase oleosa*
9. *Añadir el extracto activo de corteza previamente calentado a no más de 30°C*
10. *Añadir trietanolamina*
11. *Agitar constantemente hasta enfriamiento*
12. *Acondicionar los envases plásticos y añadir el lipogel*
13. *Controlar el peso*
14. *Identificar los envases con las etiquetas*

Observaciones: *La preparación de " Lipogel " es a escala laboratorio, por tanto el material a utilizar, excipientes, forma de preparación, etiquetas, envases, son a prueba, hasta confirmar con los estudios a escala piloto.*

ACONDICIONAMIENTO

El envase primario es de polipropileno, (plástico) pomos x 40 g, tapa rosca,

ESPECIFICACIONES DE LIPOGEL DE EXTRACTO ACTIVO DE EVANTA

Producto: *Lipogel*

Bioactivo: *extracto activo de corteza*

Lote N°: *0001*

Envase: *pomo x 40 g*

Parámetros organolépticos:

Aspecto: *semisólido*

Color: *amarillo claro*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : *8,0*

Viscosidad: *193,66 cps*

Densidad: *0,960 g/L*

Identificación del principio activo: *(en proceso de desarrollo)*

Valoración microbiológica**Límites microbianos**

Escherichia Coli

** Ausencia en 1 g*

Salmonella

** Ausencia en 10 g*

Pseudomonas aeruginosa

*** Ausencia en 1 g*

Staphylococcus Aureus.

*** Ausencia en 1 g*

Hongos /lev.

** Menor a 10⁴ UFC / g*

** Farmacopea Europea 1997, productos a base de plantas*

*** Parámetros microbiológicos para productos farmacéuticos (disposición ANMAT 3908 / 98 anexo 1)*

Actividad Biológica: **LEHISMANIA IC 50 ug / ml**

PH8 (L. amazonensis)

M2903 (L. brasiliensis)

PP75 (L. donovani)

51,6

55,5

68,0

| PRUEBAS PRELIMINARES DE CONTROL DE CALIDAD | |
|--|----------------------------|
| LIPOGEL DE EXTRACTO ACTIVO DE EVANTA | |
| Parámetros organolépticos: | |
| Aspecto: <i>Ninguna modificación visible</i> | |
| Color: <i>amarillo claro</i> | |
| Olor: <i>característico a tierra</i> | |
| Parámetros físico químicos | |
| pH : <i>8,0</i> | |
| Viscosidad: <i>193,66 cps</i> | |
| Densidad: <i>0,960</i> | |
| Identificación del principio activo: <i>(en proceso de desarrollo)</i> | |
| Valoración microbiológica | Límites microbianos |
| <i>Escherichia Coli</i> | <i>ausencia</i> |
| <i>Salmonella</i> | <i>ausencia</i> |
| <i>Pseudomona Aeruginosa</i> | <i>ausencia</i> |
| <i>Staphylococcus Aureus.</i> | <i>ausencia</i> |
| <i>Hongos / lev.</i> | <i>ausencia</i> |

APENDICE Nº 7
FORMULA MAESTRA “EMULSIÓN CREMA”

CREMA – CONCENTRADO DE ALCALOIDES TOTALES
(QUINOLEINAS ALQUILICAS-ARILICAS)

PROTOCOLO DE MANUFACTURA

1. *Realizar la limpieza de todo el material a utilizar*
2. *Realizar el pesaje de los excipientes*
3. *Separar los excipientes de fase oleosa*
4. *Separar los excipientes de fase acuosa*
5. *Preparar y pesar el bioactivo*
6. *Calentar ambas fases a temperatura de 70°C*
7. *Añadir lentamente la fase acuosa sobre la fase oleosa*
8. *Añadir el concentrado de alcaloides quinoleínicos previamente calentado a no más de 30°C*
9. *Agitar constantemente hasta enfriamiento*
10. *Acondicionar los envases plásticos y añadir la emulsión crema*
11. *Controlar el peso*
12. *Identificar los envases con las etiquetas*

Observaciones: *La preparación de la “ emulsión crema” es a escala laboratorio, por tanto el material a utilizar, excipientes, forma de preparación, etiquetas, envases, son a prueba, hasta confirmar con los estudios a escala piloto.*

ACONDICIONAMIENTO

El envase primario es de polipropileno, pomos x 40 g, tapa rosca,

ESPECIFICACIONES DE LA CREMA ALCALOIDES QUINOLEINICOS

Producto: *Emulsión crema*

Bioactivo: *Concentrado de alcaloides totales(quinoleinas alquílicas arílicas)*

Lote N°: *0001*

Envase: *pomo x 40 g*

Parámetros organolépticos:

Aspecto: *semisólido*

Color: *amarillo claro cristalino*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : *6,9*

Viscosidad: *5588,33 cps*

Densidad: *0,870 g/L*

Identificación del principio activo: *(en proceso de desarrollo)*

Valoración microbiológica**Límites microbianos**

Escherichia Coli

** Ausencia en 1 g*

Salmonella

** Ausencia en 10 g*

Pseudomona aeruginosa

*** Ausencia en 1 g*

Staphylococcus Aureus.

***Ausencia en 1 g*

Hongos /lev.

** Menor a 10⁴ UFC / g*

** Farmacopea Europea 1997, productos a base de plantas*

*** Parámetros microbiológicos para productos farmacéuticos (disposición ANMAT 3908 / 98 anexo 1)*

Actividad Biológica: **LEHISMANIA IC 50 ug / ml**

PH8 (L. amazonensis)

M2903 (L. brasiliensis)

PP75 (L. donovani)

67,3

37,5

67,3

**PRUEBAS PRELIMINARES DE CONTROL DE CALIDAD
CREMA ALCALOIDES QUINOLEINICOS**

Parámetros organolépticos:

Aspecto: *Ninguna modificación visible*

Color: *amarillo claro cristalino*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : *6,9*

Viscosidad: *5588,33 cps*

Densidad: *0,870*

Identificación del principio activo: *(en proceso de desarrollo)*

Valoración microbiológica

Límites microbianos

Escherichia Coli

ausencia

Salmonella

ausencia

Pseudomona Aeruginosa

ausencia

Staphylococcus Aureus

ausencia

Hongos / lev.

ausencia

APENDICE Nº 8
FORMULA MAESTRA “LIPOGEL”

LIPOGEL – CONCENTRADO DE ALCALOIDES TOTALES
(QUINOLEINAS ALQUÍLICAS- ARÍLICAS)

PROTOCOLO DE MANUFACTURA

1. *Realizar la limpieza de todo el material a utilizar*
2. *Realizar el pesaje de los excipientes*
3. *Separar los excipientes de fase oleosa*
4. *Separar los excipientes de fase acuosa*
5. *Preparar y pesar el bioactivo*
6. *Remojar 30 minutos antes, el carbopol en agua*
7. *Calentar ambas fases a temperatura de 70°C*
8. *Añadir lentamente la fase acuosa sobre la fase oleosa*
9. *Añadir el concentrado de alcaloides quinoleínicos previamente calentado a no más de 30°C*
10. *Añadir trietanolamina*
11. *Agitar constantemente hasta enfriamiento*
12. *Acondicionar los envases plásticos y añadir el lipogel*
13. *Controlar el peso*
14. *Identificar los envases con las etiquetas*

Observaciones: *La preparación de "Lipogel" es a escala laboratorio, por tanto el material a utilizar, excipientes, forma de preparación, etiquetas, envases, son a prueba, hasta confirmar con los estudios a escala piloto.*

ACONDICIONAMIENTO

El envase primario es de polipropileno, (plástico) pomos x 40 g, tapa rosca,

ESPECIFICACIONES DE LIPOGEL- ALCALOIDES QUINOLEINICOS

Producto: *Lipogel*

Bioactivo: *concentrado de alcaloides totales(quinoleinas Alquílicas- Arílicas)*

Lote N°: *0001*

Envase: *pomo x 40 g*

Parámetros organolépticos:

Aspecto: *Semisólido*

Color: *marfil*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : *8,6*

Viscosidad: *186,66 cps*

Densidad: *0,960*

Identificación del principio activo: *(en proceso de desarrollo)*

Valoración microbiológica**Límites microbianos**

Escherichia Coli

**Ausencia en 1 g*

Salmonella

** Ausencia en 10 g*

Pseudomona aeruginosa

*** Ausencia en 1 g*

Staphylococcus Aureus.

***Ausencia en 1 g*

Hongos /lev.

** Menor a 10⁴ UFC / g*

** Farmacopea Europea 1997, productos a base de plantas*

*** Parámetros microbiológicos para productos farmacéuticos (disposición ANMAT 3908 / 98 anexo 1)*

Actividad Biológica: **LEHISMANIA IC 50 ug / ml**

PH8 (L. amazonensis)

M2903 (L. brasiliensis)

PP75 (L. donovani)

12,5

12,5

21,8

**PRUEBAS PRELIMINARES DE CONTROL DE CALIDAD
– LIPOGEL ALCALOIDES QUINOLEINICOS**

Parámetros organolépticos:

Aspecto: *Ninguna modificación visible*

Color: *marfil*

Olor: *característico a tierra*

Parámetros físico químicos

pH : *8,6*

Viscosidad: *186,66 cps*

Densidad: *0,960*

Identificación del principio activo: *(en proceso de desarrollo)*

Valoración microbiológica

Límites microbianos

Escherichia Coli

ausencia

Salmonella

ausencia

Pseudomona Aeruginosa

ausencia

Staphylococcus Aureus

ausencia

Hongos / lev

ausencia

APENDICE Nº 9

**PLANILLA DE REGISTRO DE DATOS DE ESTABILIDAD FISICA
DE EMULSIÓN CREMA (EXTRACTO)**

| | |
|--|--|
| <p>Producto: <i>emulsión crema</i></p> <p>Bioactivo: <i>extracto activo de corteza</i></p> <p>Lote Nº: <i>0001</i></p> <p>Concentración: <i>5 %</i></p> <p>Envase: <i>pomo x 40 g</i></p> <p>Fecha inicial: <i>15-03 – 2005</i></p> <p>Tiempo: <i>3 meses</i></p> <p>Analista:</p> | <p align="center">Condiciones de almacenamiento</p> <p>Temperatura: <i>37°C, 45°C, 4°C,</i></p> <p>Humedad : <i>75%</i></p> |
| <p>Aspecto: <i>Ninguna modificación visible</i></p> <p>Color: <i>amarillo verdoso</i></p> <p>Olor: <i>característico a tierra</i></p> <p>pH : <i>6,2</i></p> <p>Identificación del principio activo: <i>en proceso de desarrollo</i></p> <p>Valoración microbiológica: <i>cumple</i></p> | <p>Comentarios:</p> |

APENDICE N° 10

**PLANILLA DE REGISTRO DE DATOS DE ESTABILIDAD FISICA
DE LIPOGEL (EXTRACTO)**

| | |
|--|--|
| <p>Producto: <i>Lipogel</i></p> <p>Bioactivo: <i>extracto activo de corteza</i></p> <p>Lote N°: <i>0001</i></p> <p>Concentración: <i>5 %</i></p> <p>Envase: <i>pomo x 40 g</i></p> <p>Fecha inicial: <i>15-03 – 2005</i></p> <p>Tiempo: <i>3 meses</i></p> | <p align="center">Condiciones de almacenamiento</p> <p>Temperatura: <i>37°C, 45°C, 4°C,</i></p> <p>Humedad : <i>75%</i></p> |
| <p>Aspecto: <i>Ninguna modificación visible</i></p> <p>Color: <i>amarillo claro</i></p> <p>Olor: <i>característico a tierra</i></p> <p>pH : <i>8,0</i></p> <p>Identificación del principio activo: <i>en proceso de desarrollo</i></p> <p>Valoración microbiológica: <i>cumple</i></p> | <p>Comentarios:</p> |

APENDICE Nº 11

**PLANILLA DE REGISTRO DE DATOS DE ESTABILIDAD FISICA
DE "EMULSIÓN CREMA" DEL CONCENTRADO DE ALCALOIDES TOTALES
(QUINOLEINAS ALQUÍLICAS- ARÍLICAS)**

| | |
|---|--|
| <p>Producto: <i>emulsión crema</i></p> <p>Bioactivo: <i>Quinoleínas alquílicas - arílicas</i></p> <p>Lote Nº: <i>0001</i></p> <p>Concentración: <i>5 %</i></p> <p>Envase: <i>pomo x 40 g</i></p> <p>Fecha inicial: <i>15-03 – 2005</i></p> <p>Tiempo: <i>3 meses</i></p> | <p align="center">Condiciones de almacenamiento</p> <p>Temperatura: <i>37°C, 45°C, 4°C,</i></p> <p>Humedad : <i>75%</i></p> |
| <p>Aspecto: <i>Ninguna modificación visible</i></p> <p>Color: <i>amarillo claro cristalino</i></p> <p>Olor: <i>característico a tierra</i></p> <p>pH : <i>6,9</i></p> <p>Identificación del principio activo: <i>en proceso de desarrollo</i></p> <p>Valoración microbiológica: <i>cumple</i></p> | <p>Comentarios:</p> |

APENDICE Nº 12

**PLANILLA DE REGISTRO DE DATOS DE ESTABILIDAD FISICA
DE “ LIPOGEL ” DEL CONCENTRADO DE ALCALOIDES TOTALES
(QUINOLEÍNA ALQUÍLICAS- ARÍLICAS)**

| | |
|--|--|
| <p>Producto: <i>Lipogel</i></p> <p>Bioactivo: <i>Quinoleínas alquílicas - arílicas</i></p> <p>Lote Nº: <i>0001</i></p> <p>Concentración: <i>5 %</i></p> <p>Envase: <i>pomo x 40 g</i></p> <p>Fecha inicial: <i>15-03 – 2005</i></p> <p>Tiempo: <i>3 meses</i></p> | <p align="center">Condiciones de almacenamiento</p> <p>Temperatura: <i>37°C, 45°C, 4°C,</i></p> <p>Humedad : <i>75%</i></p> |
| <p>Aspecto: <i>Ninguna modificación visible</i></p> <p>Color: <i>marfil</i></p> <p>Olor: <i>característico a tierra</i></p> <p>pH : <i>8,6</i></p> <p>Identificación del principio activo: <i>en proceso de desarrollo</i></p> <p>Valoración microbiológica: <i>cumple</i></p> | <p>Comentarios:</p> |

ANEXOS

ANEXO Nº 1
FIGURA Nº 1
PERCOLADORES DE ACERO INOXIDABLE 316 L



Laboratorio I.I.F.B. Departamento de Fitoquímica

FIGURA Nº 2
ROTAEVAPORADOR



Laboratorio I.I.F.B. Departamento de Fitoquímica

FIGURA N° 3
CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA TOMADA BAJO LUZ UV
DE LOS ALCALOIDES TOTALES (QUINOLEINAS ALQUILICAS – ARILICAS)
CONTROL OSCURO, 1º MES, 2º MES, 3º MES, y a 4°C



FIGURA N° 4
CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA DEL EXTRACTO ACTIVO TOMADA BAJO
LUZ UV CONTROL OSCURO, 1º MES, 2º MES, 3º MES , y a 4°C



FIGURA Nº 5
REFRACTOMETRO



Gentileza Laboratorios INTI

FIGURA Nº 6
CÁMARA PARA ESTUDIOS DE ESTABILIDAD
CON CONTROL DE TEMPERATURA, HUMEDAD, Y LAMPARA ULTRA VIOLETA



Gentileza Laboratorios INTI

FIGURA N° 7

CAMARA DE ESTABILIDAD VISTA POR DENTRO CON MUESTRAS
EXTRACTO ACTIVO Y CONCENTRADO DE ALCALOIDES TOTALES
(QUINOLEINAS ALQUÍLICAS – ARILICAS)



Gentileza Laboratorio INTI

FIGURA N° 8

POTENCIOMETRO METROHM HERISAU E 510

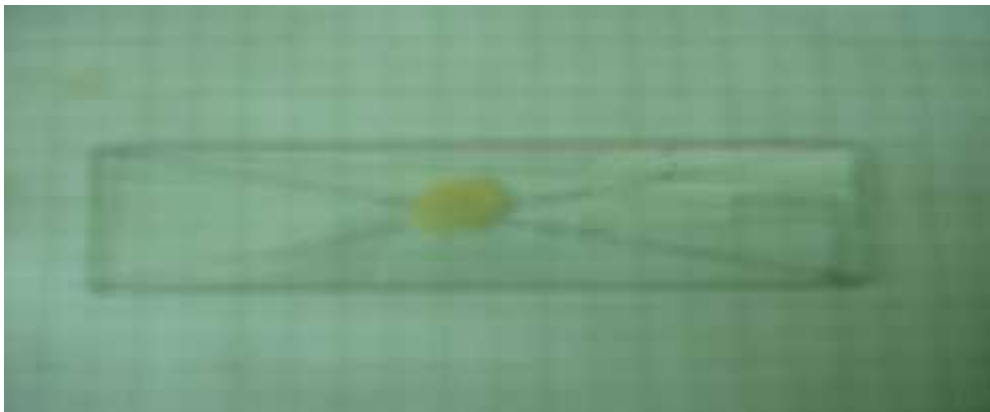


Gentileza Laboratorio INTI

FIGURA N° 9
VISCOSIMETRO DE "BROKFIELD"



Gentileza Laboratorio INTI

FIGURA Nº 10**DETERMINACION DE EXTENSIBILIDAD EN LAS MUESTRAS**

Laboratorio I.I.F.B.

FIGURA Nº 11**FILTRO MILLIPORE SWINNEX – 25**

Laboratorio I.I.F.B.

FIGURA Nº 12
CEPOS QUE SE UTILIZARON PARA EL ENSAYO DE
IRRITABILIDAD DÉRMICA



Bioterio Facultad de Bioquímica –Farmacia – UMSA

ANEXO N° 2
FICHA TECNICA
PROPILEN GLICOL



Certificado de Análisis

PROPYLENE GLYCOL USP

| | | |
|---------------------|---|----------|
| Quantity | : | 5940 Kg. |
| Lot No | : | TQ30017T |
| Date of manufacture | : | Jan. 03 |
| Re - Test Date | : | Feb. 04 |

THIS IS TO CERTIFY THAT THE QUALITY OF SUBJECT MATERIAL IS AS FOLLOWS:

| ITEM | RESULT |
|--|--------------|
| Acid value | 10 |
| DPG | 0.020 % wt |
| Water | 0.017 % wt |
| Colour (Apha) | < 5 |
| Specific gravity | Complies |
| Iron | Max 0.50 ppm |
| Ashes | Max 50 ppm |
| Chlorides | Max 1.0 ppm |
| Arsenic | Max 1.0 ppm |
| Heavy metals | Max 5.0 ppm |
| Sulfate | Max 60.0 ppm |
| Purity | 99.80 % wt |
| CONCLUSION: THE SUBJECT MATERIAL CONFORMS TO THE REQUIRED STANDARDS. | |

Nota.- Todos los datos mencionados en dicho certificado de análisis, son los proporcionados por el proveedor

litel

Laboratorio Industrial

Km. 5 carr. ant. a Caba, Av. Periodista
Tel.: 33 9595 • Fax: | 391-3 | 33 9696
e-mail: litel@conas.com.bo
Pág. Web: www.telchi.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

Farmacia y Droguería

Libertad 164
Tel.: 36 5555 • Fax: | 391-3 | 33 9719
e-mail: telchi@conas.com.bo
Casilla 201
Pág. Web: www.telchi.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

ANEXO N° 3
FICHA TECNICA
ALCOHOL CETILICO



Certificado de Análisis

ALCOHOL CETILICO

| Determinación | Método | Resultado |
|----------------------|-----------|-------------------|
| Contenido de alcohol | gc | 96.6 % |
| Color | din 53409 | 5. hazen |
| Valor ester | 600 - 33 | 0.26 mg. koh / g. |
| Valor acido | 600 - 31 | 0.00 mg. koh / g. |
| Contenido de agua | din 51777 | 0.01 % |
| Valor de yodo | 600 - 39 | 0.14 mg. koh/mg. |

Nota.- Todos los datos mencionados en dicho certificado de análisis, son los proporcionados por el proveedor

litel

Laboratorio Industrial

Km. 5 cns. car. a Cbba., Av. Periodista
Tel.: 33 9595 • Fax: (591-3) 33 9696
e-mail: litel@cofas.com.bo
Pág. Web: www.telchi.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

Farmacia y Droguería

libertad 164
Tel.: 36 5555 • Fax: (591-3) 33 9719
e-mail: telchi@cofas.com.bo
Casilla 201
Pág. Web: www.telchi.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

ANEXO Nº 4
FICHA TECNICA
LAURILSULFATO DE SODIO



Certificado de Análisis

SODIUM LAURYL SULFATE POWDER

| | | |
|------------------------------|--|--------------------------------|
| Quantity | | 200 Kgs |
| Packing | | in 20 Kgs. net kraft paper bag |
| Origin | | P.R.China |
| Date of manufacture | | aug. 2003 |
| Date reported | | aug. 12, 2003 |
| As per contract No. ZX603396 | | |

THIS IS TO CERTIFY THAT THE QUALITY OF SUBJECT MATERIAL IS AS FOLLOWS:

| ITEM | STANDARD | RESULT |
|--|--|--------|
| Appearance | White or slight yellow Powder, not lump. | Fine |
| Active matter | 90.0 % min | 90.6 % |
| Unsulfated material | 3.0 % max | 0.3 % |
| Sodium chloride | 3.0 % max | 0.8 % |
| Sodium sulfate | 3.0 % max | 0.8 % |
| Water | 2.0 % max | 1.4 % |
| PH value (1% in water) | 7.5 - 9.5 | 8.8 |
| White degree | 85 min | 89 |
| Weight | Conform to the standard | Fine |
| Indication | Conform to the standard | Fine |
| CONCLUSION: THE SUBJECT MATERIAL CONFORMS TO THE REQUIRED STANDARDS. | | |

Nota.- Todos los datos mencionados en dicho certificado de análisis, son los proporcionados por el proveedor

litel

Laboratorio Industrial

Km. 5 con opt. a Ciriza, Av. Paravista
 Tel.: 53 9595 • Fax: 1 591-3 153 9696
 e-mail: litel@cotas.com.bo
 Pág. Web: www.telchi.com.bo
 Santa Cruz, Bolivia

Farmacia y Droguería

libertad 164
 tel.: 36 5555 • Fax: 1 591-3 13 9719
 e-mail: telchi@cotas.com.bo
 Casilla 201
 Pág. Web: www.telchi.com.bo
 Santa Cruz, Bolivia

ANEXO N° 5
FICHA TECNICA
GLICERINA



Certificado de Análisis

GLICERINA USP MIN 99.5%

| | |
|--------------------|--------------|
| Peso neto | 20.000 Kílos |
| Batch No. | G 13040401 |
| Manufacturing Date | 10-04-2004 |
| Shelf life | 1 year |

THIS IS TO CERTIFY THAT THE QUALITY OF SUBJECT MATERIAL IS AS FOLLOWS:

| SPECIFICATION | RESULT |
|---|------------------------------------|
| Physical description | Clear, colourless liquid (viscous) |
| Acidity / alkalinity (ml) | 0.07 |
| Aldehydes (ppm) | < 5 |
| Appearance | meets test |
| Assay (%) | 99.9 |
| Chloride (ppm) | 5 |
| Colour (alpha) | 1 |
| Esters (ml) | 9.0 |
| Halogenated compounds (ppm) | < 30 |
| Heavy metals (ppm) | < 5 |
| Identity | meets test |
| Limit of diethylene glycol and related compounds (%) | meets test |
| Refractive index | 1.4739 |
| Sugar | negative |
| Sulphate ash (%) | < 0.01 |
| Water (%) | 0.04 |
| Additional USP requirements: | |
| Fatty acids and esters (ml) | < 1 |
| Organic volatile compounds | meets test |
| Residue on ignition (mg) | < 5 |
| Specific gravity 25° C (g/cm ³) | 1.250 |
| Sulphate (ppm) | < 20 |
| CONCLUSION: | |
| THE ABOVE PRODUCT COMPLIES WITH REQUIRED STANDARD. | |

Nota.- Todos los datos mencionados en dicho certificado de análisis, son los proporcionados por el proveedor

litel

Laboratorio Industrial

Km. 5 sur, ant. a Cobos, Av. Parodiata
Tel.: 33 9305 • Fax: (591 3) 33 9096
email: litel@cofas.com.bo
Pág. Web: www.litel.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

Farmacia y Droguería

libertad 164
Tel.: 06 5555 • Fax: (591 3) 33 9979
email: telchi@cofas.com.bo
Cavilla 201
Pág. Web: www.telchi.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

ANEXO Nº 6
FICHA TECNICA
VASELINA SÓLIDA



Certificado de Análisis

VASELINA BLANCA SOLIDA

| | | |
|----------------------|---|----------------|
| Número de pedido | : | 577995 |
| Factura No. | : | 1344033 |
| Cantidad | : | 15.210 tm |
| No. De lote | : | 305218 |
| Fecha de fabricación | : | 05 - 03 - 2004 |
| Fecha de vencimiento | : | 05 - 03 - 2009 |

CERTIFICAMOS QUE LA CALIDAD DEL MATERIAL ES COMO LO DETALLAMOS:

| ITEM | RESULT |
|--|------------------------|
| Punto de solidificación en el termómetro rotativo | 55.0 °C |
| Punto de gota | 58.9 °C |
| Penetración de cono 25°C | 155 mm/10 |
| Viscosidad cinemática 100°C | 7.1 mm ² /s |
| Color Lovibond (y) | 0.0 |
| Pureza Ph. Eur. | Corresponde |
| USP26 NF21 | Corresponde |
| CONCLUSION: EL MATERIAL ESTA SUJETO CONFORME A NORMAS REQUERIDAS | |

Nota.- Todos los datos mencionados en dicho certificado de análisis, son los proporcionados por el proveedor

litel

Laboratorio Industrial

Km. 5 carr. ant. a Cliza, Av. Paredón
Telf.: 53 9595 • Fax: 591-3 | 53 9696
e-mail: litel@casas.com.bo
Pág. Web: www.telch.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

Farmacia y Droguería

libertad 164
Telf.: 36 5555 • Fax: 591-3 | 33 9719
e-mail: telch@casas.com.bo
Casita 201
Pág. Web: www.telch.com.bo
Santa Cruz, Bolivia

ANEXO N° 7
FICHA TECNICA
ALCOHOL ISOPROPILICO



Certificado de Análisis

ALCOHOL ISOPROPILICO 99.7%

According to Our contract : 4831
 Your contract No. : LIT 535/2003

THIS IS TO CERTIFY THAT THE QUALITY OF SUBJECT MATERIAL IS AS FOLLOWS:

| PARAMETER | UNIT | SPECIFICATION |
|---|--------|---------------|
| Purity | % | min. 99.7 |
| Initial boiling point | °C | min. 81 |
| Density 20/4 | | 0.783 – 0.786 |
| Colour | Apha | max. 10 |
| Dp | °C | max. 83 |
| Water | % | max. 0.2 |
| Non volatile matter | mg/Lt. | max. 20 |
| Acidity (as acetic acid) | ppm | max. 20 |
| CONCLUSION: THE ABOVE PRODUCT COMPLIES WITH REQUIRED STANDARD | | |

Nota.- Todos los datos mencionados en dicho certificado de análisis, son los proporcionados por el proveedor

litel
Laboratorio Industrial

Rta. 5 avda. 2911, a Cbba. Av. Pericallista
 Telf.: 33 9595 • Fax: (591-3) 53 9696
 e-mail: litel@ccpas.com.bo
 Pág. Web: www.telchi.com.bo
 Santa Cruz, Bolivia

Farmacia y Droguería

Edificio 164
 Telf. 36 5555 • Fax: (591-3) 33 9719
 e-mail: telchi@ccpas.com.bo
 Casilla 201
 Pág. Web: www.telchi.com.bo
 Santa Cruz, Bolivia

ANEXO Nº 8
EVALUACIÓN PRUEBA DE IRRITACIÓN EN PIEL DE CONEJOS

| | ERITEMA | CONEJO No. 1 | | | CONEJO No. 2 | | |
|---|--------------------------------------|---------------------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------|-------------|
| | | $\frac{1}{2}$ o 1 HORA | 24 HORAS | 72 HORAS | $\frac{1}{2}$ o 1 HORA | 24 HORAS | 72 HORAS |
| 0 | No eritema | | | | | | |
| 1 | Eritema ligero apenas perceptible | | | | | | |
| 2 | Eritema bien definido | | | | | | |
| 3 | Eritema de moderado a severo | | | | | | |
| 4 | Eritema severo (Rojo betabel) | | | | | | |
| | CALIFICACIÓN MAXIMA | | | | | | |
| | PROMEDIO | | | | | | |

CONEJO Nº 3

| | EDEMA | $\frac{1}{2}$ o 1 HORA | 24 HORAS | 72 HORAS | | | |
|---|---|---------------------------|-------------|-------------|--|--|--|
| | | 0 | No edema | | | | |
| 1 | Edema ligero apenas perceptible | | | | | | |
| 2 | Edema ligero con bordes sobresalientes con elevación definida | | | | | | |
| 3 | Edema moderado, elevación de 1mm | | | | | | |
| 4 | Edema severo, elevación mayor a 1 mm | | | | | | |
| | CALIFICACIÓN MAXIMA | | | | | | |
| | PROMEDIO | | | | | | |

FORMULA DE CÁLCULO DE IRRITACIÓN PRIMARIA

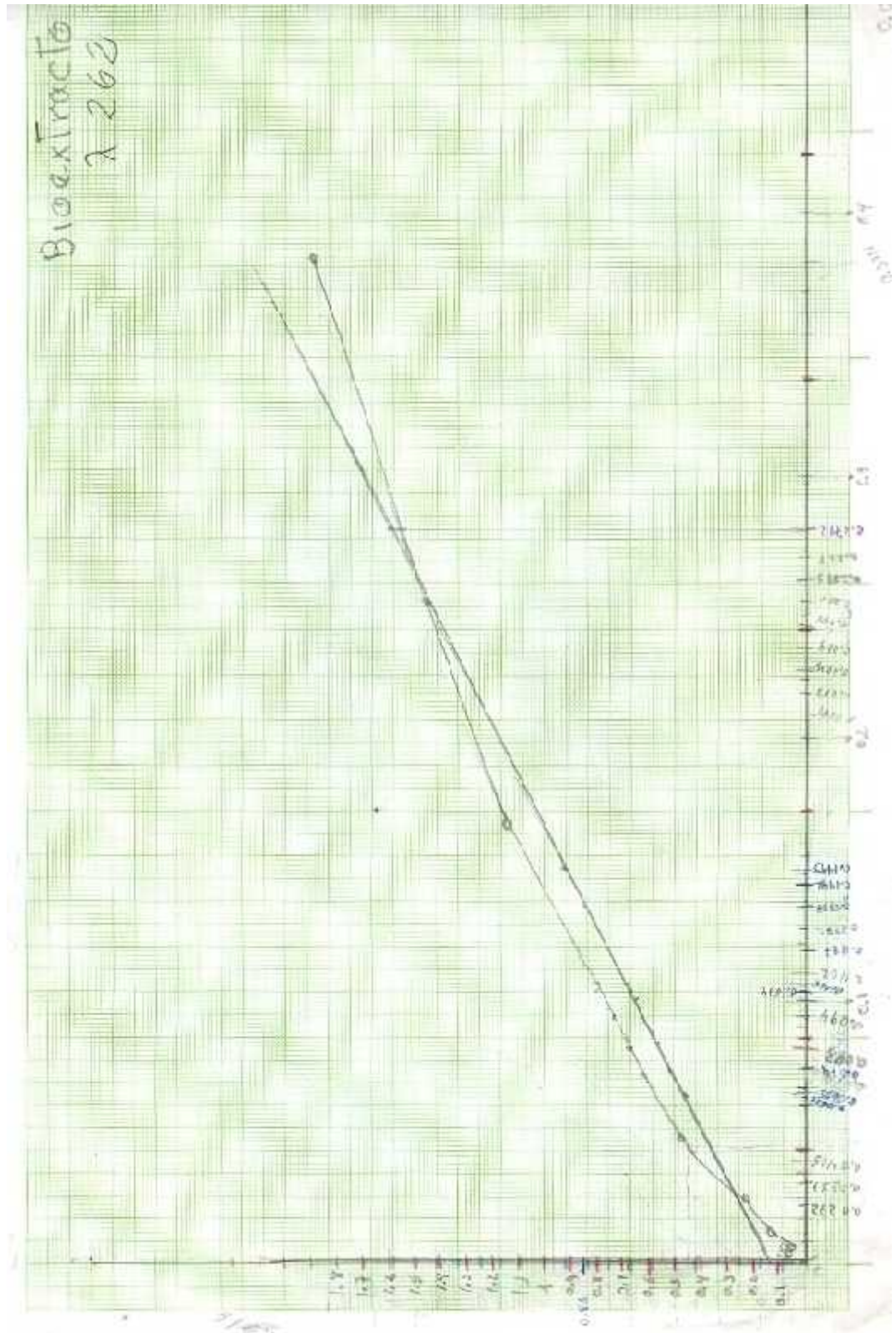
**CÁLCULO DE
IRRITACIÓN PRIMARIA = PROMEDIO DE ERITEMA + PROMEDIO DE EDEMA**

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

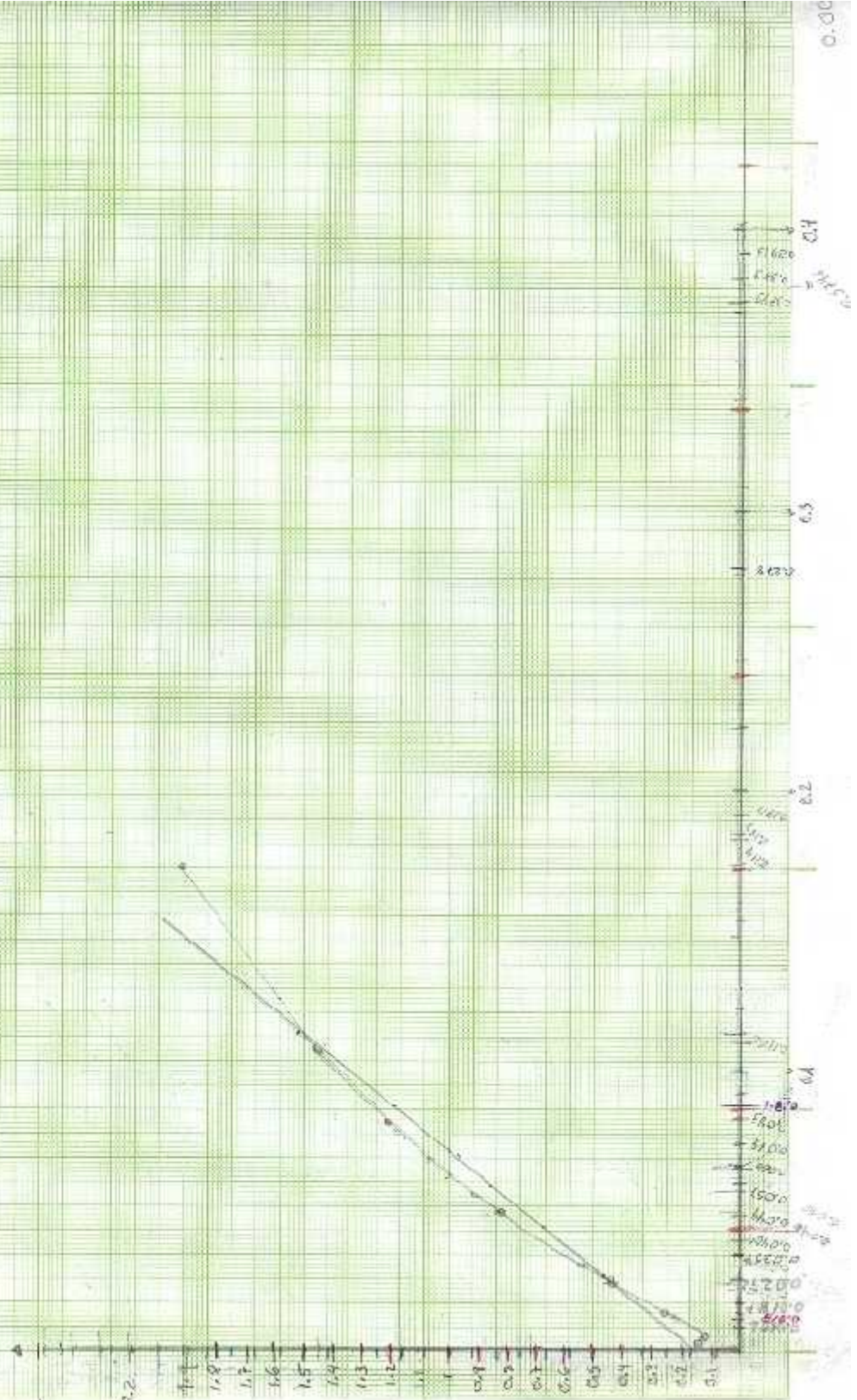
EVALUACIÓN PRUEBA DE IRRITACIÓN EN PIEL DE CONEJOS (PARCHE)

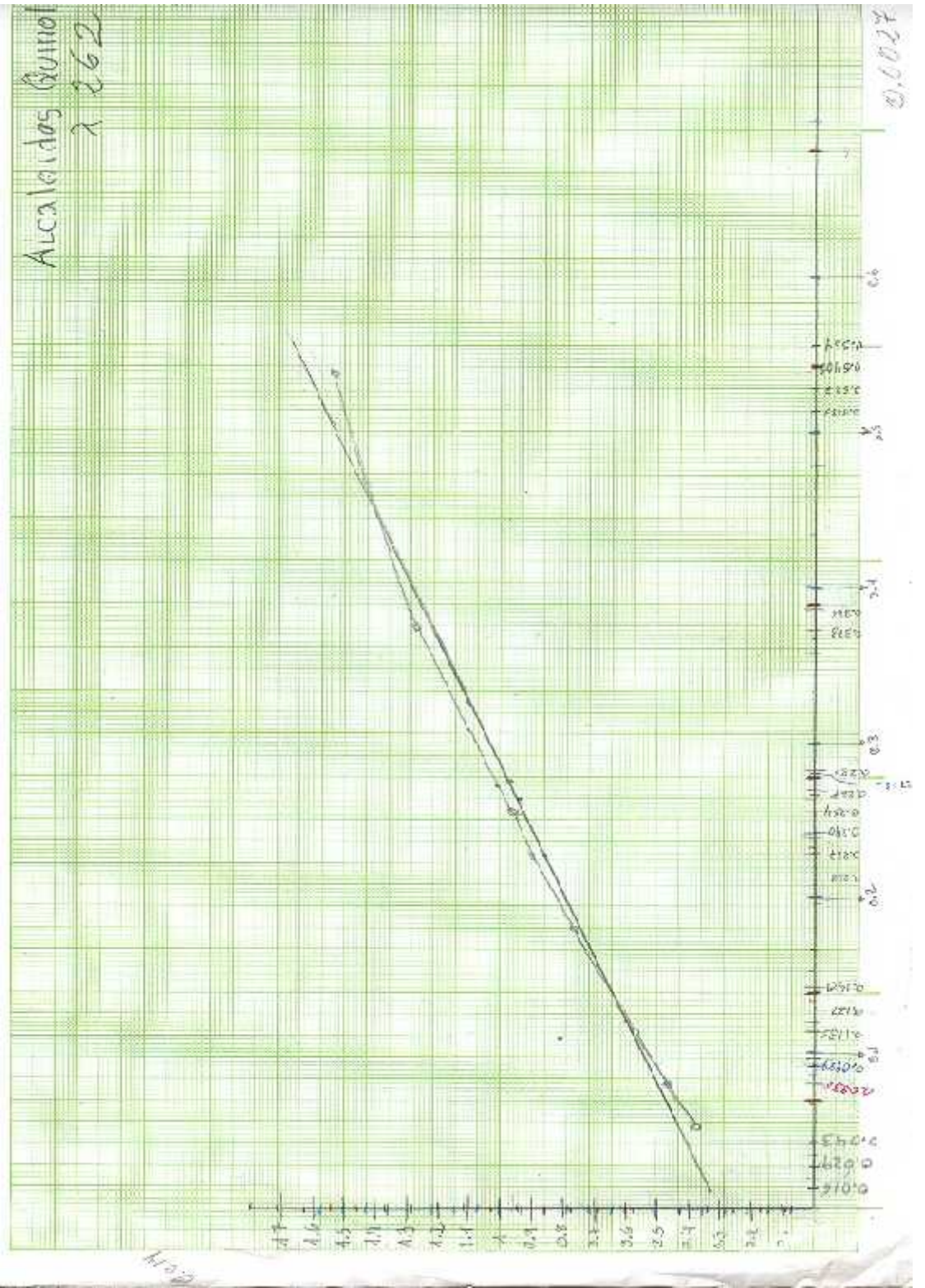
| CATEGORIA | ESCALA |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 0 – 1 | No irritante |
| 1.1 – 2 | Ligeramente irritante |
| 2.1 – 5 | Moderadamente irritante |
| 5.1 – 6 | Irritante de moderado a severo |
| 6.1 – 8 | Irritante severo |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | |

ANEXO Nº 9
CURVAS DE CALIBRACIÓN

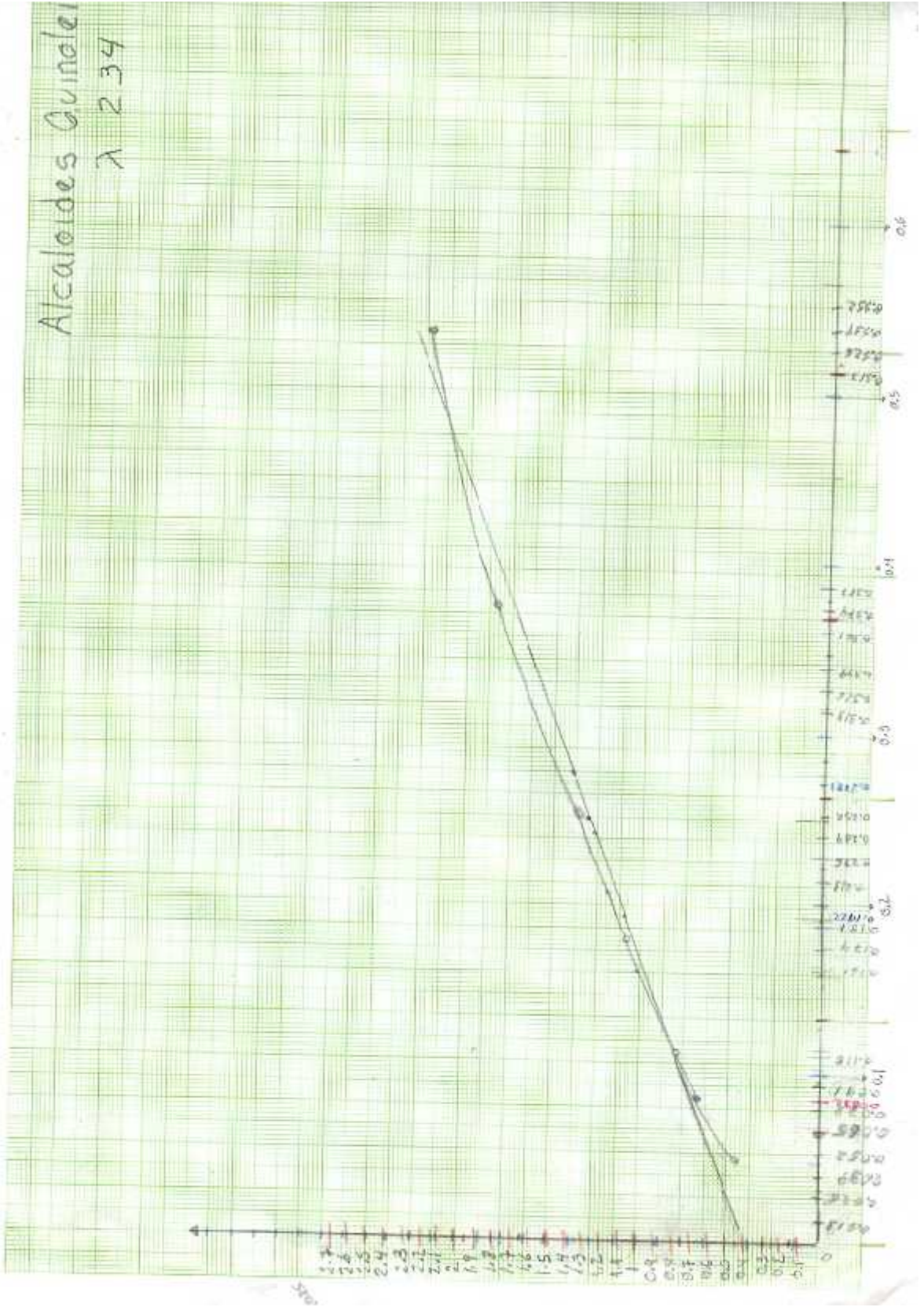


Biaextracto
λ 234





Alcaloides Guinolei
 λ 234



ANEXO Nº 10

GLOSARIO

Fitoterapia

Es la ciencia del tratamiento de las enfermedades por las plantas medicinales, basada en la investigación, el estudio y la experimentación clínica.

Metabolito

Cualquier sustancia que es producida por metabolismo o por un proceso metabólico.

Bioextracto - Bioactivo

Solución extractiva de fitocomplejos de plantas medicinales obtenidos por maceración o percolación de la droga en un solvente (agua, alcohol, etc.) y posterior concentración de la solución por evaporación parcial o total del disolvente, que tiene actividad biológica confirmada.

Extracto orgánico

Solución extractiva de fitocomplejos de plantas medicinales obtenido por maceración o percolación de la droga en un solvente orgánico (etanol, éter, diclorometano).

Tecnología Farmacéutica

Se ocupa de todos los aspectos relacionados con el diseño, elaboración, evaluación de las formas de dosificación.

Principio activo o fármaco

Sustancia responsable del efecto farmacológico.

Excipientes

Sustancias o mezclas de sustancias carentes por sí mismas, de actividad farmacológica, se usan juntamente con el principio activo para facilitar la preparación y empleo del medicamento.

Preformulación

Etapa a seguir para el desarrollo de un medicamento seguro y eficaz. Abarca conocer las características básicas biofarmacéutica y fisicoquímicas, que influirán en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento.

Lipogel

Forma farmacéutica semisólida que se presenta en forma gelificada y que contiene en su formulación una fase oleosa (lipídica).

Emulsión crema

Sistema hétero disperso, emulsificado, no oclusivo y según la orientación o/w (aceite / agua) ó w/ o (agua / aceite), sus propiedades físico químicas son diferentes, termodinámicamente inestable debido a la diferencia en las densidades de las dos fases que la componen y al gran número de energía superficial (por la combinación de la tensión superficial y la fase dispersa) es un sistema difásico.

Semisólido

Término que denota un comportamiento reológico plástico, es decir retiene su forma hasta cuando una fuerza externa causa su deformación que es permanente.

Reología

Es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia, como parte de la física es una disciplina o especialidad que no supera los 75 años de existencia, nació oficialmente el 29 de abril de 1929 al formarse la Sociedad Estadounidense de reología, en Columbus, Ohio.
