



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ELABORACION Y CONTROL DE CALIDAD DE UNA CREMA  
CORPORAL HIDRATANTE A BASE DE MUCILAGOS Y AROMAS  
NATURALES”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**MARÍA VERÓNICA CEVALLOS MEDINA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*A mi más grande tesoro Christopher, que con su presencia y sonrisas me ha motivado a superarme y a seguir adelante para ser un ejemplo de vida en su camino..*

*A mis padres Romel y Jeannett que con su ejemplo forjaron en mí, responsabilidad y principios humanos que han sido muy valiosos durante mi formación académica y personal.*

*A Patricio que ha sido para mí mucho más que un hermano, mi amigo incondicional que me ha apoyado en los momentos más difíciles de este largo camino.*

*A Edison quien ha sido mi mano derecha y ha sembrado los sentimientos más nobles en mi corazón los cuales han sido un pilar fundamental para seguir adelante frente a todas las adversidades vividas juntos.*

## **AGRADECIMIENTO**

*La vida sería corta para agradecer a Dios por tantas bendiciones y depositar en mí la perseverancia y el valor para seguir adelante.*

*Un agradecimiento especial a mis padres por su comprensión y apoyo que me brindaron sin escatimar esfuerzos y noches de desvelos.*

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por contribuir en mi formación académica y ética profesional.*

*A la Dra. Cumanda Játiva directora de tesis por sus arduos consejos y conocimientos oportunos para la culminación de este proyecto..*

*A todos y cada uno de los profesores que en mi vida estudiantil han dejado ejemplos y conocimientos muy importantes para la formación personal y profesional.*

*A los amigos que hicieron de este tiempo una verdadera experiencia para superar las adversidades presentes y contribuir a la culminación de esta etapa de mi vida.*

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE UNA CREMA CORPORAL HIDRATANTE A BASE DE MUCÍLAGOS Y AROMAS NATURALES”**, de responsabilidad de la señorita egresada María Verónica Cevallos Medina, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez  
DECANO FAC. CIENCIAS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Iván Ramos  
DIRECTOR DE ESCUELA

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Cumandá Játiva  
DIRECTORA DE TESIS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

B.Q.F. Germán Toapanta  
MIEMBRO DE TRIBUNAL

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tc. Carlos Rodríguez  
DIRECTOR CENTRO  
DE DOCUMENTACIÓN

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

NOTA DE TESIS ESCRITA

\_\_\_\_\_

Yo, (María Verónica Cevallos Medina), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

(MARÍA VERÓNICA CEVALLOS MEDINA)

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

mL	mililitros
L	Litros
g	Gramos
Kg	Kilogramo
°C	Grados Celsius
V	Volumen
$\eta$	Índice de refracción
HR	Humedad Relativa
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
1MCBP	Muestra de crema blanca -pera
2MCBP	Muestra de crema blanca -pera
3MCVJ	Muestra de crema verde -jacaranda
4MCVJ	Muestra de crema verde-jacaranda
5MCBV	Muestra de crema blanca -verde
6MCBV	Muestra de crema blanca –verde
7MCC	Muestra de crema control
8MCC	Muestra de crema control
EH	Efecto hidratante
FT	Fenoles totales
N°	Numero
J	Jacaranda
SSH	Semillas de salvia hispánica
P	Pera
AE	Aerobios mesófilos
UE	Unidades Experimentales
PC	Prueba Control

## ÍNDICES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 PERA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.1 Descripción Botánica. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.2 Composición Química de las Peras. ....	3
1.1.3. Flavonoides presentes en las Peras . ....	6
1.1.3.1.Determinación de Flavonoides en la Pera. ....	7
1.1.3.1.1.Ensayo de Shinoda.....	7
1.1.3.1.2. Ensayo con Zn/HCl .....	8
1.1.3.1.3.Espectroscopia UV .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2. JACARANDA (Jacaranda mimosifolia). ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2.1.Descripción	Botánica
.....	<b>¡Error!</b>
<b>r! Marcador no definido.</b>	
1.2.2.Composición Química de la Jacaranda.....	11
1.2.3.Compuestos presentes en la Jacaranda.....	12
1.2.3.1. Determinación del ácido ursólico en la Jacaranda.....	13
1.2.3.1.1 Ensayo de Libermann - Buchard. ....	14
1.3. MACERACIÓN.....	15
1.3.1. Tipos de Maceración .....	15
1.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO. ....	17

1.5. SALVIA HISPÁNICA.....	22
1.5.1 Descripción Botánica.....	24
1.5.2. Composición Química de la Salvia Hispánica.....	25
1.5.2.1 Característica de los mucílagos y uso cosmético.....	25
1.6. LA PIEL.....	26
1.7. CREMA CORPORAL.....	28
1.7.1 Cremas Hidratantes.....	28
1.7.1.1 Humectantes.....	29
1.7.1.2. Oclusivas.....	29
1.7.1.3.Otras.....	29
1.8 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.....	29
1.8.1 Animales de Experimentación.....	30
1.8.1.1 Conejos de experimentación.....	31
1.8.2. Preubas in vivo (Animales de experimentación).....	33
1.9.CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA.....	36
1.9.1 Control de calidad de extractos.....	36
1.9.2. Formulación cutánea hidratante.....	38
1.9.3.Análisis microbiológico de cosméticos Metodo BAM.....	41
CAPÍTULO II.....	48
2.PARTE EXPERIEMENTAL.....	48
2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.....	48
2.2 FACTORES DE ESTUDIO.....	48
2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	48
2.3.1 Material biológico y vegetal.....	48
2.3.2 Equipos.....	49
2.3.3 Materiales de laboratorio.....	5050
2.3.4 Reactivos.....	5151
2.4 TÉCNICAS.....	52



2.4.1 Preparación por maceración de los extractos.....	52
2.4.1.1 Preparación por maceración del extracto de jacaranda.....	52
2.4.1.2 Preparación por maceración del extracto de pera. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 52
2.4.1.3 Separación del mucílago de las semillas de Salvia Hispánica.....	53
2.4.1.4 Tamizado fitoquímico de los extractos de pera y jacaranda.....	53
2.5 ELABORACIÓN DE LA CREMA .....	55
2.6. CONTROL DE CALIDAD DE LA CREMA .....	56
2.7 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	57
2.8 METODOLOGÍA.....	62
2.9 TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.....	551
2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	552
CAPÍTULO III.....	77
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77
3.1 Control de calidad de los excipientes. ....	80
3.2 Control de calidad de la crema . ....	81
3.3 Bioensayo.....	83
3.3.1 Exposición de los conejos al producto.....	83
3.3.2 Aplicación de la crema en la piel de los conejos. ....	84
3.3.2.1 Prueba de sensibilidad . ....	84
3.3.3 Prueba control con lubriderm. ....	85
3.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA CREMA CON EXTRACTO DE PERA, JACARANDA Y MUCÍLAGO DE SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA. ....	86
3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA CREMA .....	87
3.6 PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA CREMA ELABORADA A BASE DE EXTRACTOS DE PERA, JACARANDA, Y MUCÍLAGO DE SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA. ....	88

<u>CAPÍTULO IV</u> .....	93
4. CONCLUSIONES.....	93
CAPÍTULO V .....	96
5. RECOMENDACIONES.....	96
<u>CAPÍTULO VI</u> .....	102
6. RESUMEN .....	98
SUMARY.....	100
<u>CAPÍTULO VII</u> .....	101
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
<u>CAPÍTULO VIII</u> .....	110
8. ANEXOS.....	110

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N. 1	Aplicación de la crema.....	75
CUADRO N. 2	Resultado de las propiedades físico químicas y bibliográficas de la materia prima y producto terminado .....	81
CUADRO N. 3	Control de calidad del ácido esteárico.....	85
CUADRO N. 4	Control de calidad del propilenglicol .....	85
CUADRO N. 5	Resultado del análisis organoléptico, físico y microbiológico de la crema.....	87
CUADRO N. 6	Análisis de varianza de la actividad hidratante de la crema.....	80
CUADRO N. 7	Prueba de Tukey al 5% para determinar la actividad hidratante de la crema.....	86

## INDICE DE TABLAS

TABLA N. 1	Clasificación Científica de la pera.....	3
TABLA N. 2	Compuestos polifenólicos presentes en la pera.....	4
TABLA N. 3	Principales componentes de las peras.....	5
TABLA N. 4	Clasificación científica de la Jacaranda.....	11
TABLA N. 5	Clasificación científica de la Salvia Hispánica.....	24
TABLA N. 6	Taxonomía del conejo.....	32
TABLA N. 7	Parámetros del control de calidad del producto terminado.....	58
TABLA N. 8	Etapas de la experimentación con animales.....	71
TABLA N. 9	Exigencias y condiciones de los animales de experimentación...72	
TABLA N. 10	Tabla anova.....	79
TABLA N. 11	Resultados de los tiempos de absorción de las diferentes formulaciones de la crema.....	92

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N.1	Comparación de Tukey en el análisis de datos de la acción hidratante de la crema a base de extracto de jacaranda, pera y mucílago de la semilla de salvia hispánica.....	96
GRÁFICO N.2	Comparación en el análisis de datos de la acción hidratante de la crema a base de extracto de pera, jacaranda y mucílago de semillas de salvia hispánica.....	96
GRÁFICO N.3	Análisis de varianza de los datos estadísticos entre los tiempos de absorción de las diferentes formulaciones.....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N.1	Pera Piña.....	1
FIGURA N.2	Estructura básica de los flavonoides.....	6
FIGURA N.3	Jacaranda (Jacaranda mimosifolia).....	9
FIGURA N.4	Estructura de los principales compuestos de la jacaranda.....	12
FIGURA N.5	Salvia Hispánica.....	23
FIGURA N.6	Estructura de la piel.....	27
FIGURA N. 7	Animales de experimentación.....	31
FIGURA N. 8	Conejos de experimentación raza californiana.....	33
FIGURA N.9	Ácido esteárico.....	39

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N. 1	Análisis microbiológico de la crema.....	63
FOTOGRAFÍA N. 2	Adaptación de los animales de experimentación .....	66
FOTOGRAFÍAS N.3	Rasurada de animales de experimentación .....	67
FOTOGRAFÍA N. 4	Fase de experimentación.....	69
FOTOGRAFÍA N. 5	Recuperación completa del animal.....	69
FOTOGRAFÍA N. 6	Resultado microbiológico de la crema.....	88
FOTOGRAFÍA N. 7	Realización del rasurado de los conejos.....	89
FOTOGRAFÍA N. 8	Aplicación de la crema en la piel de los conejos.....	89
FOTOGRAFÍA N. 9	Prueba de sensibilidad negativa en la piel de conejos.....	90
FOTOGRAFÍA N. 10	Prueba control con lubriderm.....	91
FOTOGRAFÍA N. 11	Efecto de la crema elaborada a base de extracto de jacaranda, pera, mucílago de salvia hispánica.....	93

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N.1	Conejos en experimentación .....	115
ANEXO N.2	Animales rasurados.....	116
ANEXO N. 3	Parte experimental.....	117
ANEXO N. 4	Resultados de la experimentación.....	118
ANEXO N. 5	Ambiente durante la experimentación de los animales.....	118
ANEXO N. 6	Análisis microbiológico del producto terminado.....	119
ANEXO N. 7	Resultado microbiológico.....	120
ANEXO N. 8	Valores de la amplitud total estudentizada $q$ 0,05 para uso de la prueba de Tukey. Valores de interpolación.....	121



## INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales en la actualidad se ha incrementado como una alternativa para enfrentar los altos costos de diversos productos cosméticos, así como para mejorar la apariencia de la piel gracias a los compuestos que se presentan en diversas partes de los vegetales como, flores, raíces, hojas y demás. No obstante en el uso de éstas existe un gran desconocimiento sobre como emplearlas, sus principios tóxicos, su dosificación y modo de prepararlos para lograr los efectos deseados en la piel.

En las últimas décadas el descubrimiento de propiedades cosméticas en las plantas ha incrementado notablemente no solo en nuestro país sino también a nivel mundial. Por este motivo, diversos organismos internacionales han desarrollado técnicas, métodos y normativas que regulan la utilización y los métodos mediante los cuales se realiza la aplicación de estos productos. En este marco, algunos laboratorios cosméticos se han abocado a la obtención de productos cosméticos a partir de recursos completamente naturales como mucílagos y sobre todo de aromas frutales y florales.

Dentro de este contexto, los extractos (Ex) son productos naturales de gran valor e importancia económica. La bioactividad de los Ex se investiga a partir de los efectos farmacológicos, dichos extractos son obtenidos por maceración y eliminación total del alcohol utilizado para el proceso.

El efecto de las plantas utilizadas es conocido por su uso popular, que indica la potencia de las mismas así como la efectividad en tratamientos, lo cual nos permite dar un debido procedimiento así como también favorecer el uso de productos que contienen especies vegetales, ya que en cosméticos son muy utilizadas y apetecidas.

En cosmética la elaboración de cremas es un proceso rutinario, debido a que las formulaciones están ya establecidas. Esta investigación se enfocará más bien al estudio de la cantidad de principio activo presente en la pera, jacaranda y del mucílago extraído de la Semilla de la salvia hispánica, que otorgue al producto las características, untuosidad, aroma, y demás parámetros que la describan como crema, esto se conseguirá al sustituir algunos de los componentes de la crema por el subproducto que proponemos.

Los productos naturales entre los cuales se encuentra la pera tienen propiedades medicinales como por ejemplo: la fibra insoluble y soluble está presente dentro de las propiedades, favoreciendo la eliminación del colesterol y regulando la función intestinal, la concentración de mucílago, para evitar el estreñimiento, mejorar la intolerancia a la glucosa, así como por tener efectos hipocolesterolémicos. Pero sobre todo la pera (P) es considerada una de las frutas con mayor contenido de agua lo cual la hace invaluable para fabricación de productos de belleza ya que aporta a la piel con un gran contenido y de esta manera ayuda para mantenerla siempre tersa favorecida también con la cantidad considerable de vitamina E y vitamina C que le dan a más de esto un aporte antioxidante, evitando la formación de radicales libres en las células de la piel.

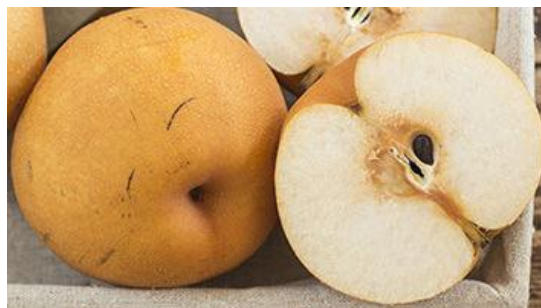
Las características de la crema son evaluadas mediante pruebas físicas, químicas y microbiológicas. Se enmarcan valores establecidos como estándares o promedios que serán comprobados en la crema que contiene el principio activo hidratante que es el de la pera (P), el aroma que es de jacaranda (J) y el espesante que son los mucílagos naturales extraídos de la semilla de Salvia hispánica (SSH), en dos concentraciones y aromas diferentes así como también la coloración en cuanto cumplan con los valores estandarizados y sustituyendo así el excipiente que mejor convenga con los mucílagos. Otorgando también propiedades sinérgicas con los excipientes presentes en la crema como la retención y absorción de agua en la piel teniendo un papel hidratante.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO.

#### 1.1 PERA

La pera es una fruta refrescante, dulce, muy sabrosa y sobre todo con numerosos nutrientes lo que la hace de especial interés para un sin número de dolencias y afecciones se puede usar como: diurética urolítica y antipútrida, depurativa, laxante, remineralizante, astringente, sedante, refrescante. Por ello se puede decir que está indicada en: reumatismo, gota, artrismo, astenia, “surménage”, embarazo, anemia, tuberculosis, diarreas, y está permitida en diabéticos. Es una fuente con gran riqueza en agua lo que la hace ser un alimento recomendado en dietas y en programas de embellecimiento capilar y cuidado de la piel. (27,19)



**Fig. N° 1 Pera piña**

### 1.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La pera o peral (*Pyrus*) es un género de árbol frutal perteneciente a la familia de las rosáceas, tiene alrededor de 30 especies con frutos carnosos. Su cultivo está muy extendido. (5)

Son árboles de tamaño mediano, que alcanzan de media 10–17 m de alto, a menudo con una coronación alta y estrecha; unas pocas especies son arbustivas. El peral silvestre alcanza unos 20 metros de alto, que es lo que pueden alcanzar también algunas variedades cultivadas. Las especies más bajas tienen su límite en los 12 metros. La corteza de los perales es pardo negruzca, con placas nudosas y oblongas en el peral común y con grietas transversales y longitudinales en el peral silvestre. Dentro de este tono, hay especies con la corteza parda grisácea más clara y otras que lo tienen más oscuro, como el peral de hojas de almendro o el de las nieves. (5,18)

Sus hojas son ovaladas de hasta 10 cm. Con el haz verde obscuro brillante, sus flores son blancas o blanco-rosadas de hasta 1,5 cm. Y aparecen reunidas en corimbos de 3 a 7. El fruto del peral es comestible y es a este al cual se conoce como pera, es carnoso con piel lisa y fina dependiendo de la variedad que esta sea, la carne de las peras es blanda y sus semillas están en el interior. (18)

La pulpa de la pera es tierna, fundente o crocante, seca o jugosa, perfumada y de sabor dulce por el elevado contenido de fructosa y otros azúcares, aunque algunas variedades son ácidas o astringentes. Presenta pequeños gránulos leñosos llamados escléridas y muchas veces presenta fibras. (18)

<b>CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Rosales</i>
<b>Familia</b>	<i>Rosaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Spiraeoideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Pyreae</i>
<b>Género</b>	<i>Pyrus</i>

**Tabla. N° 1. Clasificación científica del peral (5)**

### **1.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PERAS**

Las peras son bastante ricas en vitaminas y minerales, destaca su contenido en vitamina C uno de los principales antioxidantes y también conservantes de una gran variedad de productos. Contiene también bastante ácido fólico, una de las que forma el complejo de la vitamina B, necesario para la construcción celular y cuya deficiencia predispone a la aparición de ciertos cánceres como hepático y dérmico. (5)

Su riqueza en taninos y ácido cafeico le confieren propiedades antibacterianas muy útiles para frenar los brotes de herpes o retardar su aparición. La pera contiene además mucho potasio que interviene directamente con el calcio para la regulación de líquidos en el cuerpo. (8,9)

Es muy rica en ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos, algunos de ellos esenciales como la leucina, necesaria para la regeneración de tejidos. Otros aunque no sean esenciales como la arginina han probado ser muy útiles en la elaboración de masa

muscular así como en la eliminación de amoníaco y sustancias tóxicas, la mayoría de ellos incrementan la inmunidad en el organismo en contra de las agresiones bacterianas.

(19)

Las peras contienen Vitamina C, Vitamina E, Carotenoides o betacarotenos, precursores de la Vitamina A y polifenoles, los betacarotenos, son sustancias vegetales fisiológicamente activas responsables de los caracteres organolépticos. Los polifenoles más significantes son el ácido Clorogénico, la Catequina y Epicatequina que constituyen los taninos y la p-Arbutina, utilizada como indicador.(9)

**Tabla N° 2 Cantidad de compuestos Fenólicos**

<b>COMPUESTOS POLIFENOLICOS PRESENTES EN LA PERA</b>	
<b>FENOLES TOTALES (FT)</b>	<b>Valor 100g en mg</b>
<b>Ácido clorogenico</b>	0,03
<b>Catequinas</b>	0,58
<b>Epicatequinas</b>	0,41
<b>p- Arbutina</b>	1,93
<b>Miricetina</b>	< 0,2

El olor de la pera es resultante de una mezcla compleja de componentes volátiles entre los que se encuentran varios ésteres producidos durante la maduración, por efecto del etileno. Muchos de estos compuestos aromáticos se originan por oxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares durante la maduración. (9)

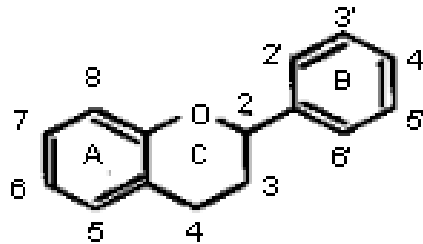
**Tabla N° 3 Principales componentes de las peras**

<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PERAS FRESCAS POR CADA 100 Gr.</b>	
<b>Agua</b>	83,81 g
<b>Calorías</b>	59 Kcal
<b>Grasa</b>	0,40 g
<b>Proteína</b>	0,39 g
<b>Hidratos de carbono</b>	15,11 g
<b>Fibra</b>	2,4 g
<b>Potasio</b>	125 mg
<b>Fósforo</b>	11 mg
<b>Calcio</b>	11mg
<b>Cobre</b>	0,113 mg
<b>Magnesio</b>	6 mg
<b>Manganeso</b>	0,076 mg
<b>Hierro</b>	0,25 mg
<b>Zinc</b>	0,12 mg
<b>Selenio</b>	1 mg
<b>Vitamina C</b>	4 mg
<b>Vitamina B1 (Tiamina)</b>	0,20 mg
<b>Vitamina B2 (Riboflabina )</b>	0,40 mg
<b>Niacina</b>	100 mg
<b>Vitamina B6</b>	0,018 mg
<b>Vitamina A</b>	20 IU
<b>Vitamina E</b>	0,500 mg

**FUENTE: ARGENFOODS**

**(7,19)**

### 1.1.3. FLAVONOIDES PRESENTES EN LAS PERAS



Flavonoide

### FIGURA N° 2 ESTRUCTURA BASICA DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides son de bajo peso molecular comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. (10)

Son compuestos orgánicos constituyentes de alimentos de origen vegetal, que no son nutrientes y que proporcionan al alimento unas propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales propiamente dichas. Estas sustancias son responsables, del papel beneficioso para la salud y para la piel de quien los consume. (35)

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un



papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías.

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación.

Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe, Cu, Zn, catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. (10)

### **1.1.3.1 DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN LA PERA**

Los flavonoides se pueden reconocer experimentalmente mediante diferentes ensayos de coloración.

#### **1.1.3.1.1. Ensayo de Shinoda**

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada para reconocer esta clase de compuestos. Este ensayo permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido

clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos. (22, 23)

#### **1.1.3.1.2 Ensayo con Zn/HCl**

Al remplazar el Mg por el Zn en el procedimiento del ensayo de Shinoda, solamente los dihidroflavonoles (o flavonoles) producen coloraciones rojo-violeta. Las flavanonas y flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles.

#### **1.1.3.1.3. Espectroscopia ultravioleta-visible**

Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II , entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O- sustituidos en 330 - 360 nm , y los flavonoles en 350 - 385 nm. (22)

## 1.2 JACARANDA (*Jacaranda mimosifolia*)



**Fig. N° 3 Jacaranda**

El nombre científico del género JACARANDA deriva de la voz guaraní jacarandá que significa fragante. (25)

Con sus delicadas hojas con forma de helechos y sus vistosas flores de lavanda, el árbol de jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*) es uno de los árboles decorativos favoritos para las zonas con climas cálidos. Aunque son resistentes a muchas enfermedades y son tolerantes a la sequía. (20)

Según estudios realizados anteriormente, específicamente en la tesis descrita de Adriana Lema titulada “Separación y posible identificación de metabolitos secundarios de a jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) con fines de aporte a una técnica de análisis químico” se describe que la Jacaranda es utilizada como bactericida, esta investigación fue orientada a la técnica de análisis químico para para lo cual se separaron e identificaron los metabolitos secundarios q son la jacaronona, ácido jacoumárico, y la metil jacaronona, los cuales se separaron del extracto preparado por maceración del vegetal con etanol, se concentró por evaporación y se analiza con reacciones de coloración e identificación para

flavonoides (Shinoda), Saponinas (espuma), terpenoides (Lieberman - Buchard), y lactonas (Baljet). Dicho extracto se fragmenta en sub- extractos con los cuales se realizaron cromatografías en capa fina y fase estacionaria de silica gel con cloroformo, acetato de etilo, y revelada con sulfato de cerio dando los Rf correspondientes a los compuestos mencionados anteriormente. Además se realizaron las lecturas en IR dando picos de igual manera que corresponden a los compuestos principales de la jacaranda.

### **1.2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

El árbol de Jacaranda es un género de 49 especies de plantas con flores en la familia Bignonia, nativa de regiones tropicales y subtropicales de América Central, México, América del Sur, es de crecimiento bastante rápido. Suele alcanzar proporciones muy grandes, siendo ideal como árbol de sombra, es por esto que se usa mucho en avenidas y jardines, es un árbol caducifolio, de rápido crecimiento, copa esférica. Tiene un porte medio con unos 6 a 10 m de altura y de 4 a 6 m de diámetro de copa. Aunque puede sobrepasar los 25 m de altura. (21, 24)

Las flores azules o lilas se reúnen en espigas y son azules o púrpura azulado. Tienen un tamaño de 5 cm de largo, en racimos al extremo de las ramas hasta de 25 cm de largo. Estas cubren todo el árbol, tiene una floración espectacular. Hay que ubicarla en lugares a pleno sol pues florece abundantemente en exposición soleada. Es una planta rústica en cuanto a tipo de suelo, aunque prefiere terrenos areno-arcillosos que mantengan la humedad. (24)

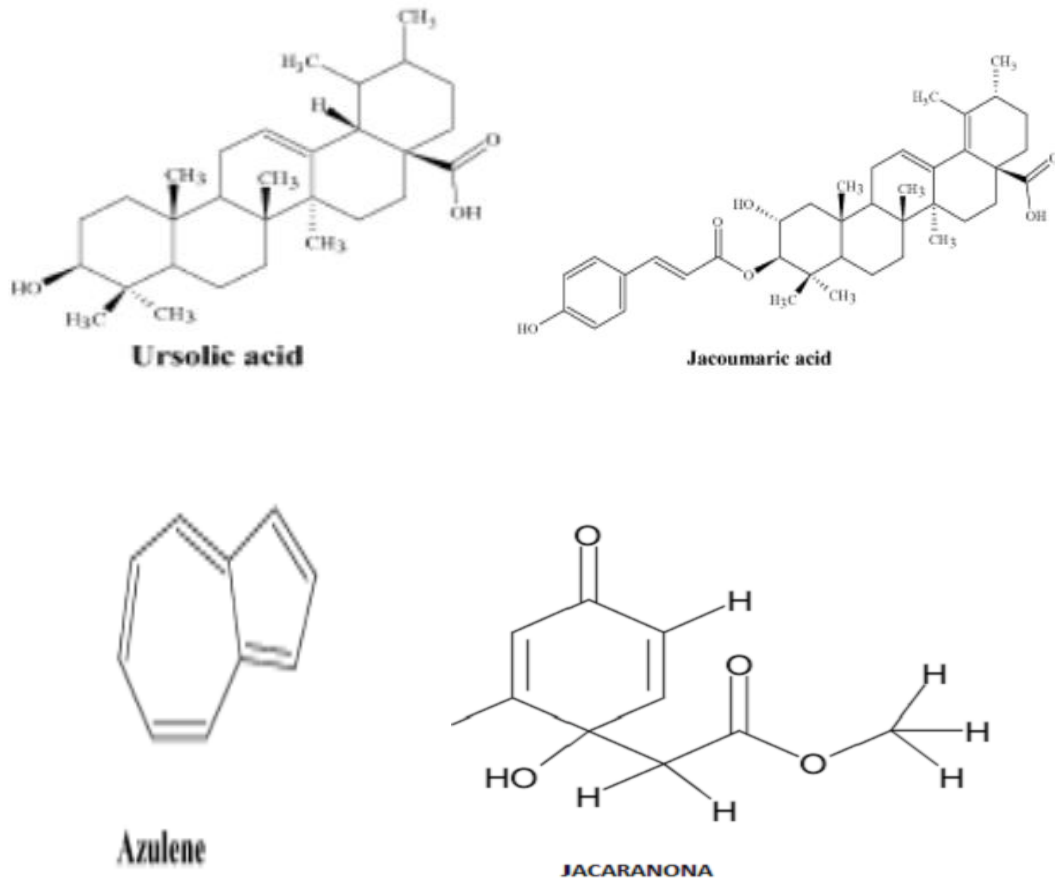
CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Bignoniaceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Tecomeae</i>
<b>Género</b>	<i>Jacaranda</i> JUSS

**Tabla. N° 4. Clasificación científica de la Jacaranda**

### 1.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA JACARANDA

La jacaranda posee gran cantidad de compuestos entre los cuales están: Ácido jacarándico, jacaronona (-Hidroxí-4-oxo-2,5-ciclohexandienil acetato de metilo), ácido jacoumárico, ácido ursólico y otras sustancias flavonoides, grandes cantidades de taninos, y un compuesto que es aquel que le da su coloración llamado jacarandina. Esta variedad de compuestos son capaces de frenar o inhibir un sin número de afecciones de entre las cuales podemos mencionar enfermedades venéreas, forunculosis, afecciones del hígado, várices, eccemas, cicatrización de heridas, depurativo de la sangre y enfermedades cutáneas, antiséptico, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, el extracto de jacaranda se usa también para afecciones de la piel tan severas como el acné. (11,37)

### 1.2.3. COMPUESTOS PRESENTES EN LA JACARANDA



**FIGURA N° 4 ESTRUCTURAS DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS DE LA JACARANDA**

Se ha encontrado que existen un sinnúmero de compuestos identificados en esta especie por lo tanto poseen nombres especiales, son altamente eficaces para úlceras avanzadas, también para forúnculos y serios problemas de acné lo que demuestra la alta efectividad a nivel cutáneo de la jacaranda.

Además posee un compuesto altamente antioxidante que es aquel que le da la coloración a las flores propiamente dichas llamado azuleno e interviene reflejando el sol, actuando así como un bloqueador natural y eliminando los radicales libres. (31)

El ácido ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico, es conocido por sus propiedades anti inflamatorias y por su actividad anti cancerígena.

Tiene varios usos como son inhibe las vías de la ciclooxigenasa, la 5-lipoxigenasa y la elastasa de los leucocitos humanos, mejoran y refuerzan el colágeno cutáneo, lo que conlleva una mayor elasticidad de la piel y la mejora en el aspecto de las arrugas, a la vez que mejora el aspecto de las manchas, es capaz de incrementar los niveles de ceramidas y queratinocitos, favoreciendo la regeneración de la barrera hidrolipídica de la piel.

Por este motivo, el ácido ursólico se incluye en la formulación de cosméticos a una concentración de uso que oscila entre 0,05 y 0,20%. (1,3)

#### **1.2.3.1 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO EN LA JACARANDA**

Los triterpenos son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogénicamente del escualeno, hidrocarburo alicíclico de 30 carbonos.

Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden tener grupos hidroxilos. (2)

### 1.2.3.1.1. Ensayo de Liebermann-Burchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado **sin agitar**. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades representativas de estos compuestos.

Es importante que para realizar este ensayo no exista agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar as estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura.



Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes. (23)

### **1.3. MACERACIÓN**

Es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer, es un proceso que dura de 6 horas hasta varias semanas. (40, 41)

Para lograr el proceso de maceración se coloca el material vegetal en forma de trozos o polvo, según sea la conveniencia, en un recipiente lleno del mensturo y se deja reposar, al final de este período se cuela y el resto sólido se exprime hasta lograr quitar el líquido remanente. El líquido así obtenido se clarifica por decantación o filtración.

La maceración se realiza a temperatura ambiente y los líquidos que con más frecuencia se utilizan son el agua y el alcohol ó combinación de ambos, aunque también pueden emplearse vinos tintos o blancos. (35)

#### **1.3.1. TIPOS DE MACERACIÓN**

##### **MACERACIÓN EN FRÍO**

Consiste en sumergir el producto a macerar en un líquido y dejarlo una determinada cantidad de tiempo, para transmitir al líquido características del producto macerado. Los productos a macerar son varios, y en la gastronomía se puede destacar la infusión de especias variadas en aceite de oliva virgen extra, concediendo a estos últimos aromas y paladares propios de las especias maceradas. Son especialmente recomendados para ensaladas y platos fríos.

También se podrá añadir a un recipiente con la menor cantidad de agua posible, sólo lo suficiente como para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se hace por un lapso más o menos largo, dependiendo de lo que se vaya a macerar.

La ventaja de la maceración en frío consiste en que al ser sólo con agua se logran extraer todas las propiedades de lo que se macera, es decir, toda su esencia sin alterarla en lo más mínimo.

### MACERACIÓN CON CALOR

El proceso a ejecutar en este tipo de maceración es el mismo que en la maceración en frío, sólo que en este caso puede variar el medio por el cual se logra la maceración.

El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso tomando como referencia que 3 meses de maceración en frío, es igual a 2 semanas en maceración con calor, esto es en el caso de las plantas y hierbas medicinales.

La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto a macerar, ya que siempre quema o destruye alguna pequeña parte de esta (muchas veces se trata de compuestos termolábiles).

Pero muchas veces, para acortar más los tiempos de extracción y que las sustancias pasen el menor tiempo posible a elevadas temperaturas, se hacen extracciones con corriente de vapor. (36)

## 1.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

### a) ENSAYO DE DRAGENDORFF.

Utilizado para detectar la presencia de alcaloides se basa en tomar en cuenta que si el extracto esta disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si se trata de un extracto acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez).

Para el ensayo, a la solución acuosa acida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa:

- Opalescencia : ( + )
- Turbidez definida : ( ++ )
- Precipitado : ( +++ )

### b) ENSAYO DE WAGNER.

Se parte de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución, se le adiciona 2 o 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior.

### c) ENSAYO DE MAYER.

Se parte de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución se le adiciona 2 o 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior.

**d) ENSAYO DE LIBERMAN - BUCHARD.**

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

- Rosado – azul muy rápido.
- Verde intenso – visible aunque rápido.
- Verde oscuro – negro – final de la reacción.

El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues esta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Lieberman – Burchard es también utilizada para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura.

Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

**e) ENSAYO DE BORNTRAGER**

Es útil para detectar la presencia de quinonas. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) , o, rojo para lo cual se reporta (+++).

**f) ENSAYO DE BALJET.**

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultados positivos.

Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en 1 ml de alcohol. Seguidamente, se añade 1 ml del reactivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (++) y (+++) respectivamente.

**g) ENSAYO DE SUDAN III.**

Permite conocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello cuando un extracto etéreo se evapora a sequedad en presencia de una solución de Sudan III al 0.6 % en glicerina – agua (1:1).

La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, indica la presencia de Lípidos y/o Aceites Esenciales.

**h) ENSAYO DE CATEQUINAS.**

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique una solución de Carbonato de Sodio.

La aparición de una mancha verde carmelita a la Luz UV, indica positiva la prueba.

**i) ENSAYO DE RESINAS.**

Para detectar este tipo de compuestos, adicione a 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

**j) ENSAYO DE ESPUMA.**

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpenica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 – 10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y es persistente por más de 2 minutos.

**k) ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO.**

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adiciona 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una

solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecolicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

#### **l) ENSAYO DE NINHIDRINA.**

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general.

A la fracción disuelta en 1 ml de Etanol se le adiciona 1 ml de solución de Ninhidrina al 5 %. Se calienta en baño de agua de 5 a 10 minutos.

Si aparece una coloración azul o violeta el ensayo es positivo.

#### **m) ENSAYO DE SHINODA.**

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezcla las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentran en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo ; intensos en todos los casos.

**n) ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS.**

Permite conocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6 – C3 – C6 del grupo de los flavonoides.

Se calienta 2 ml del extracto etanólico por 10 minutos con 1 ml de HCl concentrado. Dejar enfriar y luego adicionar 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Agitar y dejar separadas las 2 fases.

La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, indica ensayo positivo.

**o) ENSAYO DE FEHLING.**

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 – 2 ml de agua. Se adiciona 2 ml del reactivo y se calienta en baño de agua 5 – 10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

**1.5.SALVIA HISPÁNICA**

Llamada también o conocida como Chia, la salvia hispánica (SSH) es uno de los vegetales con mayor concentración de ácido graso  $\alpha$  -linolénico omega 3, junto al lino, puede llegar a medir un metro de alto, sus hojas van de 4 a 8cm de largo y de 3 a 5cm de ancho. Ésta es rica en mucílago, fécula y aceite; tiene 2mm de largo y 1,5 de ancho, es ovalada y rojiza. (37)

Su cultivo se hace en suelos ligeros con buen drenaje y sin exceso de humedad; la Chía es tolerante a la acidez y sequía -como la mayoría de las salvias-, sin embargo, no tolera



las heladas y necesita abundante sol, lo que significa que no se da a la sombra. Su cultivo en Ecuador es restringido, se lo puede encontrar en la ciudad de Ibarra y es aquí donde se comercializan frascos de 200g del mucílago extraído de la semilla debido a su importante propiedad antifatulenta.

Las semillas de Salvia Hispánica, son una excelente fuente de vitaminas, omega 3 y antioxidantes, por lo que se hace importante incluirlas en cualquier dieta. Sin embargo, quienes necesiten combatir el colesterol y los triglicéridos altos, entre otras dolencias, deben consumirlas por su acción directa a nivel celular. (33)



**FIGURA N° 5 Salvia Hispánica (SSH)**

### **1.5.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

La salvia hispánica es una herbácea de crecimiento anual de la familia de las lamiáceas, se caracterizan por poseer aceites esenciales. El nombre labiadas se debe a su peculiar forma de las flores con apariencia de labios, el tallo es cuadrangular, sus hojas crecen

puestas son pecioladas ovaladas y serradas por la parte lateral, son de color verde oscuro y miden entre 4 y 8 cm.

La flor es pedicelada que se encuentra en grupos de 6 o mas flores reunidas sobre el raquis o eje principal, esta flor es hermafrodita. (6,37) Las semillas tienen forma ovalada y son pequeñas entre 1,5mm de ancho y 2mm. De largo, su color es diferente según la variedad y son lisas completamente. (37)

<b>CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	Nepetoideae
<b>Tribu</b>	Mentheae
<b>Género</b>	<i>Salvia</i>
<b>Especie</b>	<i>S. Hispánica</i>

**Tabla. N° 5. Clasificación científica de la Salvia Hispánica**

### **1.5.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SALVIA HISPÁNICA**

Son un alimento rico en ácido omega 3, además son particularmente ricas en mucílago un tipo de fibra soluble que forma un gel cuando se mezcla con agua. La composición nutricional de la semilla de chia es: Un 20% de proteína, un 40% de fibra alimentaria

(5% fibra soluble de muy alto peso molecular) y un 34% de aceite; sobre el 64% del aceite son ácidos grasos omega 3. No contiene gluten, por lo que es apta para celíacos. No se conocen componentes tóxicos en ella (6,37)

#### **1.5.2.1. CARACTERÍSTICA DE LOS MUCÍLAGOS Y USO COSMÉTICO**

Los mucílagos son fibras solubles, con la propiedad de hincharse con el agua y formar disoluciones coloidales o geles, característica ésta a la que deben la mayoría de sus propiedades y aplicaciones. En las plantas funciona como depósitos de agua gracias a su capacidad de retención, evitando así la deshidratación y favoreciendo la germinación. Cuando son muy abundantes, pueden fluir al exterior y por desecación en contacto con el aire se forman gomas. Por lo tanto, se considera que la diferencia está en que los mucílagos son constituyentes normales de las plantas, mientras que las gomas son productos que se forman en determinadas circunstancias, mediante la destrucción de membranas celulares y la exudación. Son muy variables en cuanto a su composición, pero como constituyentes más extendidos, destacan la glucosa, la arabinosa, la xilosa y el ácido galacturónico.

Uso de gomas (tragacanto, arábica, guar, xantano): Preparación de emulsiones, son agentes emulsificantes o de suspensión. Se usan bien en cosmética y en la industria de alimentos y como adhesivo en industrias textiles. Una importante fuente de obtención de mucílagos de utilidad en Farmacia la constituyen algunas algas, tanto de Rodofíceas (Gelidium, Pterocladia, Gracilaria, Gigartina y Chondrus) de las que se obtienen el agar-agar y los carragenatos, como de Feofíceas (Fucus y Laminaria) de las que se obtiene la algina.

Los mucílagos tienen propiedades hidratantes y protectoras de la piel. Favorece la aplicación de cataplasma, siendo también un buen protector sobre heridas, quemaduras o cortes. (28)

### **1.6. LA PIEL**

Es el mayor órgano del cuerpo humano o animal. Ocupa aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, y su espesor varía entre los 0,5 mm (en los párpados) a los 4 mm (en el talón). Su peso aproximado es de 5 kg. Actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno, y éste varía en cada especie. Anatómicamente se toma como referencia las medidas estándar dentro de la piel humana. También es conocido como sistema tegumentario. (28)

La biología estudia tres capas principales que, de superficie a profundidad, son:

- la epidermis,
- la dermis y
- la hipodermis.

En medicina, en histoanatómico y dermatológico, a fines prácticos se estudian dos de las capas; la epidermis y la dermis.

De la piel dependen ciertas estructuras llamadas anexos cutáneos, como son los pelos, las uñas, las glándulas sebáceas y las sudoríparas. (29)

Está compuesta de corpúsculos: de Meissner (Georg Meissner) presentes en el tacto de piel sin pelos, palmas, plantas, yema de los dedos, labios, punta de la lengua, pezones,

glande y clítoris (tacto fino); de Krause, que generan la sensación de frío; de Paccini que dan la sensación de presión; de Ruffini, que registran el calor y de Merckel, el tacto superficial. (30)

La piel puede sufrir de varias enfermedades distintas, denominadas dermatitis, como la seborrea.

Éstas son estudiadas por las disciplinas de la dermatología y la patología, principalmente. (28)

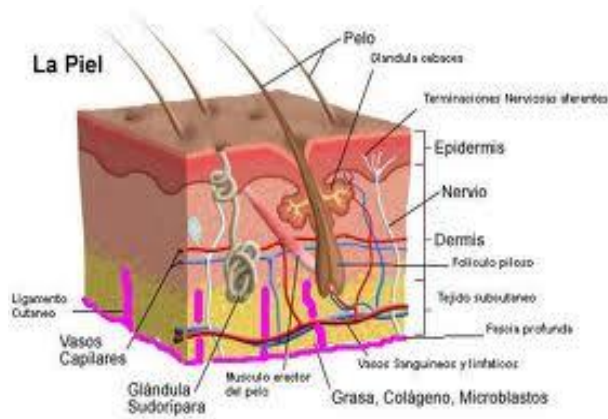
El agua es el principal componente de la materia viva. Esta representa entre un 70 y 80% de la composición química de nuestra piel, siendo de un 10% para la capa cornea y un 70% para las capas profundas. (28)

En el ser humano, la piel del varón produce más secreción sebácea que la de la mujer debido a la mayor cantidad de andrógenos (hormona sexual masculina) que produce el varón. Como consecuencia, la piel masculina es más gruesa y grasa que la femenina. (29)

Cuando falta agua en la capa superficial de la piel desaparece la humedad y los lípidos que la conforman.

A partir de ese momento, la piel se debilita y la deshidratación aumenta, quedando la epidermis expuesta a las agresiones externas.

Efectos de la deshidratación en la piel: tirantez e irritación, pérdida de elasticidad, acumulación de células muerta, aspecto opaco y grisáceo, desestabilización del PH, sequedad y sensibilidad. (30)



**FIGURA N° 6 ESTRUCTURA DE LA PIEL**

### **1.7. CREMA CORPORAL**

Una crema corporal es un tipo de emulsión usada para el cuidado corporal. Una emulsión es una mezcla de líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante). (12)

Una crema corporal tiene su acción en la capa más superficial de la piel. Para que este proceso de emulsificación o unión de fases sea posible debe existir un emulgente, que es una sustancia que estabiliza una emulsión, frecuentemente un surfactante. (16)

El fundamento de las cremas corporales serán entonces las emulsiones en base a dichas formulaciones se obtendrán los resultados esperados. (13)

#### **1.7.1. CREMAS HIDRATANTES**

Son un producto cosmético concebido para combatir la sequedad de la piel. Aunque también nos protegen de las inclemencias, es importante saber que no son eficaces cuando se trata de corregir o disimular las arrugas. (17)

Respecto a su aplicación, lo mejor es hacerlo sobre la piel húmeda, incluso justo antes del maquillaje.(16)

Básicamente, podemos considerar tres grandes grupos de cremas hidratantes: (14)

#### **1.7.1.1. HUMECTANTES**

Se trata de compuestos a base de glicerina, especialmente indicados para pieles grasas que, no olvidemos, también necesitan hidratarse. Su función consiste en llevar el agua hasta las capas superiores de la piel. (16)

#### **1.7.1.2. OCLUSIVAS**

Con su aplicación se pretende evitar o retrasar en lo posible la evaporación del agua.

#### **1.7.1.3. OTRAS**

Están constituidas por un grupo de compuestos, más activos que los anteriores, y que, en lugar de trabajar con el agua, lo hacen directamente con la piel. Contienen moléculas grasas, que ayudan a mantener las defensas naturales de la piel y evitar la pérdida de humedad. (15)

### **1.8. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS**

Dado que los animales de laboratorio se presentan como cepas con variabilidad biológica limitada, los estudios realizados con ellos no pueden ser suficientes para determinar sin dudas que un cosmético determinado tendrá las características deseadas de eficacia y seguridad en poblaciones humanas; sin embargo son ellos quienes proporcionan la información necesaria para obtener un producto que no resulte nocivo para la salud de los

humanos ya que en un principio se desconocen por completo sus efectos secundarios los cuales pueden ser lo suficientemente peligrosos para la salud de los humanos.

La prueba de cosméticos en animales es una forma de vivisección que se supone intenta asegurar las propiedades hipoalergénicas de los productos para el uso humano. Se prueban los productos terminados o los ingredientes que los componen.

Por esta razón, antes de su posible aprobación, un cosmético debe ser probado en seres de experimentación para su comprobación y consiguiente uso en humanos sin repercusión en la salud. (4)

### **1.8.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Los animales de experimentación a pesar de ser una práctica muy utilizada es también muy juzgada y criticada.



**FIGURA N° 7 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Es cualquier especie animal utilizada en experimentación con fines científicos, es decir, mantenido bajo determinadas condiciones y utilizado como instrumento de medida.



Este al ser sometido a una experimentación, proporciona datos, los cuales son utilizados como información para los resultados. Como ejemplo de esos animales tenemos al ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro o el mono.

### 1.8.1.1. CONEJOS DE EXPERIMENTACIÓN

El conejo es un mamífero roedor que en libertad se alimenta exclusivamente de hierbas y granos, su cuerpo está cubierto por un pelo espeso y suave, tienen un temperamento asustadizo, propensos al pánico, por eso su trato y transporte debe ser cuidadoso.

Cuando se encuentran nerviosos pueden arañar con los miembros posteriores, excepcionalmente, llegan a morder.

Cuando se aloja a varios machos juntos en un periodo prolongado, por instinto tienden a pelearse por una jerarquía.

En general son tímidos y no copulan si se los está observando.

---

#### TAXONOMÍA DEL CONEJO

<b>Clase</b>	<i>Mamífero</i>
<b>Orden</b>	<i>Lagomorpha</i>
<b>Género</b>	<i>Leporidae</i>
<b>Género</b>	<i>Oryctolagus</i>
<b>Especie</b>	<i>Cuniculus</i>

**TABLA N° 6 TAXONOMÍA DEL CONEJO**

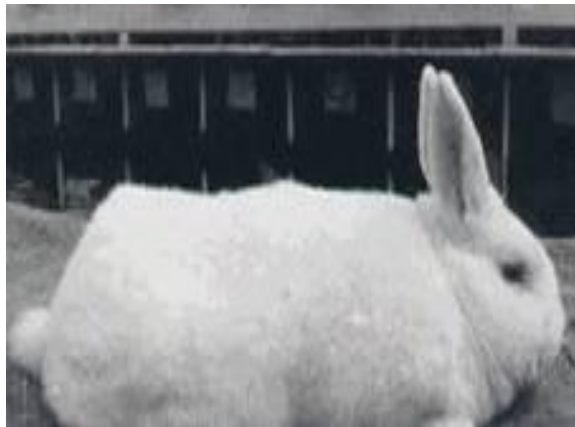
Los conejos pueden ser empleados para muchos propósitos como para sangrado o inyecciones endovenosas se prefiere razas de orejas grandes; en la determinación de pirógenos de preparados farmacéuticos; en la preparación de antisueros; para pruebas de toxicidad de drogas y productos biológicos; pruebas rutinarias de diagnóstico; prueba de irritantes cutáneos y oculares, debido a su alta sensibilidad para estos productos; en la investigación de cirugía cardiovascular y estudios de hipertensión, enfermedades infecciosas, teratología, arteriosclerosis y serología. El conejo es apropiado para estudios sobre reproducción, puesto que la ovulación no es espontánea, no hay ancestro estacional, la gestación es corta y el semen se puede recolectar fácilmente. Se usan para el estudio de anticonceptivos orales; en investigación de enfermedades infecciosas e inmunológicas, por la alta y calidad y cantidad de sus anticuerpos; también se usan en serología y para *screening* de agentes embriotóxicos y teratogénicos; entre otras aplicaciones también son usados para cría de moscas tsé-tsé; también se utiliza con fines pedagógicos para anatomía, fisiología experimental, nutrición, reproducción, embriología, etc.

Es preferible utilizar razas medianas, ya que las pequeñas tienen orejas extremadamente cortas y las inoculaciones se hacen dificultosas. Por otro lado, las razas muy grandes son difíciles de manipular, además de ocupar cajas más grandes y consumir más alimentos.

Existen pocas cepas desarrolladas para fines de laboratorio, en la actualidad existen seis cepas endocriadas, es decir, como resultado del cruzamiento de hermanos por hermanas, durante, por lo menos, 20 generaciones.

Esto se debe a que es muy costoso establecer un *stock* de animales endocriados, porque disminuye la productividad, aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y aumenta la mortalidad.

La más utilizada para ensayos en laboratorio es la raza californiana que son especies de color blanco cuerpo cilíndrico y rara vez poseen manchas negras o plomas. (41)



**FIGURA N° 8 CONEJO EXPERIMENTAL**

### **1.8.2 PRUEBAS IN VIVO (ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN)**

Las pruebas in vivo se realizan en animales de experimentación, según sea el caso, la mayoría de empresas y laboratorios usan conejos entre 1- 3 Kg.

Dichos animales después de las pruebas no son sacrificados ya que al ser la aplicación dérmica no resulta necesario siempre y cuando ésta sea realizada correctamente y el producto haya sido elaborado dentro de las especificaciones necesarias.

Pocas son las veces que resulta necesario sacrificar al animal, a pesar de esto se lo hace cuando el producto no resultó como se lo esperaba.

Los métodos más comunes según las pruebas y el producto elaborado son:

**Test Draize:**

Consiste en aplicar dosis exageradas del producto (por ejemplo champú) a uno de los ojos de un conejo inmovilizado, hasta producirle úlceras, llagas, hemorragias y ceguera, mientras el ojo sano sirve como referencia.

**Test de sensibilidad cutánea:**

Es inmovilizado el animal y se le aplica el producto en la piel afeitada o raída para luego cubrir la zona con yeso adhesivo. Se observan los signos de enrojecimiento, úlceras y edemas. Esta prueba puede repetirse, y en la misma zona del cuerpo, durante todo un año.

**Test de toxicidad aguda o DL 50:**

Se obliga a los animales a ingerir una sustancia “calificada como peligrosa” hasta que la mitad de ellos muere después de una lenta y dolorosa agonía. Las pruebas de toxicidad aguda se llevan a cabo para determinar el potencial de un producto químico para causar lesiones o la muerte. Los animales son sometidos a estas sustancias mediante tres procedimientos distintos: oral, cutáneo o por inhalación. Esto significa que les introducen por la boca, la nariz o la piel, sustancias que explotan, se encienden solas o les corroen la piel.

**Cabe decir que el único periodo de estrés a que deben ser sometidos los animales es el tiempo que se les mantiene en los cepos, durante la exposición a la sustancia de prueba.** La administración de analgésicos o sedantes puede modificar la respuesta inflamatoria a evaluar. Por lo tanto, no se debe administrar este tipo de sustancias ni otros medicamentos a los animales durante el tiempo que dura la prueba.

Siempre estas pruebas in vivo deben realizarse por triplicado y usando como referencia conejos sanos para no interpretar de manera inadecuada los resultados.

El procedimiento de los ensayos son:

1. El día anterior a la prueba debe rasurarse el dorso del animal en el área de aplicación de los parches con la rasuradora eléctrica, utilizando primero el peine para facilitar su corte. Esto debe hacerse cuidadosamente, sin lesionar la piel al rasurar.

2. Los parches a aplicar deben ser ocluidos, preparándose como sigue: El material de prueba se aplicará directamente al animal, cubrir con el parche de gasa quirúrgica esterilizada de 2 x 2 cm, con un grosor de 4 a 8 monocapas, colocado en cualquier sitio del dorso del animal. Considerar como control cualquier otra área de la piel en esta zona. En el caso de líquidos, aplicar 0,4 ml, en el caso de sólidos, polvos o pastas sujetar el parche a la piel en uno de los lados utilizando tela adhesiva, colocar el material de prueba 0,4 g sobre la piel, y cerrar el lado restante del parche con tela adhesiva. Los sólidos y polvos deberán ser molidos y tamizados antes de pesar.

Cuando el material de prueba contenga sustancias volátiles, se debe permitir la evaporación del disolvente antes de aplicar el material de prueba con la sustancia y de colocarlo en la piel del animal.

Evaluación de la prueba

- Se debe realizar la evaluación a las 18 horas
- Repetir la evaluación 24 horas más tarde (es decir 48 horas después de haber removido el parche).

- La evaluación de todos los animales debe realizarse colocándolos bajo una fuente de luz blanca fluorescente de 160 watts, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo negro plano. Esta evaluación debe hacerse por dos técnicos, los cuales deben estar de acuerdo en la calificación que se registre.
- Además, cuando la respuesta sea difícil de evaluar pueden compararse los sitios de aplicación del parche de otros animales en el grupo de prueba y en el control antes de emitir la calificación.

El tiempo de aplicación del parche varía dependiendo de la naturaleza del producto (4)

## **1.9 CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO**

El objetivo del control de calidad de la materia prima y producto cosmético terminado es asegurar tanto el cumplimiento de las especificaciones establecidas para la formulación como la mantención de las características y composición del producto en forma constante desde un lote de producción a otro.

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

El control de calidad se realiza con la determinación de las propiedades organolépticas y físicas de los extractos de Pera, Jacaranda, y mucílago de las semillas de Salvia Hispánica.

#### **1.9.1.1 Apariencia.**

Análisis visual del aspecto de los extractos vegetales.

### **1.9.1.2 Color.**

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y si existe la separación de capas. Se anota los resultados.

### **1.9.1.3 Olor.**

Se toma un tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

### **1.9.1.4 Determinación del pH**

El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menos acidez de una solución en función de los iones hidrógeno. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = -\log a[\text{H}^+]$$

$$a[\text{H}^+] = \text{Actividad de los iones hidrógeno}$$

En la práctica, la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o analógico.

Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

### 1.9.1.5 Densidad Relativa.

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa y un volumen de la sustancia a ensayar a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

$$D(25^{\circ}C) = \frac{(M2 - M) - (M1 - M)}{VOLUMEN}$$

**Donde:**

M1: Peso de picnómetro con la muestra (g)

M2: Peso del picnómetro con agua (g)

M: Peso del picnómetro vacío (g)

### 1.9.2. FORMULACIÓN CUTÁNEA HIDRATANTE

Las cremas hidratantes son un producto cosmético que ayuda a combatir la sequedad de la piel, además de darle suavidad.

Son emulsiones con fases que consisten en dos líquidos que no se mezclan completamente. La fase interna o discontinua se dispersa como glóbulos finitos en la otra. Las emulsiones grasas en agua, tiene como fase dispersa al aceite o grasa y al agua como fase continua. En las emulsiones agua en aceite el agua esta dispersa en el aceite, la cual es la fase externa.

Los principales ingredientes en una crema hidratante son el agua y el aceite. La proporción de aceite y agua que está presente en la crema hidratante es lo que diferencia una crema hidratante de otro. Las personas con piel seca deben elegir una crema



hidratante que es a base de aceite y productos que estimulen la producción de sustancias que regeneren la elasticidad y tersura de la piel.

Entre la formulación más utilizada encontramos:

- **Ácido esteárico:** (octadecanoic acid) El ácido esteárico es un ácido graso ceroso y sólido, cuyo nombre proviene de la palabra griega 'Stear', que significa "sebo".



**FIGURA N° 9 ACIDO ESTEÁRICO**

Aunque el ácido esteárico se encuentra tanto en aceite de origen animal y vegetal, es más abundante en la grasa animal (alrededor del 30%) que en la grasa vegetal (menos del 5%) salvo excepciones como las excepciones importantes son manteca de cacao y la manteca de karité, donde el contenido de ácido esteárico (como triglicérido) es de un 28-45%.

En general las aplicaciones de ácido esteárico explotan su carácter bifuncional, con un grupo de cabeza polar que se puede conectar a los cationes metálicos y una cadena no polar que confiere solubilidad en disolventes orgánicos. La combinación conduce a la utiliza como un agente tensioactivo y agente suavizante.

- **Propilenglicol:** 1,2-Dihydroxypropane; 1,2-Propanediol; 1,2-Propylene glycol; 2,3-Propanediol; Isopropylene glycol; Propylene glycol; Trimethyl glicol.

Es un líquido aceitoso claro, que podemos encontrar en cosméticos, pastas dentales, alimentos y cervezas. Es un solubilizador que asegura una distribución homogénea de los ingredientes en todo el producto, para mejorar su efectividad. Es un humectante.

- **Trietanolamina (TEA):** Líquido incoloro o amarillento, viscoso y con un ligero olor a amoníaco o inodoro. Se comercializan trietanolaminas de distinta pureza que son mezclas de mono, di y trietanolaminas. Se utiliza como agente alcalinizante puesto que presenta la ventaja de no ser irritante como otros álcalis. Base saponificadora que reacciona con un ácido (como el ác. esteárico) para formar jabón natural.

### **1.9.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS METODO BAM**

#### **1.9.3.1 OBJETO**

El propósito de este procedimiento específico es, establecer el procedimiento para determinar microorganismos en cosméticos.

#### **1.9.3.2 ALCANCE**

Este procedimiento se aplica para el análisis microbiológico de cosméticos.

#### **1.9.3.3. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO**

Determinar los principales microorganismos que crecen y se reproducen en los productos cosméticos. Los microorganismos pueden causar cambios y deterioro químico en los productos cosméticos y daños para el usuario. Los Métodos para el aislamiento de microorganismos de los productos cosméticos son: el recuento directo de colonias y el cultivo de enriquecimiento. Los productos que no son solubles en agua son tratados inicialmente para hacerlos miscibles antes de los procedimientos de aislamiento.

Los microorganismos aislados son identificados por los métodos microbiológicos de rutina o por pruebas de identificación comercial.

El esquema de estos análisis se resume a continuación. Esquema para el recuento, aislamiento e identificación de microorganismos en cosméticos.

- ▲ Preparación de la muestra.
- ▲ Diluir la muestra preparadas en MLB.
- ▲ Distribuir uniformemente 0.1 ml de muestra por duplicado en placas de:

(a)	(b)	(c)	(d)
MLA 48 horas, 30 ° C	(PDA o MEA) con clortetraciclina 7 días, 30 ° C	BP (o VJ) agar 48 horas, 35 ° C (opcional)	Agar para anaerobios MLA 2-4 días, 35 ° C

- ▲ Enriquecer diluciones MLB durante 7 días, a 30 ° C. Aislar de las diluciones que muestren crecimiento sólo si no hay colonias en las placas de MLA.
- ▲ Contar las colonias y aislar las colonias de interés de MLA y agar MacConkey (y BP o agares VJ si se utiliza en (c), arriba). De los hongos aislados, véase el texto.
- ▲ Determinar la reacción de Gram, forma de la célula, y la producción de catalasa de los aislamientos purificados.
- ▲ Proceder a la identificación de los aislamientos bacterianos como se describe en el texto, o utilizar pruebas de identificación.

#### **1.9.3.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Los Métodos para el aislamiento de microorganismos de los productos cosméticos se basan en:

- ⤴ El recuento directo de colonias y el cultivo de enriquecimiento.
- ⤴ Los productos que no son solubles en agua son tratados inicialmente para hacerlos miscibles antes de los procedimientos de aislamiento.

#### **1.9.3.5. TÉRMINOS Y DEFINICIONES**

Cosmético: objetos destinados a ser frotados, vertidos, rociados, o aplicados en aerosol, introducidos a, o de lo contrario se aplica al cuerpo humano o parte de ella para limpiar, embellecer, fomentar la atracción, o alterar la apariencia, y (2) objetos de uso como un componente de tales artículos, excepto que dicho término no se incluyen jabón.

#### **1.9.3.6. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA COSMÉTICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Desinfectar la superficie del envase de la muestra con la mezcla acuosa de etanol al 70% (v / v) y HCl al 1% (v / v) u otro desinfectante antes de la apertura y la toma de muestra. Use campana de flujo laminar, si es posible. Seque la superficie del envase con una gasa estéril antes de la apertura. Tomar una muestra representativa para el análisis microbiológico, por ejemplo, 1 g (ml) de la muestra. Para productos que pesen menos de 1 g (ml), analizar todo el contenido. Si sólo hay una unidad de muestra para diversos análisis, (tales como microbiológico, toxicológico y químico), primero tomar la submuestra para el análisis microbiológico, antes que para los otros análisis. En esta

situación, la cantidad de sub-muestra utilizada para el análisis microbiológico dependerá del número de análisis a realizarse en la muestra. Por ejemplo, si el contenido total de la muestra es de 5 ml, usar de 1 o 2 ml para los análisis microbiológicos.

#### **1.9.3.7. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Los Métodos para el aislamiento de microorganismos de los productos cosméticos se basan en:

- △ El recuento directo de colonias y el cultivo de enriquecimiento.
- △ Los productos que no son solubles en agua son tratados inicialmente para hacerlos miscibles antes de los procedimientos de aislamiento.

#### **1.9.3.8. TERMINOS Y DEFINICIONES**

Cosmético: objetos destinados a ser frotados, vertidos, rociados, o aplicados en aerosol, introducidos a, o de lo contrario se aplica al cuerpo humano o parte de ella para limpiar, embellecer, fomentar la atracción, o alterar la apariencia, y (2) objetos de uso como un componente de tales artículos, excepto que dicho término no se incluyen jabón.

#### **1.9.3.9. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA COSMÉTICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Desinfectar la superficie del envase de la muestra con la mezcla acuosa de etanol al 70% (v / v) y HCl al 1% (v / v) u otro desinfectante antes de la apertura y la toma de muestra. Use campana de flujo laminar, si es posible. Seque la superficie del envase con una gasa estéril antes de la apertura. Tomar una muestra representativa para el análisis microbiológico, por ejemplo, 1 g (ml) de la muestra. Para productos que pesen menos de

1 g (ml), analizar todo el contenido. Si sólo hay una unidad de muestra para diversos análisis, (tales como microbiológico, toxicológico y químico), primero tomar la submuestra para el análisis microbiológico, antes que para los otros análisis. En esta situación, la cantidad de sub-muestra utilizada para el análisis microbiológico dependerá del número de análisis a realizarse en la muestra. Por ejemplo, si el contenido total de la muestra es de 5 ml, usar de 1 o 2 ml para los análisis microbiológicos.

#### **1.9.10. INFORME DE RESULTADOS**

Reporte el resultado como Recuento de Aerobios en Placa / g (ml) de muestra. Si las placas no contienen colonias de 25 a 250, registrar la dilución y el número de colonias presentes.

Para placas de BP, contar las colonias típicas (convexas, de color negro brillante, con o sin halo transparente que rodea la colonia). (NOTA: las colonias coagulasa positivos producen un halo transparente, pero las colonias coagulasa negativos pueden o no producir este halo. Si las colonias coagulasa negativa presentan el halo, esta irregularidad se reporta distinguiéndolas de las colonias coagulasa positivas.)

Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la dilución más concentrada, presentar el resultado como número estimado de UFC menor que ( $<$ ) 1,0 multiplicado por el respectivo factor de dilución. De la misma forma reportar en el caso de que en la dilución menos concentrada presente más de 250 colonias.

De cada placa de crecimiento de BP demuestra, escoger una o más colonias típicas para confirmar su reacción coagulasa. La transferencia de las colonias de agar inclinado de cualquier medio de mantenimiento adecuado, por ejemplo, trypticasa (tríptico) agar de

soja (TSA), la infusión de cerebro-corazón (BHI) agar. Incubar se inclina hasta que el crecimiento es evidente.

Calcular el número de organismos *Staphylococcus aureus* presente en primer lugar la determinación de la fracción de las colonias de prueba que son coagulasa positivos. Multiplique esta fracción por el número promedio de colonias de *Staphylococcus* contaba con las placas de BP. Multiplicar el número obtenido por el factor de dilución y reportar el número de *S. aureus* / g (ml) de muestra.

Si no se obtienen en las colonias de MLA o BP medios de comunicación, observamos que ya prepara diluciones MLB mientras que enriquecer a  $30 \pm 2$  ° C durante 7 días. Examine enriquecimientos diariamente para crecer. Después de 7 días de incubación, o cuando el crecimiento se sospecha, la subcultura todos los enriquecimientos en los dos ejes de acción de las placas de agar Mc Conkey. Incubar las placas 48 horas a  $30 \pm 2$  ° C.

Hongos, levaduras, mohos y recuento en placa. La transferencia de 0,1 ml de diluciones seriadas (HI, más arriba) debidamente etiquetados para placas duplicadas de cualquiera de agar extracto de malta (MEA) o la patata dextrosa agar (PDA), ambos con 40 ppm de clortetraciclina. Corre el inculó sobre la superficie del medio con la barra de esparcidor de vidrio estéril. Después de inculó es absorbida por el medio, invertir las placas e incubar a  $30 \pm 2$  ° C, y observar al día durante 7 días. La media de los recuentos obtenidos en las placas de duplicar, multiplicar por 10 para permitir el volumen plateado (0,1 ml), se multiplica por el factor de dilución, y el informe como la levadura o el moho contar / g (ml) de muestra. De enriquecimiento por hongos (opcional), diluir la muestra preparada decimalmente en caldo Sabouraud dextrosa e incubar como se describió anteriormente para las diluciones de las Grandes Ligas. Si se produce el crecimiento, la

racha en agar glucosado de Sabouraud, MEA, o PDA. Los últimos dos agares que contienen 40 ppm de clortetraciclina.

Recuento en placa anaeróbico (uso sólo para talcos y polvos). El objetivo principal de este procedimiento es detectar el bacilo tetánico (*Clostridium tetani*), lo que puede ocurrir en estos productos. Según lo descrito anteriormente para APC, utilizando agar MLA, antes de la reducción de agar anaerobio, y el 5% de agar sangre de oveja desfibrinada para la siembra. Incubar las placas de agar sangre en la atmósfera de dióxido de 5.10% de carbono (frasco de vela o una incubadora de CO<sub>2</sub>), y las placas de agar anaerobio en la marmita de anaerobios. Incubar ambos durante 48 horas antes del conteo. Encubarlo durante 2 días más si no aparecen colonias a las 48 h. Pre-reducir las placas de agar anaeróbico antes de la inoculación, colocándolos en una atmósfera anaerobia durante la noche (16.12 h). Incubar las placas de agar anaerobio en un ambiente anaeróbico (frasco anaeróbico, incubadora, o en la guantera) por 2 días a  $35 \pm 2$  ° C, incubar las placas aeróbicamente MLA durante 2 días a  $35 \pm 2$  ° C como el control de aeróbicos. Anaerobios estrictos sólo crecerá en la marmita de anaerobios. Se recomienda que una pequeña cantidad (0,1 ml) de inoculó se utiliza para disminuir la expansión del crecimiento causado por la humedad, y que las placas inoculadas se colocan en una atmósfera anaerobia en cuestión de minutos después de la inoculación para reducir al mínimo la exposición al oxígeno.

Organismos anaeróbica sospecha se subcultivaron aeróbicamente (en CO<sub>2</sub>) y anaeróbica para establecer su relación oxígeno cierto. Compruebe si hay esporas terminales situados en el caldo de carne cocida se incuba a 35 ° C durante 2 días. El uso de una tinción diferencial de esporas para detectar las esporas es obligatorio.



Si un microorganismo anaeróbico obligado está aislado, consulte AD Hitchins, FDA, Washington, DC 20204, para obtener información sobre cómo proceder. Prueba de detección para el número total de microorganismos presentes en los cosméticos utilizados y no utilizados. Medios sólidos, temperaturas de incubación y tiempos descritos en H 3.1 se puede aplicar, según proceda, a las muestras preparadas como se muestra en 1.5 G a los cosméticos de pantalla para el recuento total antes de realizar las evaluaciones microbiológicas completa como se describe en H 1-3 arriba. Si la muestra contiene <10 ufc por ml o gramos de producto, una prueba de detección con 1 ml de la dilución de 10-1 en la técnica de placa verter debería dar resultados negativos de crecimiento. Si la muestra contiene <100 UFC por ml o gramos de producto, una prueba de detección con 0,1 ml de la dilución de 10-1 en la técnica de placas diseminaron debe producir un resultado un crecimiento negativo.

## **CAPITULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.**

La presente investigación se desarrolló:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Barrio El Batán Área adaptada para animales de experimentación

#### **2.2 FACTORES DE ESTUDIO.**

Se consideraron como factores de estudio de esta investigación:

- Preparación de extractos de jacaranda, pera y mucílago de salvia hispánica.
- Elaboración de la crema hidratante.
- Actividad hidratante de la crema corporal a base de pera, jacaranda y mucílago natural extraído de la semilla de Salvia Hispánica.

#### **2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

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

- Piel de conejos experimentales debido a su sensibilidad similar a la de la piel humana.

- Pera, Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), Salvia Hispánica, recolectado 2 de febrero del 2013 en el Mercado mayorista de la ciudad de Ambato y los jardines de la ciudad de Riobamba.

### 2.3.2 EQUIPOS.

- Balanza técnica (ELB 300),
- pH metro (JENWAY 430),
- Reverbero Eléctrico,
- Microscopio,
- Viscosímetro,
- Estufa,
- Equipo de baño maría
- Centrifuga
- Cámara Digital,
- Sorbona.
- Computadora
- Refrigeradora

### 2.3.3 MATERIALES DE LABORATORIO

- Pipetas 1, 5, 10 ml,
- Pera de succión,
- Varilla de agitación,
- Ollas,
- Cuchillos,
- Frascos de vidrio,
- Gradilla,
- Tubos de ensayo,
- Pinzas para tubos,
- Toallas absorbentes,
- Embudos,
- Cajas petris,
- Picnómetro,
- Vasos de precipitación 25,50, 100, 500 y 10
- Espátulas
- Frascos o recipientes contenedores

#### 2.3.4 REACTIVOS

- Agua
- Ácido esteárico
- Glicerina
- Alcohol Cetílico
- Extracto de pera,
- Estearato de glicerilo
- TEA
- Propilenglicol
- Reactivo de Shinoda,
- Reactivo de Dragendorff,
- Reactivo de Libermann Buchard,
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Borntrager
- Reactivo de Mayer
- Agua Destilada,
- Alcohol etílico,
- Reactivo de Fheling 1
- Reactivo de Fheling 2

## **2.4 TÉCNICAS**

### **2.4.1 PREPARACIÓN POR MACERACIÓN DE LOS EXTRACTOS**

#### **2.4.1.1 PREPARACIÓN POR MACERACIÓN DEL EXTRACTO DE JACARANDA**

Se extrae de la planta de la jacaranda una parte considerable de hojas y flores, se procede a lavar con agua con cloro el mismo que se pondrá en una cantidad de 5 mL por cada litro de agua y se lo deja sumergido por 5 min, luego se le lava con abundante agua y se procede a cortar en pedazos pequeños, después se procede a pesar 100,5 g de planta y se lo vierte en un envase de vidrio de boca ancha se añade 250 mL de alcohol etílico al 75% se le tapa herméticamente y se lo coloca en un lugar oscuro por 3 días, se lo agita de vez en cuando. Filtrar, el filtrado concentrar a  $\frac{1}{4}$  de su volumen colocar en frascos de vidrio herméticamente sellados, etiquetar, dejar en un lugar fresco y oscuro.

#### **2.4.1.2 PREPARACIÓN POR MACERACIÓN DEL EXTRACTO DE PERA**

Una vez conseguida la fruta se lava con solución de cloro al 0.5%, dejar 5 minutos en esta solución y luego se enjuaga con abundante agua.

Se extrae de la fruta una parte considerable de pulpa y lavar con agua completamente, se procede a cortar en pedazos pequeños, se coloca en la licuadora una cantidad aproximada de 500 g. y 750 de alcohol al 75% y se licua. Luego de esto se coloca el producto resultante en un frasco de boca ancha en un lugar oscuro durante 3 días aproximadamente agitando de vez en cuando. Filtrar, el filtrado concentrar a  $\frac{1}{4}$  de su volumen colocar en frascos de vidrio herméticamente sellados, etiquetar, dejar en un lugar fresco y oscuro.

### **2.4.1.3 SEPARACIÓN DEL MUCÍLAGO DE LA SEMILLA DE SALVIA HISPÁNICA**

Luego de obtener las semillas se pesa aproximadamente 20 g. y se coloca en un frasco boca ancha, a esto se le adiciona una cantidad de agua considerable hasta que las semillas estén tapadas totalmente por el agua, dejar reposar por el lapso de 15 minutos. Se procede a filtrar este producto teniendo cuidado de que las semillas no pasen por el filtro, el producto que se utilizará será el líquido resultante de la filtración. Una vez obtenido este líquido se procede a colocar en platos desechables color blanco para luego secarlos en la estufa a una temperatura de 60 °C por un período de tiempo de 20 a 30 minutos. Una vez seco el resultante se lo conserva en un lugar completamente seco para evitar una rehidratación.

### **2.4.1.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE PERA Y JACARANDA**

Para determinar cualitativamente los metabolitos presentes se utilizaron los solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. (33)

#### **2.4.2.1 Reacción Para Identificación de Compuestos Fenólicos**

**Ensayo de Cloruro Férrico.-** A 1 mL del extracto etanólico de tocte de color pardo, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua)

A 1 mL del extracto etanólico de pera de color pardo, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua) se determinó que es positivo porque presenta un cambio de color a marrón.

A 1 mL del extracto etanólico de jacaranda de color pardo, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua) se determinó que es negativo porque no presenta ningún cambio de coloración.

#### **2.4.2.2 Reacción Para Identificación de Triperpenoides**

**Ensayo de Libermann-Buchard.**-A 1 mL del extracto etanólico de jacaranda, se le añade 1 gota de reactivo.

La reacción se determina como positiva ya que la mezcla se torna, azul verdoso lo q no indica que tiene esteroides con doble enlace.(24)

#### **2.4.2.3 Reacción Para Identificación de Flavonoides**

**Ensayo de Shinoda.**- A 1 mL del extracto etanólico de Pera, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico.

Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. (33). El ensayo se consideró positivo, ya que el alcohol amílico se colorea de rojo

#### **2.4.2.4 Reacción Para Identificación de Alcaloides**

**Ensayo de Dragendorff.**- A 1 mL del extracto etanólico de pera y jacaranda por separado, se deja caer por la pared del tubo de ensayo 1 mL del reactivo y se agita.

Da como negativo ya que no cambia de coloración a naranja.(24)



#### **2.4.2.5 Reacción Para Identificación de Saponinas**

**Ensayo de Espuma.-** A 1 mL del extracto de pera, se añade un mismo volumen de agua y se procede a una agitación del tubo de ensayo. Se considera negativo ya que no aparece espuma en la superficie del líquido.

A 1 mL del extracto etanólico de jacaranda, se añade un mismo volumen de agua y se procede a una agitación del tubo de ensayo. Se considera negativo ya que no aparece espuma en la superficie del líquido.

### **2.5 ELABORACIÓN DE LA CREMA HIDRATANTE A BASE DE PERA, JACARANDA Y MUCILAGO DE LAS SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA**

#### **Formulación**

#### **Procedimiento de la Elaboración de la crema con extractos en mezcla:**

- ❖ Desinfectar todos los utensilios que vayamos a utilizar y la superficie de trabajo
- ❖ Pesar la cera (4 gr.), y calentar a baño maría hasta que se derrita.
- ❖ Pesar en la misma jarra todos los aceites y los mezclamos hasta homogenizar.
- ❖ Preparamos la fase acuosa con los ingredientes de elección extraídos y comprobados fitoquímicamente en las proporciones adecuadas.
- ❖ Incorporamos lentamente la fase oleosa (en este caso todos los aceites). Empieza a emulsionar convirtiéndose en un líquido blanco parecido a la

leche. Si se hace con la batidora suelen aparecer burbujas de aire que luego desaparecen. En este paso se realiza los cambios en cuanto a concentraciones y sustituciones de los ingredientes como es el caso del emulsificante por el mucílago.

- ❖ Se mueve hasta que va enfriando y la textura cambia totalmente.
- ❖ Luego se le adiciona los antioxidantes o también los aditivos necesarios así como los suplementos.

## 2.6 CONTROL DE CALIDAD DE LA CREMA

Se inicia la evaluación analizando sus propiedades organolépticas y físicas del producto final.

PARÁMETRO	MÉTODO	RESULTADO
COLOR	Visual	Blanco
OLOR	Olfato	Herbal
ASPECTO	Visual	Homogéneo
pH	Potenciómetro	6,39

**TABLA N° 7 PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO  
TERMINADO**

### **Determinación de untuosidad al tacto**

Se aplica una pequeña cantidad de la crema en el dorso de la mano y determinar si existe presencia o ausencia de grumos.

**Determinación de extensibilidad**

Se aplica 2g de crema en el centro de una placa de vidrio, poner encima otra placa. Colocar una masa de 2 kg sobre estas placas durante 3 minutos. Seguidamente se mide 8 radios y se calcula el promedio

Finalmente se halla el área de extensibilidad usando la formula  $A = \pi \cdot r^2$ .

**Determinación de la viscosidad**

Se mide la viscosidad en el equipo previamente calibrado con la cantidad suficiente de producto.

**2.7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS MÉTODO BAM****PREPARACION DE LA UNIDAD DE MUESTRA COSMÉTICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Desinfectar la superficie del envase de la muestra con la mezcla acuosa de etanol al 70% (v / v) y HCl al 1% (v / v) u otro desinfectante antes de la apertura y la toma de muestra. Use campana de flujo laminar, si es posible. Seque la superficie del envase con una gasa estéril antes de la apertura. Tomar una muestra representativa para el análisis microbiológico, por ejemplo, 1 g (ml) de la muestra. Para productos que pesen menos de 1 g (ml), analizar todo el contenido. Si sólo hay una unidad de muestra para diversos análisis, (tales como microbiológico, toxicológico y químico), primero tomar la submuestra para el análisis microbiológico, antes que para los otros análisis. En esta situación, la cantidad de sub-muestra utilizada para el análisis microbiológico dependerá del número de pruebas a realizarse en la muestra. Por ejemplo, si el contenido total de la muestra es de 5 ml, usar de 1 o 2 ml para los análisis microbiológicos.

### 2.7.1. PROCEDIMIENTO

La cantidad de muestra y el volumen de diluyente se ajusta de acuerdo a la cantidad de muestra disponible. Para incrementar la representatividad de la muestra a usarse tomar varias sub-muestras aleatoriamente y mezclarlas, de aquí tomar la muestra representativa para el análisis. Los analistas deben usar su mejor juicio para determinar cuándo y la cantidad de muestra a ser combinada previo a su análisis.

1. **Líquidos.** Colocar 1 ml de muestra en 9 ml de caldo modificado Lethen (MLB), en un tubo de ensayo de 20 x 150 mm, para obtener la dilución  $10^{-1}$ .
2. **Sólidos y en polvo.** Asépticamente pesar 1 g de muestra en un tubo de ensayo de 20 x 150 mm, que contiene 1 ml de Tween 80 estéril. Mezclar la muestra con el Tween 80 usando una espátula estéril. Añadir 8 ml de MLB estéril y mezclar bien. Esta será la dilución  $10^{-1}$ .
3. **Crema y productos a base de aceite.** Asépticamente pesar 1 g de muestra en un tubo de ensayo de 20 x 150 mm que contiene 1 ml de Tween 80 estéril, más cinco-siete perlas de vidrio de 5 mm de diámetro (o diez-quince perlas de vidrio de 3 mm). Mezclar el contenido total con mezclador Vortex o por agitación manual. Ajustar el volumen total de 10 ml con MLB estéril (8 ml) para la dilución  $10^{-1}$ .
4. **Polvos, jabones líquidos y otros materiales en aerosol.** Descontaminar la boquilla de la lata del aerosol tanto como sea posible con una gasa humedecida con etanol al 70% (v / v). Presionar la boquilla para eliminar una porción inicial

de muestra y luego rociar la cantidad apropiada de muestra en un envase estéril tarado, por ejemplo, 1 g de muestra en 9 ml de MLB estéril. Mezclar bien la muestra y el caldo, y pesar de nuevo. Esta será la dilución de  $10^{-1}$  si se obtuvo exactamente 1 g de la muestra.

5. **Materiales anhidro.** Seguir el procedimiento del numeral 2 o 3, según corresponda.

### **2.7.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

No todos los análisis se describe a continuación necesariamente se llevará a cabo, sin embargo, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, enriquecimiento del cultivo y el recuento de hongos se debe realizar de forma rutinaria.

### **2.7.3. RECUENTO DE AERÓBIOS EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.**

Preparar y etiquetar por duplicado placas Petri que contienen agar modificado Lethen (MLA) para la siembra de las diluciones de la muestra desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

### **2.7.4. RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS SPP EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.**

Preparar y etiquetar por duplicado placas Petri que contienen agar BP para la siembra de las diluciones de la muestra desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , si se sospecha la presencia de *Staphylococcus* spp.

### **2.7.5. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES EN BASE 10.**

Añadir 5 ó 10 ml de la preparación de cosméticos (véase n, arriba) a 45 o 90 ml, respectivamente, de MLB estéril, de esta manera se obtiene la dilución  $10^{-2}$ .

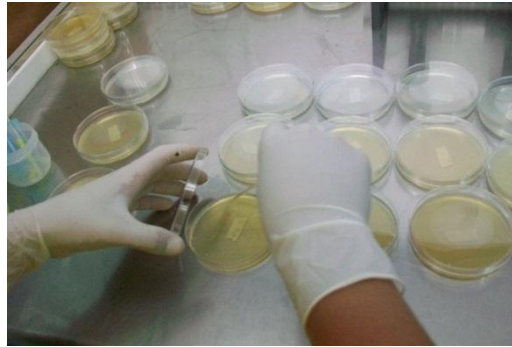
Diluir las muestras en forma decimal en MLB estéril (NOTA: conservar las diluciones para el paso de enriquecimiento), para obtener la serie completa de dilución de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  (Comience con  $10^{-2}$  si toda la dilución  $10^{-1}$  se agota.)

### **2.7.6. SIEMBRA**

Mezclar bien las diluciones y colocar 0,1 ml de cada dilución en las superficies de las placas previamente preparadas con los medios indicados. Sembrar por duplicado. Se propaga el inóculo sobre toda la superficie usando una con varilla de vidrio doblada, que se esteriliza por primera vez por la inmersión en etanol al 95% y flameado rápido para eliminar el etanol. Dejar que el medio absorba el inóculo antes de invertir e incubar las placas durante 48 horas a  $30 \pm 2$  ° C ( $35$  ° C para las placas BP). Use un esparcidor nuevo para cada dilución (en diluciones bajas), ya que algunos residuos del producto puede llevar a más y afectar negativamente el procedimiento de esterilización en la llama. Para una efectiva absorción del inóculo, asegúrese que superficie del agar este seca (30 min a  $35$  ° C) cuando el agar este recién hecho.

### **2.7.7. RECUENTO**

Contar todas las colonias en las placas que contienen de 25 a 250 colonias, y registre los resultados de cada dilución dentro del rango indicado. Obtenga un promedio de los recuentos obtenido por duplicado, y multiplicar este promedio por 10 y luego por el factor de dilución correspondiente ( $10^{-1} - 10^{-6}$ ).



**FOTOGRAFÍA N. 1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA  
(AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES T. Y *E. COLI*).**

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

### **2.7.7.1. INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS**

*Limites Microbianos CTFA (The Cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association)*

*Cuantitativos*

Productos para bebe menos de 100 ufc/g o mL

Productos para el áreas de los ojos menos de 100 ufc/g o mL

Resto de productos menos de 1000 ufc/g o mL

*Cualitativos*

Ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

*Limites microbianos European comission*

Definen dos categorías de cosméticos

Categoría 1: Productos dirigidos a niños menores de 3 años, área de los ojos y membranas mucosas.

*Categoría 2: Otros productos*

*Limites cuantitativos*

Categoría 1: Total de m.o. aeróbico mesófilos viables menos de 100 ufc/g o mL en 0.5 g o mL de producto.

Categoría 2: Total de m.o. aeróbico mesófilos viables menos de 1000 ufc/g o mL en 0.1 g o mL de producto.

*Limites cualitativos*

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* son considerados los principales patógenos potenciales en productos cosméticos.

Las pruebas específicas para estos patógenos no deben ser detectados en 0.5 g o mL en productos cosméticos de la categoría 1 y en 0.1 g o mL en cosméticos de categoría 2.

**2.8.METODOLOGÍA****2.8.1 FASE DE CAMPO**

La recolección del material vegetal se lo hizo en el Mercado Mayorista de la ciudad de Ambato y de los jardines de la ciudad de Riobamba, se recolectó las hojas y flores de los vegetales respectivamente.

Los mismos que fueron etiquetados y se trasladados al Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias.

Previamente estuvo definido el grupo de conejos a utilizarse para las pruebas de sensibilidad.

Dichos conejos atravesaron varias fases en el proceso de experimentación que se detallan a continuación:



## 1. Primera etapa o de adaptación

### - Ambiente

Una vez adquiridos los animales de 1-3 Kg., de la misma camada de máximo tercera generación, que sean de edad aproximada a dos meses, de cualquiera que esta sea la forma, se los adapta al ambiente y al lugar donde permanecerán durante el período de los análisis, esto será en jaulas o cepos que resulte lo más cómodo posible para que el animal pueda movilizarse sin ningún inconveniente para no causarle estrés innecesario al conejo. El cambio de camas se lo realizará cada pasando un día ya que se tendrá al animal en condiciones asépticas para evitar enfermedades innecesarias.

### - Alimentación

Al animal se lo adaptará de acuerdo al tipo de comida que nosotros deseemos como será en este caso pellets y agua en cantidad suficiente de acuerdo al tamaño del animal.

Se debe alternarla con su comida hasta lograr la sustitución de la misma y no provocar un cambio brusco en el conejo y mucho menos que este se muera por falta de alimentación.



**FOTOGRAFÍA N° 2 ADAPTACIÓN DE LOS ANIMALES**

## 2. Segunda etapa o preparación del animal

- Ambiente

En esta fase el animal se encuentra completamente adaptado y cómodo en su hábitat, no es necesario moverlo de su espacio a menos que sea completamente necesario o para aseo.

- Alimentación

Se le proporcionará la cantidad suficiente de comida al animal ya que no se verá un efecto interno.

Aquí se realiza la rasurada de la lana del animal 24 horas antes de iniciarse la experimentación, la cual se realiza a los dos lados de la columna vertebral y limpiando la zona para posterior aplicación del producto.



**FOTOGRAFÍA N° 3 RASURADO DE LOS ANIMALES**

## 3. Tercera etapa o experimental

Es la etapa misma de la experimentación en la cual el animal debe ser tratado de la manera más humana posible y cuidadosa para no provocarle un sufrimiento más allá de lo necesario.

La calidad de las pruebas no se prestan como para ocasionarle muerte al animal ya que son fácilmente recuperados.

La aplicación del producto se lo realizará cada 1, 2, 4, 18, 24, y 48 horas a partir de la primera aplicación, de esta manera se podrá evaluar con mayor claridad los efectos del producto.



**FOTOGRAFÍA N° 4 FASE DE EXPERIMENTACIÓN**

#### **4. Cuarta etapa o recuperación**

Representa la recuperación propia del animal en la cual puede ser incluso liberada o utilizada para pruebas posteriores sin ningún posible daño. Si se desea volver a utilizarlo se lo someterá nuevamente a su preparación desde la primera etapa como si este hubiese sido adquirido por primera vez.



**FIGURA N° 5 RECUPERACIÓN COMPLETA DEL ANIMAL**

#### **PRECAUCIÓN:**

En caso de presentar laceraciones profundas en la piel y sin solución, se requiere que al animal se le practique un sacrificio lo más humano posible para evitar de esta manera su sufrimiento, así como el posible contagio a los otros animales que se encuentran completamente sanos.

Los conejos utilizados para comprobar la eficacia y seguridad del producto elaborado el cual se determinó mediante las pruebas de sensibilidad e irritabilidad, atraviesan varias etapas descritas anteriormente y resumidas a continuación:

ETAPA	CARACTERISTICAS
1° Etapa ADAPTACIÓN	Ambiente: jaulas o cepos que resulte lo más cómodo posible al conejo Alimentación: Alternada para lograr una adaptación progresiva.
2° Etapa PREPARACIÓN	Ambiente: jaulas o cepos completamente limpios. Alimentación: Pellets y agua suficiente Rasurada del animal a los lados de la columna vertebral y limpieza de la zona
3° Etapa EXPERIMENTACIÓN	Análisis de irritabilidad dérmica en donde se realiza la experimentación misma en donde se obtendrá resultados requeridos para la comprobación de la calidad del producto.
4° Etapa RECUPERACIÓN	Recuperación del animal o si es el caso el sacrificio del mismo.

**TABLA N° 8 ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES**

**EXIGENCIAS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN PARA ALMACENARLOS.**

<b>CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b>			
<b>ESPECIE</b>	Conejos Albinos	<b>CEPOS</b>	Metálicos o plásticos individuales
<b>PESO</b>	Entre 1-3 Kg.	<b>TIEMPO DE LA PRUEBA</b>	Máximo 10 min.
<b>SEXO</b>	Indistinto	<b>EVALUACIÓN</b>	30 o 60 minutos después de remover el parche, a las 24 horas y a las 72 horas de iniciada la prueba.
<b>VALIDACIÓN</b>	Por triplicado	<b>TEMPERATURA</b>	22± 1 °C
<b>PIEL</b>	Sin laceraciones	<b>CALIFICACIÓN</b>	Presencia o ausencia de edema e irritación.
<b>HUMEDAD</b>	50±5%	<b>ALIMENTACIÓN</b>	Agua y pellets en cantidad suficiente

**TABLA N° 9 EXIGENCIAS Y CONDICIONES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

**En donde:**

Cepo: Es el aparato que sirve para sujetar e inmovilizar animales para experimentación.

Edema: Inflamación producida por acumulación excesiva de líquido seroalbuminoso en el tejido celular, debida a diversas causas.

Eritema, enrojecimiento difuso o en manchas de la piel, producido por la congestión de los capilares, debido a diversas causas.

Hemólisis, desintegración de los corpúsculos sanguíneos con liberación de hemoglobina.

Inducción, acción y efecto de inducir o causar una reacción por aplicación de un agente.

Irritación dérmica, alteración fisiológica de la piel provocada por algún agente físico, químico o biológico.

**2.8.2 FASE DE LABORATORIO**

En el laboratorio se realizó el siguiente procedimiento para la determinar la actividad hidratante de la crema.

- Ensayo de control de calidad de la crema hidratante.
- Determinación de la actividad hidratante con la aplicación de la crema directamente en la piel de los conejos de raza californiana.

Además se realizó un tratamiento estadístico de los datos:

- Análisis estadístico usando pruebas Anova
- Separación de medias utilizando la prueba de Tukey al 5%.
- Coeficiente de variación.

### **2.8.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDRATANTE.**

- Una vez ya elaborada la crema con pera, jacaranda y mucílago de semillas de salvia hispánica procedemos a realizar pruebas in vivo en animales de experimentación que son los conejos de raza californiana, para comprobar su actividad hidratante.
- Luego la crema elaborada con la mezcla de los vegetales, de igual forma se procedió a realizar pruebas in vivo en los conejos con dos formulaciones diferentes, realizadas de la misma manera pero con mayor concentración de jacaranda que de pera en esta ocasión será la pera la que se adiciona al final como aroma del producto, esto se hizo cada 1, 2, 4, 24, 48 horas para comprobar la actividad a diferentes dosis.
- Se registra el número de veces que se aplica el producto y las reacciones o el diámetro de enrojecimiento que presenta el área expuesta al producto, de la misma manera se comprueba con una crema control que en este caso fue Lubriderm a las mismas dosis.



## 2.9.TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se realizó 2 tratamientos con la gel y un control (Lubriderm) con una dosificación cada 1,2,4,24,48 horas determinando en 6 conejos para el producto y sus diferentes mezclas y 2 para el control.

CUADRO N. 1 APLICACIÓN DE LA CREMA CON PERA, JACARANDA Y MUCÍLAGO DE LAS SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA Y CONTROL (Lubriderm)

Formulaciones	Intervalos de Aplicación
<b>F1 MCBP</b>	1,2,4,24,48
<b>F2 MCBP</b>	1,2,4,24,48
<b>F3 MCVJ</b>	1,2,4,24,48
<b>F4 MCVJ</b>	1,2,4,24,48
<b>F5 MCBV</b>	1,2,4,24,48
<b>F6 MCBV</b>	1,2,4,24,48

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

### NOMENCLATURA

F: Formulación

MCBP: Muestra crema blanca- pera

MCVJ: Muestra crema verde- jacaranda

MCBV: muestra crema blanca- verde (mezcla)

MCC: muestra crema control

## 2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

### 2.10.1. TEST DE ANOVA.

Es el más simple de todos los diseños ya que se puede comparar cualquier número de tratamientos que se aplican a las unidades experimentales al azar con cualquier número de repeticiones es posible, mejor estimación del error experimental que otro diseño.

Procedimiento estadístico que sirve para medir la variación total de las observaciones a la que se divide para sus componentes quedando el residuo como error experimental. (12)

#### 2.10.1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Identificar la variable respuesta

Identificar el factor de interés

Identificar las unidades experimentales

Identificar el modelo

Variable respuesta: Porcentaje de efectividad del tratamiento

Factor de interés: Formulación (absorción)

Unidades experimentales: conejos

Modelo:  $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$

$\mu$ : es la media global, asociada con un parámetro desconocido

$\alpha_i$ : efecto debido al tratamiento utilizado

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

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \text{ para } i \neq j$$

TABLA DE ANOVA				
FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	PRUEBA F
TRATAMIENTO	$SC_{TRAT}$ $= \sum_{i=1}^k \frac{(Y_i)^2}{n_i} - \frac{(Y_{..})^2}{N}$	$k - 1$	$SC_T = \sum_{i=1}^k \frac{(Y_i)^2}{n_i} - \frac{(Y_{..})^2}{N} / k-1$	$\frac{SC_T}{SC_E}$
ERROR	$SC_E$ $= SC_T - SC_{TRAR}$	$N - k$	$SC_E$ $= (SC_T - SC_{TRAR}) / N - k$	
TOTAL	$SC_T$ $= \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij})^2 - \frac{(Y_{..})^2}{N}$	$N - 1$		

TABLA N° 10 TABLA ANOVA

n: número de observaciones por tratamiento

k: número de tratamientos

N: número total de observaciones en el diseño

$Y_{ij}$ : observación  $j$  – ésima del tratamiento  $i$  – ésimo

$Y_i$ : suma de las observaciones en el tratamiento  $i$

$\bar{Y}_i$ : promedio de las observaciones en el tratamiento i

$Y_{..}$ : suma de todas las observaciones

$\bar{Y}_{..}$ : promedio de todas las observaciones (12)

### 2.10.2 ANÁLISIS DE VARIANZA

Es el procedimiento estadístico que nos sirve para medir la variación total de las observaciones, la que se divide para sus componentes, quedando el residuo como error experimental. Este análisis nos indica la relación entre una variable dependiente (actividad absorbente o hidratante) y los factores independientes (concentraciones y tiempos de aplicación de la crema elaborada).

El análisis de varianza es un método en el que se puede comparar dos o más medias de las observaciones o de los tratamientos, además nos permite medir la variación de las respuestas numéricas como valores de evaluación de diferentes variables nominales. (50)

### 2.10.3 PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY AL 5%

La prueba de Tukey es el procedimiento empleado para determinar las diferencias que existen entre las medias de los tratamientos realizados. (50) (12)

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(k, N - k)S_{\bar{Y}_i}$$

Donde

$$S_{\bar{Y}_i} = \sqrt{\frac{1}{d} * CME \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_{i'}} \right)}$$

n # de observaciones por tratamiento ;  $n_i \neq n_{i'}$

d # de observaciones diferentes por tratamiento

$N-k$  grados de libertad del error

$\alpha$  Nivel de significancia

$q_\alpha(k, N - k)S_{\bar{Y}_i}$  son los puntos porcentuales de la distribución de rango estudentizada.

Se declaran significativamente diferentes los pares de medias cuya diferencia muestral en valor absoluto sea mayor que  $T_\alpha$

Rechazar  $H_0$ : si  $|\bar{Y}_i - \bar{Y}_j| > T_\alpha$

Aceptar  $H_0$ : de otra manera



### CAPÍTULO III

#### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se resumen los resultados obtenidos en un cuadro de datos y valores, para luego discutir los mismos.

**CUADRO N. 2 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIBLIOGRÁFICAS DE LA MATERIA PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO.**

PARAMETRO	MÉTODO	RESULTADO EXTR. PERA	RESULTADO EXTR. JACARANDA	RESULTADO MUCILAGO	RESULTADO CREMA
ASPECTO	Visual.	Líquido de color café oscuro, olor característico.	Líquido de color café oscuro, olor herbal-agradable .	Cristalino, blando inoloro	Pastoso de color blanco-amarillento, olor agradable herbal.
Ph	Potenciómetro.	6,12	6,02		6,39
DENSIDAD g/ml	Picnometría.	1,04	1,21		0,9984

TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Olga Locck de Ugaz Solis.	Baljet (+)	Cloruro férrico (+) Lieberman Buchard (+) Dragendorff (+) Wagner (+) Baljet (+) Espuma (+) Catequinas (+)		Cloruro férrico (+) Shinoda (+) Espuma (+) Baljet (+)
COMPOSICIÓN QUÍMICA	Bibliografía	Taninos, Polifenoles, Flavonoles, Vitamina C	Ácido Jacoumárico, Ácido Ursólico, Jaranona, Azuleno.		Taninos, Flavonoides
USO TRADICIONAL	Bibliografía	Hipocolerética, Antiinflamator Afecciones digestivas	Elimina verrugas, Elimina arrugas Antiinflamatoria Antitumoral, Antimicrobiana Anticanceígena, Fotoprotector	Hidrata Saciante, Reducción de peso	Hidratante

Por medio del análisis de resultados de cada cuadro se indica las propiedades organolépticas, físicas, químicas y bibliográficas determinados en los diferentes extractos y principios activos utilizados.



El aspecto en la pera presenta un color café oscuro, con un olor agradable frutal, un pH de 6.12 próximo a la basicidad, la densidad de 1,04 g/mL siendo por lo tanto similar en densidad con respecto al agua.

En el tamizaje fitoquímico dio la presencia de compuestos, fenoles, flavonoídes, que están presentes en la fruta dando así su actividad, además de presentar un compuesto importante que es la vitamina C la cual contribuye a actuar como conservante tanto del extracto como del producto terminado.

El Extracto de Jacaranda presenta un color café obscuro, olor característico agradable herbal, su pH de 6,02 lo que significa próximo a la alcalinidad, una densidad similar al agua de 1,21g/mL.

En el tamizaje fitoquímico dió positivo la presencia de taninos, fenoles, flavonoídes y triterpenoides y en su composición química se destaca la presencia de ácido Jacoumárico, Jacaranona y ácido ursólico

Estos compuestos poseen propiedades regeneradoras de las células de la piel, curativas de llagas y acné severo, además de eliminar verrugas y ser antiinflamatorio.

El mucílago de las semillas de Salvia Hispánica presenta un color blanquecino casi transparente, sin olor completamente, muy blando y con rápida absorción de humedad si se lo deja al ambiente.

Sus usos más conocidos se sabe que son hidratación de la piel por poseer propiedades de retención de la molécula de agua, adelgazantes por su acción saciante y expansiva dentro de la cavidad abdominal por lo cual se usa mucho en regímenes de dietas estrictas.

El producto presenta un color blanco – amarillento y un olor característico a los ingrediente, es decir herbal y frutal, tiene una densidad 0,983g/mL inferior a la densidad del agua, con lo cual presenta un aspecto pastoso o cremoso, en el tamizaje fitoquímico dio la presencia de compuestos tales como , flavonoides, taninos; ya que en la composición química del vegetal esta la jacaranona y el ácido ursólico.

### 3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXCIPIENTES

**CUADRO N°3 CONTROL DE CALIDAD DEL ÁCIDO ESTEÁRICO (USP XXIII-FARMACIA REMINGTON 17ª EDICIÓN)**

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
DESCRIPCIÓN	Sólido, incoloro, sin olor, ceroso	Sin olor, ceroso, solido, seboso.
DENSIDAD g/mL	0.84	0.86
PUNTO DE FUSIÓN	69°C	68°C
SOLUBILIDAD	Alcohol, éter	Alcohol

**CUADRO N° 4 CONTROL DE CALIDAD DEL PROPILENGLICOL (USP XXIII)**

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
		PROPILENGLICOL
DESCRIPCIÓN	Sólido, incoloro, sin	Líquido, claro, sabor

	olor, ceroso	ligeramente acre
DENSIDAD g/mL	1.035- 1.037	1,035
PUNTO DE FUSIÓN	187°C	186°C
SOLUBILIDAD	Agua, alcohol	Agua

**CUADRO N° 5 CONTROL DE CALIDAD DEL TEA TRIETANOLAMINA TEA**  
(FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS V EDICIÓN)

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO TEA
DESCRIPCIÓN	Líquido, incoloro, viscos, ligero olor amoniacal	Líquido, incoloro, olor ligeramente amoniacal
DENSIDAD g/mL	1.20- 1.128	1.128
SOLUBILIDAD	Agua, alcohol	Agua

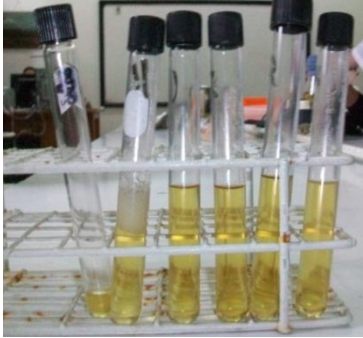
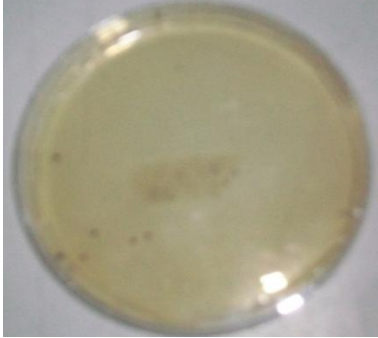
### 3.2.CONTROL DE CALIDAD DE LA CREMA.

**CUADRO N. 6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO, FÍSICO Y MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA**

PARÁMETRO	METODO	RESULTADOS
		GEL
ASPECTO	Visual	Blanco- amarillento, homogéneo, olor aromático herbal.

<b>Ph</b>	Potenciómetro. Valor Referencia (5,0 – 7,5)	6,39
<b>VISCOSIDAD</b>	Viscosímetro.	11542 cp – 91,1%
<b>CENTRIFUGACIÓN</b>	Centrífuga	Homogéneo
<b>DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS UFC/G</b>	Método AOAC (990.12 Recuento de aerobios, film seco rehidratable) 35±1 °C/ 48±2h	< 1
<b>DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES Y E. COLI. UFC/G</b>	Método AOAC (991.14 Recuento de coliformes y Escherichia coli, film seco rehidratable) 35±1 °C/ 48±2h	< 1
<b>DETERMINACIÓN DE LEVADURAS Y HONGOS UFC/G</b>	Método AOAC (997.02 Recuento de levaduras y mohos, film seco rehidratable) 20-25±1 °C/ 5 días	< 1

Es indispensable indicar que los parámetros color, olor textura y viscosidad de calidad no poseen estándares de referencia con los que se puedan comparar, por lo que tienen sus propias características. La crema de Pera, Jacaranda y mucílago de semillas de Salvia Hispánica presentan un olor característico agradable y su textura cremosa, con un pH de 7,54 que está dentro de las especificaciones y una viscosidad de 180332 cp característica de una crema. El control de calidad microbiológico se lo realizo con una muestra de crema con la mezcla de extractos en el que nos dio como resultado la ausencia de microorganismos por lo que los mismos se encuentran dentro de los rangos microbiológicos < 1 UFC/g tanto para Microorganismos Aerobios Mesófilos, Microorganismos Coliformes Totales y *E coli*, levaduras y hongos.

	
<p><b>TUBOS INOCULADOS CON MUESTRA</b></p>	<p><b>CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN DILUCION 10<sup>-1</sup></b></p>

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

**FOTOGRAFÍA N. 6 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DE LA CREMA  
(AEROBIOS MESÓFILOS COLIFORMES T. Y *E. COLI*).**

**3.3.BIOENSAYO**

**3.3.1. EXPOSICIÓN DE LOS CONEJOS AL PRODUCTO**



FUENTE: VERONICA CEVALLOS

**FOTOGRAFÍA N. 7 REALIZACION DE RASURADO DE PIEL EN CONEJOS**

En la realización de este procedimiento en todos los conejos nos dio la pauta de la piel que presentan los animales y el área donde se colocará el producto. Lo cual nos brindó información preliminar o presuntiva al ser una técnica rápida en un estudio cosmético.

### **3.3.2. APLICACIÓN DE LA CREAMA EN LA PIEL DE LOS CONEJOS**



#### **FOTOGRAFÍA N. 8 APLICACION DE LA CREMA EN CONEJOS**

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

Al realizar la aplicación de la crema se determina claramente que causa un malestar en los conejos no por el producto en sí, más bien al aplicarles el parche que deben estar colocados luego de la aplicación para evitar que se saquen el producto.

#### **3.3.2.1 PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

En esta prueba se determinó la sensibilidad que presenta el producto en los conejos, fue negativa ya que no se presentó ningún cambio de coloración, así como ninguna irritación en la piel de los conejos, más bien se determinó que los tiempos de absorción van dentro de lo esperado siendo el tiempo menor a la crema control (lubriderm)



**FOTOGRAFÍA N. 9 PRUEBA DE SENSIBILIDAD NEGATIVA EN LA PIEL DE LOS CONEJOS.**

FUENTE: VERNICA CEVALLOS

### **3.3.3 PRUEBA CONTROL CON LUBRIDERM**



**FOTOGRAFÍA N. 10 PRUEBA CONTROL CON LUBRIDERM.**

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

Al colocar la crema control que es lubriderm no se aprecia ningún cambio de coloración en la piel de los conejos así como en la apariencia de la misma, aunque el efecto que se desea conseguir es un poco más prolongado.

### 3.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA CREMA CON EXTRACTOS DE PERA, JACARANDA, Y MUCÍLAGO DE SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA.

Para determinar la actividad hidratante se procedió a aplicar la crema en los conejos raza californiana en dosis de 0,5g. cada 2, 4, 24 y 48 horas de la misma manera la crema control (Lubriderm) y se evaluó la sensibilidad y penetrabilidad de acuerdo al tiempo de acción que tienen los dos productos el conocido y el experimental.

F1 pera min.	F2Jacaranda min.	F3mezcla min.	FC Control min.
<b>1,99</b>	2,32	2,15	2,3
<b>2,02</b>	2,25	2,12	2,34
<b>1,98</b>	2,3	2,18	2,32
<b>2</b>	2,22	2,24	2,29

TABLA N° 11 RESULTADO DE LOS TIEMPOS DE ABSORCION DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE LA CREMA

Fuente: VERONICA CEVALLOS

Con los datos obtenidos se pudo determinar que la crema elaborada a base de extracto de pera, jacaranda, y mucílago de semillas de salvia Hispánica tienen diferente absorción a la crema usada como control,

Al conocer que la crema con la mezcla de los extractos se absorbe completamente en la piel y ese es el propósito de nuestra investigación se comprueba que el producto posee actividad hidratante con los tiempos obtenidos que son inferiores a la crema control.





**FOTOGRAFÍA N. 11 EFECTO DE LA CREMA ELABORADA A BASE DE  
EXTRACTOS Y MUCÍLAGO NATURAL**

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

**3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA  
CREMA**

**CUADRO N. 7 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE  
LA CREMA**

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	0,236675	3	0,078892	57,376	2,2E-07	3,49
<b>Dentro de los grupos</b>	0,0165	12	0,001375			
<b>Total</b>	0,253175	15				

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

Al analizar las variaciones que existen entre las distintas dosis de la crema con Pera, Jacaranda y mucílago de semillas de salvia hispánica se determinó la efectividad de la crema por medio de la reducción del tiempo de absorción en la piel de los conejos experimentales y al terminar el tratamiento se da una considerable eficiencia con la dosis de mayor concentración del extracto de pera del total de conejos analizados. Con estos datos se procede a elaborar Tukey al 5% para determinar las diferencias existentes entre las medias de las concentraciones de extractos de jacaranda y pera para las diferentes aplicaciones.

**3.6 PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA CREMA ELABORADA A BASE DE EXTRACTOS DE PERA, JACARANDA Y MUCÍLAGO DE SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA EN CONEJOS EXPERIMENTALES.**

**CUADRO N. 8 PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD HIDRATANTE DE LA CREMA**

En el Cuadro N. 8 podemos observar que las dosis del control resultan ser mucho menores en cuanto a absorción.

<b>Absorción</b>				
HSD de Tukey				
Formulación	N° de pruebas	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
F1Pera	4	1.99		
		75		

F3mezcla	4		2.1725	
F2jacaranda	4			2.2725
F4Control	4			2.3125
Sig.		1.00 0	1.000	.453
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				

FUENTE: VERONICA CEVALLOS

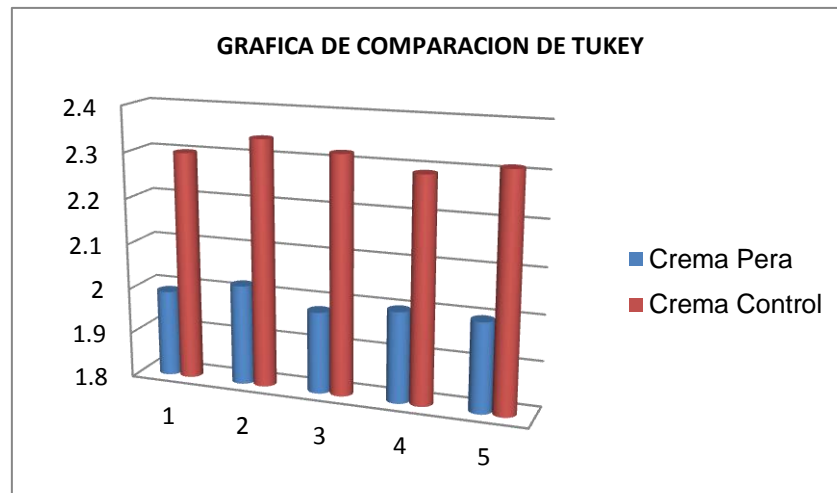
El tiempo es mayor y su penetrabilidad inferior a la crema realizada a base de extracto de pera en mayor concentración y mucílago natural de semillas de salvia hispánica.

Demostrándose que con la dosificación de la crema con extracto de pera es mucho más eficaz frente a la absorción en la piel de los conejos ya que el tiempo es menor y su penetrabilidad es mucho mayor.

Mientras que en la aplicación de la crema control los tiempos son mayores, con la crema elaborada a base de extracto de pera en mayor concentración la actividad hidratante en los conejos se observa claramente ya que la penetrabilidad de la crema es superior al control.

GRÁFICO N. 1 COMPARACION DE TUKEY EN EL ANALISIS DE DATOS DE LA ACCION HIDRATANTE DE LA CREMA A BASE DE JACARANDA, PERA Y MUCÍLAGO DE SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA.

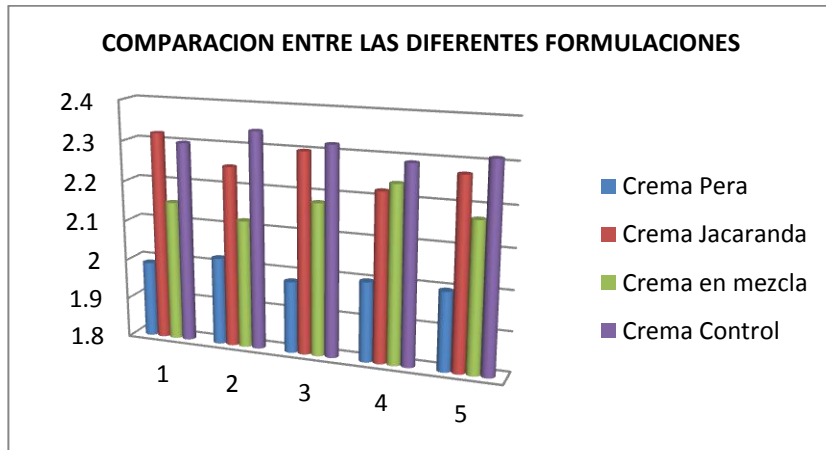
En el Grafico N. 1 se puede observar la gran diferencia existente entre las formulaciones realizadas con el extracto de pera y con la formulación control, observándose que la formulación con extracto de pera posee una menor proporción ya que la absorción se produce en menor tiempo con respecto a la formulación control.



FUENTE: VERONICA CEVALLOS

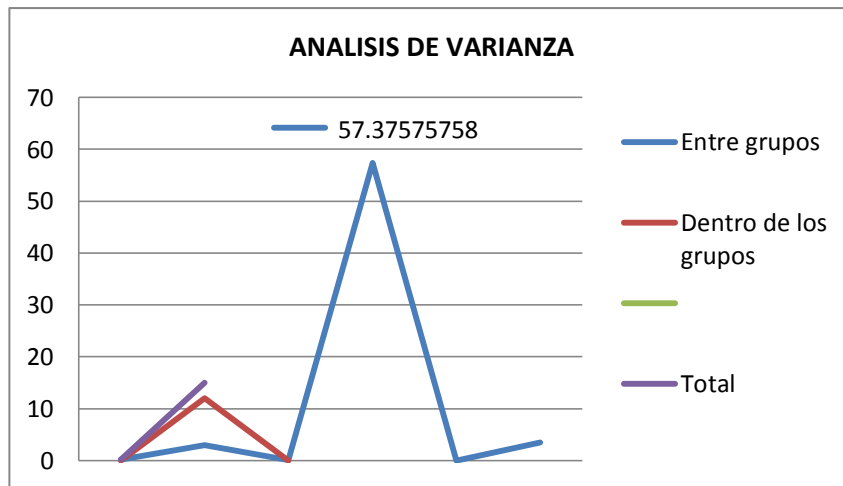
GRÁFICO N. 2 COMPARACION EN EL ANALISIS DE DATOS DE LA ACCION HIDRATANTE DE LA CREMA A BASE DE JACARANDA, PERA Y MUCÍLAGO DE SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES

En el gráfico 2 se realiza una comparación entre las diferentes formulaciones existiendo una variación significativa sobre todo con la formulación realizada con el extracto de pera.



FUENTE: VERONICA CEVALLOS

GRÁFICO N. 3 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS ESTADÍSTICOS ENTRE LOS TIEMPOS DE ABSORCIÓN DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES.



FUENTE: VERONICA CEVALLOS

En el gráfico 3 se realiza un análisis de varianza en el cual se puede observar la dispersión existente en los datos sobre todo entre los cuales proceden de la formulación

realizada con el extracto de pera, el cual está muy por fuera de las demás formulaciones existiendo un valor de 57,37.

## CAPÍTULO IV.

### 4. CONCLUSIONES.

- La crema con la mezcla de los extractos de pera, jacaranda y mucílago de semillas de salvia hispánica tuvo efecto hidratante al eliminar la sequedad de la piel y se absorbe con rapidez en el área aplicada, se acepta la hipótesis.
- Los extractos poseen un olor agradable, herbal y frutal respectivamente, el mucilago tiene un aspecto cristalino, inoloro y agradable, la crema terminada posee un olor agradable característico además de buena extensibilidad, homogeneidad y propiedades comprobadas.
- El extracto de pera tiene un pH de 6.12, densidad de 1,04 g/mL, los flavonoides son los compuestos representativos. El extracto de jacaranda tuvo pH de 6.02, densidad 1.21 g/mL, contiene taninos.

- Las cremas se prepararon con 0,2% de mucílago, con 15% de extractos de pera, jacaranda y mezcla de pera – jacaranda.
- Se evaluó como actúa la crema al aplicar en la piel rasurada de los conejos a las 1, 2, 4, 24 y 48 horas de experimentación como control positivo Lubriderm; probándose que la piel toma aspecto más terso, vuelve rosada con rapidez hay efecto hidratante con el control y crema de pera.
- La extensibilidad, pH, homogenidad son similares, varia el olor; la mejor preparación se determinó por la absorbilidad y tiempo aplicando en piel rasurada de conejos el lotes de 4 individuos que va en el rango 1.98 a 2.02
- Las pruebas microbiológicas demuestran que es un producto apto para el consumo ya que los rangos se encuentran dentro de las especificaciones para cosméticos, siendo todos inferiores a 1.
- El análisis estadístico de Varianza de la actividad hidratante de la crema de pera tiene un valor de 3.49



- La prueba de Tukey al 5% da un valor de 1.99 en la absorbilidad demuestra que es un valor menor, determinando que la crema de pera actúa mejor que el control positivo Lubriderm
- Finalmente la prueba de Tukey determinó que la crema de pera actúa con mayor eficacia de absorción corresponde a 1.99 minutos y para Lubriderm un valor de 2.272 minutos.
- El análisis de precios en la elaboración de las cremas esta dado por la elaboración del extracto; siendo más cara la de pera los 15g de crema pera tienen un valor de \$1.50.

## CAPÍTULO V.

### 5. RECOMENDACIONES.

1. Realizar el análisis de estabilidad en condiciones normales a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $70 \pm 5\%$  de HR de las propiedades físicas , microbiológicas y farmacológicas de la crema de pera para determinar su posible industrialización.
2. Enfocar la estabilidad a las otras cremas y otras actividades como la antiinflamatoria tópica.
3. Al elaborar la crema se debe seguir los pasos adecuadamente ya que si no se procede de manera el producto no presentara un aspecto homogéneo y las condiciones de este no darán para que pueda almacenarse por el tiempo correcto.
4. Se deberá elaborar el producto de la manera más aséptica posible para de este modo evitar contaminación del producto terminado. Al ser comprobado el efecto hidratante de la crema con extractos puros y mucílago natural se sugiere incorporar una mayor cantidad de los extractos para de esta manera potenciar su actividad ya sea el caso de analgésica con los flavonoides, en tal caso se debe

adicionar mayor cantidad de extracto de pera, si se desea un producto con mayor efecto antiarrugas a más de hidratante se adicionara mayor cantidad de extracto de jacaranda.

## CAPÍTULO VI.

### 6. RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo elaborar y controlar la calidad de una crema hidratante a base de mucílagos y aromas naturales, la cual elaboramos en base a extracto de Jacaranda, extracto de pera y mucílago de las semillas de salvia hispánica, el método usado fue el método experimental, el que fue el más apropiado para encontrar la formulación adecuada para comprobar su efecto, los materiales fueron conejos experimentales para comprobar la actividad hidratante, materias primas cosméticas y extractos obtenidos mediante maceración.

Los extractos etanólicos se preparan por maceración y el mucílago mediante hidratación de las semillas. La crema se obtiene por mezcla de Ácido esteárico, agua destilada, 0,2% de extractos de pera y jacaranda.

Se seleccionó conejos experimentales raza californiana misma camada para determinar la actividad hidratante, esto se consiguió en aplicaciones cada 1, 2, 4, 24, 48 horas y se observó las reacciones que el producto causa en los animales, además se procedió con el producto control, en este caso se utilizó Lubriderm por ser un

producto conocido y confirmado, observándose la disminución progresiva de resequedad en la piel de los conejos.

Se determino que después de la hora su absorción es completa, la mejor formulación fue con extracto de pera teniendo un valor promedio de absorción de 1.99 resultando ser menor a las otras formulaciones incluyendo la formulación control.

Se recomienda realizar un posterior estudio en base a la mejor formulación para hacerla apta en personas y así comprobar su aceptabilidad y efectos en piel reseca.

## SUMMARY

The present research has like objective control the quality of a moisturizing cream to basis on mucilages and natural aromas, which is elaborated in basis of jacaranda extract, pear extract and mucilage of seed of *Salvia Hispanica*, the used method was the experimental, the most appropriated for finding the right formulation to check its effect, the materials were rabbits as experimental animals to check the moisturizing activity, cosmetic raw materials and extracts obtained through mashing process. The ethanolic extracts are prepared by mashing and the mucilage through hydratation seeds. The cream is obtained by the mixture of esthereatic acid, distilled water, 0,2% of pear and jacaranda extracts.

Were selected rabbits as experimental animals of Californian breed samen litter to determine the moisturizing activity, this obtained in applications each 1,2,4,24,48 hours and was observed the reacts that the product cause in the animals, besides it was originated with the control of product, in this case was used Lubriderm because is a known and confirmed product, observing the progressive reduction of dryness in the skin of de rabbits. It was determined that one hour later its absorption is complete, the best formulation was with the pear extract having an average value of absorption of 1.99 resulting be less to the other formulations including the control formulation.

It is recommended made a later studio in basis to the best formulation to do it suitable in people and to check its acceptance and effects in dry skin.

**CAPÍTULO VII.****7. BIBLIOGRAFIA**

1. **ACOSTA, M.,** Vademécum de plantas medicinales del Ecuador., Quito – Ecuador., FESO – Abya- Yala., 1992., Pp. 45-50
2. **ALBORNOZ, A. R.,** Fundamentos del tamizaje fitoquímico., Caracas- Venezuela., 1980., Pp. 102
3. **ALCALDE, T.,** Materias Primas y Activos Cosméticos., Barcelona- España., Unidad de tecnología farmacéutica. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona., 2004., Pp. 21-32
4. **ALIAGA, A.,** Revista Informativa., Cremas hidratantes., Bogotá – Colombia., ABC Salud., 2012., Pp. 4
5. **AMELIA R.,** Belleza y cosmética natural., Barcelona- España., Ambar., 2004., Pp. 123
6. **ARBRE, F.,** Descripción botánica de la jacaranda., Madrid- España., Quelep., 2012., Pp. 34-41
7. **ARRIAGA, P.,** Saludable naturaleza. Mucílagos Cosméticos., 3ª Ed. Bariloche- Argentina., Mulcan., 2011., Pp. 87-91
8. **AVILÁN, R.,** Medicamentos “naturales” o convencionales., Caracas- Venezuela., 2004., Pp. 112
9. **BARRAGAN, R.,** Principios de Diseño Experimental., Buenos Aires- Argentina., Lange., 1997., Pp. 10,21

10. **BARRENO, S.**, Sustancias fitoquímicas de frutas y hortalizas, su posible papel beneficioso para la salud., 2ª Ed., Lima- Perú., Interempresas., 2006., Pp. 8-14
11. **BENITEZ, K.**, Pruebas con animales., 4ª Ed., Cien Fuegos- Cuba., Natural., 2009., Pp. 23- 45
12. **BERKOWITZ, BA, KATZUNG BG.**, Basic & Clinical Evaluation of New Drugs. Ed. Basic & Clinical Pharmacology., 8a ed., New York – Estados Unidos., Lange., 1999., Pp: 64-74.
13. **BRUNETON, J.**, Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales., 2ª ed., Barcelona – España., Alambra., 2000., Pp. 1094
14. **CAMACHO, J.**, Etnobotánica., Santiago- Chile., Cols., 1983., Pp. 28
15. **CARMILLOT, A.**, Composición de las peras., Quito- Ecuador., 2010., Pp. 1-5.
16. **CLIMOC, A.**, Elaboración de fórmulas magistrales, preparados oficinales, dietéticos y cosméticos., Cep., Barcelona – España., 2011., Pp: 112- 128
17. **CODEMPE.**, Manual de la medicina de los pueblos Kichwas del Ecuador., Quito- Ecuador., Ecuarunari., 1999., Pp. 79
18. **CRUZ, P.**, Flavonoides., Riobamba- Ecuador., ESPOCH., 2009., Pp. 56-63.
19. **DOMINGUEZ, X.**, Métodos de Investigación Fitoquímica., Guadalajara- México., Limusa., 1973., Pp. 73
20. **DURÁN, F.**, Biblia de recetas Industriales., Guadalajara- México D.F., Grupo Latino., 2011., Pp. 1085



21. **GONZALES, G.**, Métodos Estadísticos y Principios de Diseño Experimental., 2<sup>a</sup> Edición., Quito-Ecuador., Universidad Central del Ecuador., 1985., Pp. 181, 198.
22. **GROSS, E.**, Introducción al estudio de los Productos Naturales., 3<sup>a</sup> Edición., Barcelona – España., Becerra., 1985., Pp 78 – 90
23. **INTI VILLA, R.**, Composición fitoquímica de las peras., Buenos Aires-Argentina., COFECYT., 2006., 15- 17
24. **JAMBI, K.**, La Magia de las Plantas., Chimborazo –Ecuador., ESPOCH., 2000., Pp. 84, 88.
25. **JÁTIVA, C.**, Texto Básico de Farmacognosia de los Vegetales a las Medicinas., Riobamba- Ecuador., ESPOCH., 2014., Pp. 97.
26. **KABBABE, S.**, Revista Informativa., Crema hidratante., Caracas- Venezuela., Cosmética personalizada., 2013., Pp. 1
27. **LOCK DE UGAZ, O.**, Fitoquímico y metabolitos secundarios., Pontifica Universidad Católica de Perú., Lima – Perú., 1999., Pp. 41-65
28. **LOCK, O.**, Métodos de Estudio de productos Naturales., Lima- Perú., Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú., 1994., Pp. 85-92
29. **LLORENS, C.**, Revista de salud., Crema corporal., Bogotá – Colombia., Belleza Innata., 2011., Pp. 3-8
30. **MARCOS, N.**, Cosmética Natural. Recetas Naturales para cuidarte día a día. Bogotá- Colombia., Ed. Libsa., 2004., Pp. 98-106

31. **MARTÍNEZ, J.**, Composición fitoquímica de las peras., Madrid- España., Universidad de León España., 2002., Pp. 12-35
32. **MARTÍNEZ, Y.**, Composición fitoquímica de la jacaranda., Habana- Cuba., Arzuaga., 2011., Pp. 1-6
33. **MIÑANA, M., GONCALVES, E.** Aplicaciones Cosméticas y Farmacéuticas de los surfactantes. 3ª Ed. Caracas- Venezuela., 2011., Pp. 3-10
34. **MOREU, C.**, Descripción de la pera., 4ª Ed. Lima- Perú., Puleva., 2003., Pp. 22-45
35. **MOURA, E.**, Cremas Corporales, Cali- Colombia., Esculen., 2013., Pp. 8
36. **NARANJO, P.**, Plantas del Ecuador. 2ª Ed., Quito- Ecuador., Universitaria., 2000., Pp. 42, 256, 257
37. **PAMPLONA, J.**, Enciclopedia de Plantas Medicinales 2ª ed. Buenos Aires – Argentina., Editorial Safeliz., 2006., Pp. 365 – 368.
38. **PÉREZ, B.**, Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejo, Lima - Perú., Instituto Nacional de Perú., 2010., Pp. 2- 50
39. **PESSOA, J.**, Compuestos de la jacaranda., Roma- Italia., Capril., 2006., Pp. 85-90.
40. **POBLISHING, M.**, Diccionario de Cosmetología., Montevideo- Uruguay., Ed. Paraninfo., 2012., Pp.312
41. **SOBIÑO, F.**, Principales compuestos presentes en la jacaranda., 3ª Ed., Sao Paulo- Brasil., Universidad de Brasil., 2012., Pp. 12- 34

42. **TERRÉS, C.**, Diseño estadístico de ensayos clínicos., 5ª Ed., Buenos Aires-Argentina., Medilibros., 1996., Pp: 107, 303-309.
43. **VÁSQUEZ, B.**, Actividad de los compuestos de la jacaranda, descubriendo las propiedades del ácido ursólico., Bogotá- Colombia., 2011., Pp. 2- 14
44. **VEGA, M.**, Hecho en casa., Cuenca- Ecuador., Círculo de lectores., 2006., Pp. 487- 489
45. **VORVICK, L.**, Piel y sus afecciones., Washington- Estados Unidos., Universidad de Washington., 2012., Pp. 23
46. **WHITE, A.**, Hierbas del Ecuador. Plantas Medicinales., Quito- Ecuador., Imprenta Mariscal., 1976., Pp. 146
47. **ZAMBRANO, P.**, Descripción botánica de la pera., Mexico- Mexico D.F., Kaluz., 2013., Pp. 23- 45

## **BIBLIOGRAFÍA INTERNET:**

### **1. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE LA PERA**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Pyrus>

2013- 04 – 10

### **2. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE LA SALVIA HISPÁNICA**

[http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia\\_hispanica](http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia_hispanica)

2103- 03- 29

### **3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA JACARANDA**

<http://fichas.infojardin.com/arboles/jacaranda-mimosaeifolia-palisandro-tarco.htm>

2013- 05- 08

### **4. COMPOSICIÓN DE LAS PERAS**

[http://pomaceas.utralca.cl/html/web-english/seminarios/archivos/aroma\\_enpomaceas.pdf](http://pomaceas.utralca.cl/html/web-english/seminarios/archivos/aroma_enpomaceas.pdf)

2013- 05- 08

## **5. CREMAS CORPORALES**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Emulsi%C3%B3n>

2013- 06-14

## **6. CREMAS HIDRATANTES**

[www.mejoratuimagen.net/cremas-hidratantes-y-humectantes-saber-elegir](http://www.mejoratuimagen.net/cremas-hidratantes-y-humectantes-saber-elegir)

2013- 03- 17

## **7. JACARANDA**

<http://www.euroresidentes.com/jardineria/arboles/jacaranda.htm>

2013- 05- 23

## **8. JACARANDA**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Jacaranda>

2013- 04- 12

## **9. MACERACIÓN**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Maceraci%C3%B3n>

2013- 06- 24

## **10. MACERACIÓN**

<http://www.botanical-online.com/maceraciones.htm>

2013- 06- 17

## **11. PIEL**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Piel>

2013- 05- 07

## **12. SALVIA HISPÁNICA**

[http://www.saludactual.cl/belleza/chia\\_salvia\\_hispanica.php](http://www.saludactual.cl/belleza/chia_salvia_hispanica.php)

2013- 04-29

## **13. SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA**

[http://www.botanical-online.com/semillas\\_de\\_chiadescripcion\\_botanica](http://www.botanical-online.com/semillas_de_chiadescripcion_botanica)

2013- 03-21

## **14. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA JACARANDA**

<http://espanol.answers.yahoo.com/question/index?qid=20070515111410AABBdqJ>

2013- 03- 08

**15. TIPOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

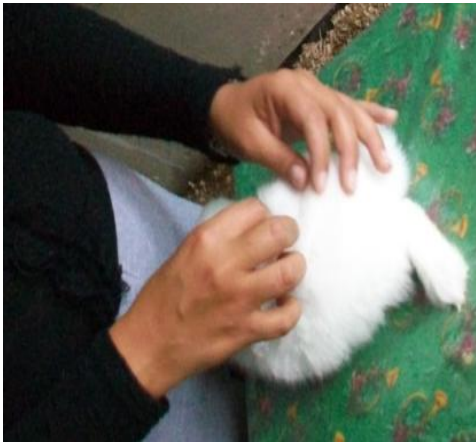
[http://www.nomasviviseccion.cl/prueba\\_cosmeticos.html](http://www.nomasviviseccion.cl/prueba_cosmeticos.html)

2013- 03- 04

## CAPÍTULO VIII.

### 8. ANEXOS.

#### ANEXO 1. CONEJOS EN AMBIENTACION





**ANEXO 2. ANIMALES RASURADOS**



**ANEXO 3. PARTE EXPERIMENTAL**



**ANEXO 4. RESULTADOS DE LA EXPERIMENTACION**

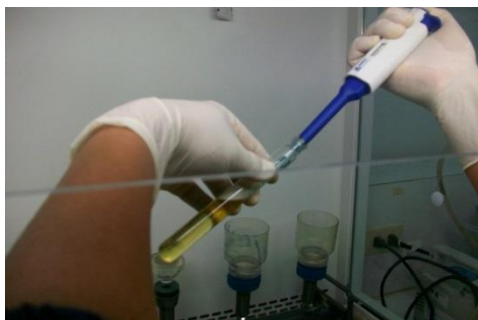
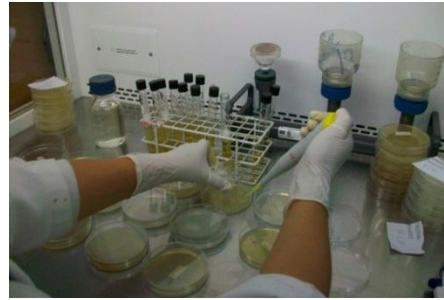
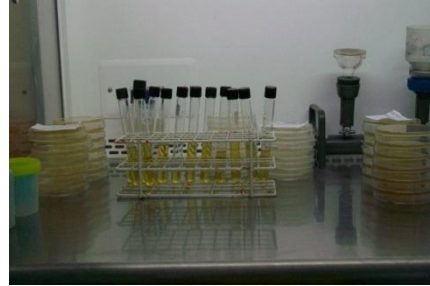


**ANEXO 5. AMBIENTE DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

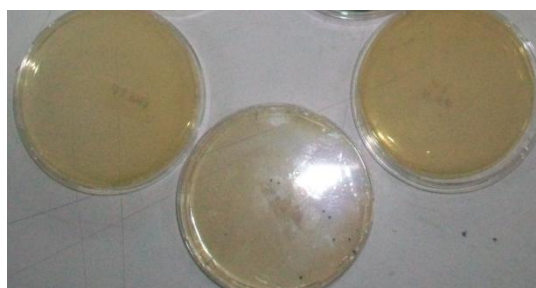
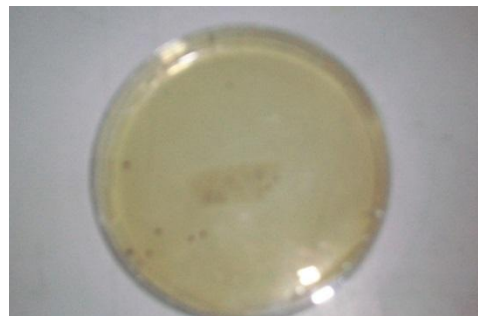
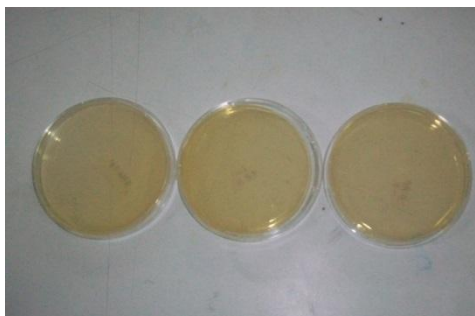




**ANEXO 6. ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL PRODUCTO TERMINADO**



**ANEXO 7. RESULTADO MICROBIOLÓGICO**



**ANEXO N. 8 Valores de la amplitud total estudentizada,  $q$  0.05, para uso de la prueba de Tukey (valor de interpolación).**

Valores de la amplitud total estudentizada,  $q$  0.05, para uso en la prueba de Tukey

g <sub>lee</sub>	Número de tratamientos																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	17.97	26.98	32.82	37.08	40.41	43.12	45.40	47.36	49.07	50.59	51.96	53.20	54.33	55.36	56.32	57.22	58.04	58.83	59.56
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.74	12.44	13.03	13.54	13.99	14.39	14.75	18.08	15.38	15.65	15.91	16.14	16.37	16.57	16.77
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.15	10.35	10.53	10.69	10.84	10.98	11.11	11.24
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.66	8.79	8.91	9.03	9.13	9.23
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72	7.83	7.93	8.03	8.12	8.21
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.03	7.14	7.24	7.34	7.34	7.51	7.59
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	5.82	6.16	6.30	6.43	6.55	6.66	6.76	6.85	6.94	7.02	7.10	7.17
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	6.00	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48	6.57	6.65	6.73	6.80	6.87
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.77	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28	6.36	6.44	6.51	6.58	6.64
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.59	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.11	6.19	6.27	6.34	6.40	6.47
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.46	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98	6.06	6.13	6.20	6.27	6.33
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.35	5.39	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88	5.95	6.02	6.09	6.15	6.21
13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.27	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79	5.86	5.93	5.99	6.05	6.11
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.19	5.25	5.36	5.46	5.55	5.64	5.71	5.79	5.85	5.91	5.97	6.03
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65	5.72	5.78	5.85	5.90	5.96
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59	5.66	5.73	5.79	5.84	5.90
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.54	5.61	5.67	5.73	5.79	5.84
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50	5.57	5.63	5.69	5.74	5.79
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.31	5.39	5.46	5.53	5.59	5.65	5.70	5.75
20	2.95	3.59	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43	5.49	5.55	5.61	5.66	5.71
30	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32	5.38	5.44	5.49	5.55	5.59
40	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21	5.27	5.33	5.38	5.43	5.47
50	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73	4.82	4.90	4.98	5.04	5.11	5.16	5.22	5.27	5.31	5.36
60	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65	4.73	4.81	4.88	4.94	5.00	5.06	5.11	5.15	5.20	5.24
120	2.80	3.36	3.68	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56	4.64	4.71	4.78	4.84	4.90	4.95	5.00	5.04	5.09	5.13
	2.77	3.31	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47	4.55	4.62	4.68	4.74	4.80	4.85	4.89	4.93	4.97	5.01