

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

UNIDAD DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

COSMÉTICAS

Tesis previa a la obtención del Título de:

MAGISTER EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

COSMÉTICAS

**TEMA: “Desarrollo de formulaciones fito-cosméticas
antioxidantes empleando como sustancia activa el extracto
seco de *Cinchona pubescens* Vahl, RUBIACEAE (Cascarilla)”**

Autores:

ANGELKA MARÍA BARUKČIĆ REVELO

MARIA JOSÉ SOLA MONTERO

Director:

QCO. PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA PhD.

QUITO, ABRIL 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL
TRABAJO DE GRADO**

Nosotros, Angelka María Barukcic Revelo y María José Sola Montero, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana, la publicación total o parcial de éste trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro

Además declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras

Quito, Abril 2015

(f)_____

Angelka María Barukcic Revelo

(f)_____

María José Sola Montero

DEDICATORIA

A Leandro Paúl

A Sara y Paula

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Politécnica Salesiana por permitirnos ser parte de ella y abrirnos las puertas de su seno científico para culminar con satisfacción la maestría.

Al Quim. Paco Noriega MsC PHD director de tesis por su acertada guía y apoyo incondicional durante todo el proceso investigativo.

A la Dra. Maria Elena Maldonado Directora de la Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas.

Al centro de Investigación de Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) y a todo su personal por su apoyo durante toda la investigación.

A Paula y Sara por ser la inspiración más grande de amor, por su paciencia y solidaridad durante esta etapa.

A Leandro por su incondicional apoyo y afecto en el transcurso y culminación de este proceso.

ÍNDICE GENERAL

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN	
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	6
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	8
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	8
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.4 HIPOTESIS	9
CAPITULO II.- MARCO TEÓRICO	
2.1 CASCARILLA (<i>Cinchona Pubescens</i> Vah)	10
2.2 TAXONOMIA	13

2.3	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	14
2.4	DATOS ECOLOGICOS	16
2.5	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	17
2.6	USOS DE LA CASCARILLA	23
2.6.1	USOS MEDICINALES	23
2.6.1.1	TRADICIONALES	23
2.6.1.2	ETNOMÉDICOS	24
2.6.2	OTROS USOS	26
2.6.2.1	COSMÉTICOS	26
2.6.2.2	SOCIALES	26
2.7	INVESTIGACIONES DE LA CASCARILLA	27
2.8	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE LA PLANTA	36
2.8.1	FITOQUIMICA	36
2.8.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA	36
2.8.3	COMPOSICIÓN FARMACOLÓGICA	40
2.9	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SU RELACIÓN CON LA COSMÉTICA	42
2.9.1	ANTIOXIDANTES	42
2.9.1.1	MECANISMOS DE ACCIÓN	43
2.9.2	EFFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PIEL	45

2.9.3	ANTIOXIDANTES MÁS IMPORTANTES PARA LA PIEL	47
2.9.3.1	VITAMINAS	47
2.9.3.2	FLAVONOIDES	48
2.9.4	PRODUCTOS COSMÉTICOS ANTIOXIDANTES	53
2.9.4.1	ANTIARRUGAS	54
2.9.4.2	PROTECTORES SOLARES	56
2.9.4.3	PRODUCTOS PARA DESPUÉS DEL SOL	57
2.10	ESTUDIO FITOQUIMICO DE LOS POLIFENOLES	58
2.10.1	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES	58
2.10.2	COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	59
2.10.3	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	59
2.11	CROMATOGRAFÍA	60
2.11.1	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	61
2.12	METODOS DE EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH,ABTS Y PCL)	63
2.12.1	METODO DEL BARRIDO DE RADICALES LIBRES O MÉTODO DPPH (1, HIDRATO DE 1-DIFENIL-2- PICRILHIDRAZIL)	64
2.12.2	MÉTODO ABTS (2,2- AZINOBIS-4-ETILBENZOTIAZOLINE- 6-SULFONATO)	66
2.12.3	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FORMAS COSMETICAS	67

2.12.3.1	MÉTODO DE LA FOTOQUIMIOLUMINISCENCIA PCL (PhotoChemiLuminescence)	67
2.12.4	QUIMIOLUMINISCENCIA	68
2.12.5	ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES Y LIPOSOLUBLES EN UN SISTEMA CON EL MÉTODO PCL	70
2.12.5.1	MÉTODO DE ANÁLISIS	70
2.13	FORMULACIONES FITOCOSMÉTICAS	72
2.13.1	FITOCOSMÉTICOS	73
2.13.2	FITOINGREDIENTE	74
2.13.3	EFICACIA DE FITOINGREDIENTES	74
2.13.4	GRUPOS FITOQUIMICOS MAYORITARIOS	74
2.13.5	COSMETICO DEFINICIÓN	75
2.13.6	FORMAS COSMÉTICAS	76
2.13.6.1	EMULSIONES	76
2.13.6.2	GELES	76
2.14	ANALISIS DE ESTABILIDAD PARA FORMULACIONES COSMÉTICAS	77
2.14.1	FACTORES QUE INFLUENCIAN LA ESTABILIDAD	77
2.14.1.1	FACTORES EXTRÍNSECOS	78
2.14.1.2	FACTORES INTRÍNSECOS	79
2.14.2	ASPECTOS CONSIDERADOS EN LA ESTABILIDAD	81
2.14.3	PARÁMETROS DE EVALUACIÓN EN LA ESTABILIDAD	82

2.14.4	TIPOS DE ESTABILIDAD	83
2.14.4.1	ESTABILIDAD PRELIMINAR	83
2.14.4.2	ESTABILIDAD ACELERADA	86

CAPITULO III.- MARCO METODOLOGICO

3.1	MATERIAL VEGETAL	87
3.1.1	RECOLECCION MATERIAL VEGETAL	90
3.1.1.1	UBICACIÓN	90
3.1.1.2	RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	92
3.1.1.3	IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	92
3.2	PROCESAMIENTO DE LA DROGA	92
3.2.1.	SECADO	92
3.2.2	MOLIDO	93
3.2.3	ELABORACIÓN DEL EXTRACTO SECO DE Cinchona Pubescens Vahl y Camellia sinensis	94
3.3	DETERMINACIONES QUÍMICAS	98
3.3.1	CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU)	98
3.3.1.1	PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN CIOCALTEU	99
3.3.1.2	PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	94
3.3.2	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	101
3.3.2.1	PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	102

3.3.3	SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES EN CROMATOGRÍA EN CAPA FINA (TLC)	103
3.3.4	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO SECO DE <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	105
3.3.4.1	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO SECO DE <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl POR MÉTODO DE DPPH	105
3.3.4.2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO SECO DE <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl POR MÉTODO DE ABTS	108
3.3.4.3	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl POR EL MÉTODO DE DPPH EN CAPA FINA (TLC)	110
3.4	DESARROLLO DE FORMULACIONES COSMÉTICAS CON EXTRACTO DE <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	112
3.4.1	FORMULACION TIPO CREMA (EMULSIÓN O/A)	113
3.4.2	FORMULACION TIPO GEL (ACUOSO)	116
3.5	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FORMULACIONES	119
3.5.1	METODO DE PCL	119
3.5.2	MÉTODO DE DDPH	120
3.6	ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES	122

3.6.1	ANÁLISIS DE ESTABILIDAD ACELERADA	123
3.7	ESTADISTICA	125
3.7.1	MÉTODO PCL EN CREMA Y GEL FORMULADOS CON <i>C. pubescens</i> y <i>Camellia Sinensis</i>	125
CAPÍTULO IV. RESULTADOS		
4.1.	CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU)	127
4.2.	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDEOS TOTALES	128
4.3.	IDENTIFICACIÓN QUIMICA DEL TLC (CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA)	130
4.4.	ACTIVIDAD ANTOXIDANTE DEL EXTRACTO	131
4.4.1	MÉTODO DPPH	131
4.4.2	MÉTODO ABTS	136
4.4.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN CAPA FINA	140
4.5	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FORMULACIONES CREMA Y GEL	134
4.5.1	MÉTODO DPPH GEL	142
4.5.1.1	MÉTODO DPPH GEL BASE	143
4.5.1.2	MÉTODO DPPH GEL FORMULADO CON <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	143
4.5.1.3	MÉTODO DPPH GEL FORMULADO CON <i>Camellia Sinensis</i> TÉ VERDE	146
4.5.2	COMPARACION ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE GEL	

	FORMULADO CON TÉ VERDE Y GEL FORMULADO CON	
	<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	147
4.5.3	MÉTODO PCL GEL Y CREMA	148
4.5.3.1	MÉTODO PCL GEL	148
4.5.3.2	MÉTODO PCL CREMA	150
4.6	ESTABILIDAD	150
4.6.1	ESTABILIDAD DEL GEL	153
4.6.2	ESTABILIDAD DE LA CREMA	155
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	157
4.7.1	MÉTODO PCL EN CREMA FORMULADA CON <i>Cinchona</i>	157
	<i>Pubescens</i> Vahl y <i>Camellia Sinensis</i>	
 CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		
5.1	CONCLUSIONES	162
5.2	RECOMENDACIONES	166
	BIBLIOGRAFÍA	169
	ANEXOS	190

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Resultados del tamizaje fotoquímico del extracto de Quina roja ((<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl)).....	39
Tabla 2.	Límites permisibles de microorganismos en cosméticos.....	83
Tabla 3.	Método de Folin Ciocalteu.....	101
Tabla 4.	Método de Flavonoides Totales.....	103
Tabla 5.	Método de DPPH, curva de calibración.....	108
Tabla 6.	Formulación de emulsión al 0.5%, de extracto seco de <i>Camellia Sinensis</i> (té verde).....	116
Tabla 7.	Formulación de emulsión al 0.5%, 0.75% y 1% de extracto seco de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	116
Tabla 8.	Formulación del Gel al 0.5%, de extracto seco de <i>Camellia Sinensis</i> (té verde).....	118
Tabla 9.	Formulación del Gel al 0.25%, 0.5% y 0,75% de extracto seco de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	119
Tabla 10.	Parámetros fisicoquímicos de Estabilidad Preliminar.....	123
Tabla 11.	Conteo Microbiológico Preliminar.....	124
Tabla 12.	Parámetros fisicoquímicos de Estabilidad Acelerada.....	124
Tabla 13.	Conteo Microbiológico Acelerado.....	124
Tabla 14.	Media y Límites de Confianza.....	125
Tabla 15.	Prueba de Kruskal Wallis	126
Tabla 16.	Fenoles totales en los extractos secos de té verde y Cascarilla.....	127

Tabla 17.	Flavonoides totales en los extractos secos de té verde y Cascarilla.....	129
Tabla 18.	Actividad antioxidante (DPPH) del ácido ascórbico.....	132
Tabla 19	Actividad antioxidante (DPPH) del extracto <i>Camellia Sinensis</i>	132
Tabla 20.	Actividad antioxidante (DPPH) del extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl..	134
Tabla 21.	Actividad antioxidante (ABTS) del extracto <i>Camellia Sinensis</i>	136
Tabla 22.	Actividad antioxidante (ABTS) del extracto <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl.....	137
Tabla 23.	Comparación del IC ₅₀ del ácido ascórbico y los extractos de <i>Camellia Sinensis</i> y <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	139
Tabla 24.	Actividad antioxidante (DPPH) del extracto de <i>Gel base</i>	142
Tabla 25.	Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,25%).....	144
Tabla 26.	Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,50%).....	145
Tabla 27.	Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,75%).....	139
Tabla 28.	Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con <i>Camellia Sinensis</i>	146
Tabla 29.	Comparación de la actividad antioxidante (DPPH) del Gel base y el formulado con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,5%) y <i>Camellia Sinensis</i> (0,5%).....	148
Tabla 30.	Actividad antioxidante (PCL) del Gel formulado con <i>Camellia Sinensis</i> y <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,5%).....	149

Tabla 31.	Actividad antioxidante (PCL) de la crema formulado con <i>Camellia Sinensis</i> y <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0.5%).....	151
Tabla 32.	Resultados de la estabilidad preliminar del gel: Fisicoquímicos y organolépticos.....	153
Tabla 33	Resultados de la estabilidad acelerada del gel: Fisicoquímicos y organolépticos.....	153
Tabla 34.	Conteo Microbiológico preliminar.....	154
Tabla 35.	Conteo Microbiológico acelerado.....	154
Tabla 36.	Resultados de la estabilidad preliminar de la emulsión: Fisicoquímicos y organolépticos.....	155
Tabla 37.	Resultados de la estabilidad acelerada de la emulsión: Fisicoquímicos y organolépticos.....	155
Tabla 38.	Conteo Microbiológico.....	154
Tabla 39.	Conteo Microbiológico Acelerado	156
Tabla 40.	Media y Límites de Confianza Emulsión.....	158
Tabla 41.	Análisis de Varianza de Kruskal Wallis.....	158
Tabla 42.	Media y Límites de Confianza Gel.....	160
Tabla 43.	Análisis de Varianza de Kruskal Wallis para el gel.....	160

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Comparación de los fenoles totales entre los extractos de de <i>Camellia Sinensis</i>	128
Gráfico 2.	Comparación de los flavonoides totales entre los extractos de C.....	129
Gráfico 3.	Placa Cromatográfica del extracto seco de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl.	130
Gráfico 4.	Porcentaje de inhibición anti-radical DPPH del extracto seco de <i>Camellia Sinensis</i>	133
Gráfico 5.	Porcentaje de inhibición anti-radical DPPH del extracto seco de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	134
Gráfico 6.	Porcentaje de inhibición de ABTS del extracto seco de <i>Camellia Sinensis</i>	137
Gráfico 7.	Porcentaje de inhibición de ABTS del extracto seco de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	138
Gráfico 8.	Porcentaje de inhibición de ABTS del ácido ascórbico y los extractos secos de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl y <i>Camellia Sinensis</i>	139
Gráfico 9.	Actividad antioxidante en capa fina (DPPH) del extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	140
Gráfico 10.	Porcentaje de inhibición de DPPH del Gel base.....	142
Gráfico 11.	Porcentaje de inhibición de DPPH de <i>Camellia Sinensis</i> (0,5%).....	146
Gráfico 12.	Comparación de la capacidad antioxidante del gel formulado con <i>Camellia Sinensis</i> y el gel formulado con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0.25, 0,5 y 0,75%).....	151

Gráfico 13.	Comparación de la capacidad antioxidante de la emulsión formulado con <i>Camellia Sinensis</i> y la crema formulado con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0.25, 0,5 y 0,75%).....	151
Gráfico 14.	Variación de la actividad antioxidante de la emulsiones evaluadas....	158
Gráfico 15.	Variación de la actividad antioxidante de la emulsiones evaluadas....	160

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cascarilla <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	10
Figura 2.	Antimaláricos en cinchona.....	19
Figura 3.	Antimaláricos en Cinchona.....	20
Figura 4.	Principales alcaloides presentes en la corteza de la <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl.....	37
Figura 5	Principales alcaloides presentes en la corteza de la <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl.....	38
Figura 6.	Principales flavonoides presentes en la Quina roja (<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl).....	38
Figura 7.	Cadena oxidativa.....	46
Figura 8.	Esqueleto estructural de los falvonoides.....	49
Figura 9.	Estructura de los diferentes flavonoides.....	50
Figura 10.	Características estructurales de los principales flavonoides.....	50
Figura 11.	Cromatografía de Capa Fina.....	61
Figura 12.	Cromatografía de Capa Fina.....	62
Figura 13.	Cromatografía de Capa Fina.....	62
Figura 14.	Reducción de reacción de DPPH.....	89
Figura 15.	<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl en la Parroquia de Ulloa Provincia de	

	Pichincha.....	90
Figura 16.	Sitio de Recolección.....	91
Figura 18.	Estación de bombeo de Petrocomercial “El Corazón”	91
Figura 18.	Panoramica Sitio de Recolección.....	91
Figura 19.	Recolección de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl.....	92
Figura 20.	Planta recolectada de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	93
Figura 21.	Obtención del extracto seco de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	97

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Recolección y preparación de muestras para herbario	189
Anexo 2	Recolección de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	192
Anexo 3.	Identificación de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl en el Herbario Universidad Católica del Ecuador	193
Anexo 4	<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl y <i>Camellia Sinensis</i> pulverizado y seco	194
Anexo 5.	Obtención del Extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl por Percolación	195
Anexo 6.	Eliminación del solvente del extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl por filtración al vacío	196
Anexo 7.	Equipo para eliminación del exceso de solvente Rotavapor	196
Anexo 8.	Estufa para eliminar el exceso de solvente y obtener el extracto seco	197
Anexo 9.	Balanza para pesaje	197
Anexo 10.	Desecador para almacenaje de extracto seco	198
Anexo 11.	Nebulizador	198
Anexo 12.	Espectrofotómetro marca (Shimadzu UV mini 1240) para análisis del DPPH y ABTS	199
Anexo 13.	Muestras para Espectrofotómetro marca (Shimadzu UV mini 1240) para análisis del DPPH y ABTS	200
Anexo 14.	Curva de calibración flavonoides totales	200
Anexo 15.	Reactivos DPPH y ABTS	201
Anexo 16.	Agitador de hélice	201

Anexo 17.	Potenciómetro	201
Anexo 18.	Fichas técnicas Materias primas (Polawax, Brij S2, Alcohol cetílico	203
Anexo 19.	Desarrollo de un gel Base y con Extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl y <i>Camellia Sinensis</i>	207
Anexo 20.	Desarrollo de una emulsión Base y con Extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	207
Anexo 21.	Producto Terminado Crema con <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	207
Anexo 22.	Estudio Físicoquímicos de la emulsión elaborada con extracto de <i>Cinchona</i> <i>Pubescens</i> Vahl al 0,5%	208
Anexo 23.	Estudio Microbiológico de la emulsión elaborada con extracto de <i>Cinchona</i> <i>Pubescens</i> Vahl al 0,5%.	209
Anexo 24.	Estudio Físicoquímico del Gel elaborado con extracto de <i>Cinchona</i> <i>Pubescens</i> Vahl al 0,5%	210
Anexo 25.	Estudio Microbiológico del Gel elaborado con extracto de <i>Cinchona</i> <i>Pubescens</i> Vahl al 0,5%	211
Anexo 26.	Estudio de Estabilidad Acelerada de la emulsión elaborada con extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 0,5%	212
Anexo 27.	Estudio de Estabilidad Acelerada del Gel elaborado con extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 0,5	213

RESUMEN

El presente estudio tuvo como finalidad valorar a la especie *Cinchona pubescens* Vahl, conocido como “casarilla” como una materia prima para la industria cosmética evaluando las propiedades y componentes antioxidantes, tanto en su extracto seco, como en formulaciones cosméticas. La especie se encuentra altamente difundida en el territorio Ecuatoriano y su alta adaptabilidad la ha convertido en una especie invasiva lo que hace relevante iniciar investigaciones con miras a su aprovechamiento industrial.

La concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto fueron respectivamente de, 30 mg GAE/g y 2 mg Hyp/g. Los flavonoides caracterizados por la metodología HP-TLC fueron: apigenina, quercetina, kaempferol y catequina. La actividad antioxidante del extracto evaluada por los métodos DPPH y ABTS espectrofotométricos dio los siguientes valores: IC₅₀ (DPPH) 0,0466 mg/mL y el IC₅₀ (ABTS) 0,082 mg/ml.

En las formulaciones cosméticas evaluadas por la metodología de la Fotoquimioluminiscencia se observa un incremento significativo del potencial antioxidante al compararlo con la fórmula base, hasta de 15 veces para las concentraciones más elevadas del ensayo, en todos los casos (gel o crema), el comportamiento resulto mayor al compararlo con un patrón positivo formulado con extracto seco de *Camellia sinensis*.

PALABRAS CLAVES

Cinchona Pubescens Vahl, Flavonoides, Actividad Antioxidante, DPPH, ABTS, Fotoquimioluminiscencia.

ABSTRACT

This study aimed to assess the species *Cinchona pubescens* Vahl, known as "scale" as a raw material for cosmetics evaluating the properties and antioxidant components, both in solids, as in cosmetic formulations. The species is widely published in the Ecuadorian territory and its high adaptability has become an invasive species making relevant initiate investigations with a view to industrial use.

The phenolic compound concentration in the extract and flavonoids were respectively 30 mg GAE / g Hyp 2 mg / g. Flavonoids characterized by the HP-TLC methodology were: apigenin, quercetin, kaempferol and catechin. The antioxidant activity of the extract and assessed by the DPPH ABTS spectrophotometric methods gave the following values: IC50 (DPPH) 0.0466 mg / mL and the IC50 (ABTS) 0.082 mg / ml.

In cosmetic formulations evaluated by the methodology Fotoquimioluminiscencia a significantly increased antioxidant potential when compared to the base formula is observed, up to 15 times higher concentrations of the assay, in all cases (gel or cream), the behavior turned higher as compared to a positive pattern formulated with dry extract of *Camellia sinensis*.

KEYWORDS

Cinchona pubescens Vahl, flavonoids, antioxidant activity, DPPH, ABTS, Photochemiluminescence.

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La oxidación es un evento químico inherente a la vida, pues está estrechamente relacionado con la formación de compuestos que proporcionan la energía necesaria para el funcionamiento celular; estos compuestos, denominados especies reactivas de oxígeno (**ERO**) son muy reactivos con otras sustancias y pueden producir componentes tóxicos para el organismo si se forman en exceso llevando al sistema a un estado de estrés oxidativo (**EO**), alterando su morfología celular (Farinas L., 2004).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) presentan una alta reactividad tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares. Se conoce que sus blancos fundamentales son los ácidos grasos insaturados de las membranas fosfolipídicas, proteínas y ácidos nucleicos. Estas especies, altamente reactivas, una vez formadas dan lugar a una serie de reacciones en cadena (peroxidación lipídica, glicosilación) que pueden dañar todas las moléculas de importancia biológica (Zorrilla G., 2002)

Existen un sin número de eventos que producen alteraciones del balance oxidativo, los producidos por el desgaste natural del organismo llamados endógenos y los relacionados

con factores externos o exógenos como la contaminación atmosférica, el exceso de exposición a radiación solar o radiación ultravioleta (rUV), el tabaquismo, alcohol, etc. (Farinas L., 2004).

Producto de este estrés oxidativo (**EO**) se generan radicales libres (**RL**), que reaccionan provocando daño celular en el organismo, los niveles tisulares de antioxidantes se ven disminuidos, esto ocasiona que los radicales libres (**RL**) reaccionen con aquellas moléculas de importancia biológica para el organismo generando peroxidación lipídica, alteración de la oxidación, fragmentación de las proteínas, hidratos de carbono, ADN, una marcada disminución de los principales compuestos antioxidantes, detoxificantes y enzimas relacionadas, asociados al envejecimiento desencadenando cambios que se aprecian en la piel (Pareja B., 1996) como pérdida de colágeno, elastina (Gómez J., 2000), grasa subcutánea, aparición de líneas de expresión o arrugas (Del Campo A. et al, 2004), además de lesión de las membranas biológicas, mutagénesis y carcinogénesis (Cuadrado O., 2013).

Los antioxidantes son compuestos químicos que interactúan con los radicales libres y los neutralizan. Aunque los organismos vivos poseen naturalmente un tipo de antioxidantes con los que se defienden de la acción perjudicial de los **RL** inactivándolos para prevenir o reducir el daño a nivel celular, su acción de protección no siempre es suficiente, siendo necesario emplear antioxidantes exógenos para lograr mantener el equilibrio celular.

Existe una enorme variedad de sustancias antioxidantes, aunque las más conocidas y con mayor efecto antioxidantes son las vitaminas E, C y A y los minerales, selenio y

manganeso. Otros antioxidantes son la coenzima Q10, glutatión, ácido lipoico, flavonoides, fenoles, polifenoles, fitoestrógeno, etc. que se obtienen de extractos derivados de plantas y que se encuentran dentro de un sin número de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos para su preservación o como principios activos en las formulaciones, como el aloe vera, tomillo, naranja amarga, eucalipto, soya, té verde, aceite de árbol de té, malva, entre otros, utilizados en porcentajes importantes con el objetivo de combatir el envejecimiento, piel seca, formación de arrugas, pérdida de elasticidad y tono, hiperqueratosis o manchas hiperpigmentadas, pérdida de la hidratación, etc.

Los flavonoides pueden interferir no sólo en las reacciones de propagación de RL sino también en la formación del radical en sí (**Pérez G., 2003**), tal es el caso del flavonoide quercetina que tiene una capacidad antioxidante que resulta 5 veces mayor al manifestado por las vitaminas E y C, que inhiben la fotooxidación en la membrana celular y se encuentra presente en cebollas y manzanas (Martinez S. et al, 2002). Otros flavonoides, como por ejemplo el kaempferol y la catequina que se obtienen del té verde o negro, brócoli, toronja, uva, manzana o fresas, pueden aportar a la planta protección frente a la radiación UV-B (Wink M., 1999).

Así también la *Camellia sinensis* (té verde) ha demostrado tener una gran actividad antioxidante ante otros de su clase como el té negro, romero, menta, caqui, mate, etc. debido a su elevado contenido de fenoles y flavonoides, por lo que su uso se ha extendido no solo al consumo de este té tan apreciado (Jungmin O, et al, 2013) sino también en cosmética.

Recientes estudios en una variedad de quina, específicamente la *Cinchona officinalis*, revelan la presencia de gran cantidad de compuestos fenólicos en la corteza del tronco, mostrando las grandes propiedades antioxidantes que puede tener esta familia de plantas (Ravishankara M, 2001).

Estos antecedentes y el conocimiento de las características de oxidación como el estrés oxidativo y formación de exceso de radicales libres, nos permitirá entender que los cambios que se presentan en la piel sea este, un envejecimiento prematuro o cualquier otro tipo de manifestación cutánea, requieren de estrategias preventivas que nos permitan tener un estilo de vida saludable (Pareja B., 1996), acorde a las nuevas tendencias, lo que nos ha llevado en el presente estudio a evaluar el potencial antioxidante del extracto seco de *Cinchona pubescens* Vahl, RUBIACEAE (Cascarilla) planta nativa del Ecuador y utilizarlo como sustancia activa en formulaciones fito-cosméticas de tipo crema o gel cuyos componentes fundamentales serán los flavonoides.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La exposición de la piel a un exceso de radiación solar (rUV), ozono u otros contaminantes producto de un estilo de vida desordenado (dietas des balanceadas o

pobres, dietas híper calóricas y altas en grasas); ejercicio o trabajo extenuante (Reyes A. & Carrillo M., 2011) y ciertos hábitos (fumar, fotobroncearse, etc.) han obligado a nuestro organismo a responder de manera adversa, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) precursoras de radicales libre (RL) en grandes cantidades, lo que supera la eficacia de la defensa antioxidante del sistema, haciéndose necesario la incorporación de compuestos antioxidantes por medio de la alimentación o vía tópica (Faria A. et al, 2007).

Es por esto que en los últimos años, los antioxidantes naturales provenientes de un sin número de plantas, están siendo incorporados en los diferentes campos de la industria como preservantes en alimentos, en medicinas y anti edad en cosméticos; compuestos como la quercetina, tocoferol y carotenos, entre otros, están sustituyendo a los antioxidantes sintéticos de mayor uso como la vitamina A y C, el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutil-hidroxianisol (BHA), debido a que éstos presentan una actividad comparable a los sintéticos y con la gran ventaja de no ser tóxicos (Mesa A. et al, 2010).

Estudios realizados en *Cinchona Officinalis*, perteneciente a la familia de las Rubiaceas demuestran una denotada capacidad antioxidante por los flavonoides que posee (Ravishankara M, 2001), así estas propiedades podrían ser atribuidas también a la planta objeto de estudio de la presente investigación, *Cinchona Pubescens* Vahl, conocida como cascarilla perteneciente a misma familia y que al ser una planta nativa del Ecuador que se encuentra en algunas provincias como: Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Cotopaxi, Oro, Galápagos, Guayaquil, Imbabura, Loja, Morona, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos,

Tungurahua y Zamora (Jørgensen, P. & León-Yáñez S.,1999), la cual tiene una buena disponibilidad de ubicación, lo que facilita la obtención del material vegetal para desarrollar las pruebas que determinen su capacidad antioxidante y su aplicación en 2 formas cosméticas: crema y gel.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo General

- Desarrollar formulaciones fito-cosméticas antioxidantes empleando como sustancia activa el extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl, RUBIACEAE (Cascarilla).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad antioxidante del extracto seco obtenido a partir de *Cinchona Pubescens* Vahl, RUBIACEAE (Cascarilla), utilizando los métodos de Captación del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (**DPPH**) y 2,2- azinobis-4-etilbenzotiazoline-6-sulfonato (**ABTS**).
- Cuantificar la concentración de compuestos fenólicos totales (método Folin-Ciocalteu) y flavonoides totales (método Lamaison y Carnat) en el extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl, RUBIACEAE (Cascarilla).

- Formular un gel y una crema antioxidante tomando como principio activo el extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl, RUBIACEAE (Cascarilla).
- Evaluar la actividad antioxidante en las dos formulaciones diseñadas: Gel por el método DPPH y Crema por el método PhotoChemiLuminescence (**PCL**).
- Evaluar la estabilidad de las dos formulaciones antioxidantes.

1.4 HIPÓTESIS

El extracto y formulaciones obtenidas a partir de *Cinchona Pubescens* Vahl, poseen una actividad antioxidante importante para validar su potencial como activo natural cosmético.

CAPTÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 CASCARILLA (*Cinchona pubescens* Vahl)





Figura 1. Cascarilla *Cinchona Pubescens* Vahl

Elaboración: Las Autoras, septiembre 2014

La *Cinchona pubescens* Vahl, también citada como: *Cinchona pelalba* y *Cinchona succirubra* (De la Torre et al, 2008) es un árbol originario de los Andes (principalmente Colombia, Perú, Bolivia, Ecuador, Guatemala) y se desarrollan en alturas de 900 a 3.400m sobre el nivel del mar.

Actualmente se cultivan en diversos países con clima tropical de Asia (Java, India), Sudamérica y África. La más usada con fines terapéuticos es la quina roja, estando casi en desuso la quina gris. Las partes utilizadas de la quina roja son la corteza del tronco y ramas (Alonso, 2004).

La *Cinchona Pubescens* Vahl llamada también “Quina o Cascarilla” es la planta medicinal americana más celebrada y su introducción desde Loja- Ecuador, a Europa en

las primeras décadas del siglo XVII produjo una auténtica revolución en la medicina, ya que por primera vez una droga en el sentido fármaco-terapéutico era capaz de curar la malaria y paludismo, los químicos aislaron los principios activos de la quina, denominados quinina y quinidina (Alonso, 2014).

Esto cambió radicalmente las formas farmacéuticas en uso, al introducirse las sales que reemplazaron a los polvos o extractos de quina (Cifuentes M., 2013).

Su historia se remonta a la época de la conquista española. En las montañas, al oriente de la ciudad sureña del Ecuador- Loja, existieron, siglos atrás bosques de quina (Cifuentes M., 2013).

La corteza de este árbol fue utilizada por los aborígenes de la región para tratar las enfermedades febriles. Los nombres quichuas chucchu-cara (corteza para el frío o escalofríos) y yurac-chucchu (árbol para el escalofrío), hace referencia a uno de sus efectos farmacológicos (Cifuentes M., 2013).

Con la conquista española vinieron desde el África los plasmodios, agentes causales de la malaria o paludismo. En 1619, el médico Pedro Leiva, trato de las fiebres tercianas al jesuita Juan López, administrándole una maceración de la corteza del árbol de la cascarilla. El tratamiento fue efectivo, el sacerdote se encontraba completamente curado. La noticia se difundió rápidamente entre los españoles y cuando poco tiempo después llego a Loja la noticia de que la condesa de Chinchon, esposa del Virrey del Perú (Gerónimo Fernández), se encontraba enferma de fiebres tercianas, el corregidor de Loja,

López de Cañizares, se apuró en conseguir de Leiva, el curandero malacato, una carga de corteza de la quina para enviar a Lima- Perú. No fue la condesa la enferma, aunque esa noticia se consagró en la historia de la medicina y sirvió para que Linneo, en honor a la condesa pusiese el nombre genérico de **Cinchona** a las nuevas plantas. Quien estuvo enfermo fue el Virrey, pero tampoco de paludismo sino de “cimaras de sangre”. La Cascarilla sirvió para el tratamiento milagroso de los pacientes de paludismo en el hospital de Lima (Bello, C., 1995).

El origen botánico no fue conocido hasta 1735, época en la cual el botánico francés La Condamine, descubrió el árbol y lo describió. En el año de 1736 fue enviado a una expedición de la Academia de Ciencias de Paris para medir un grado de la circunferencia terrestre en el ecuador, y a esta expedición se unió el botánico Jussieu, quien halló los árboles que daban la corteza de la quina, hasta entonces desconocidos para la ciencia. La botánica de estos árboles fue estudiada posteriormente por Mutis (1760), Ruiz & Pavón (1778-1788) y Weddel (1845-1848) y otros. (Bello C., 1995)

Durante siglos, la explotación de la quina fue una actividad meramente extractiva y muy destructiva, ya que se derribaban los árboles silvestres para aprovechar su corteza. Poblaciones silvestres de quina eran buscadas ansiosamente en lo que hoy son los territorios de Colombia, Ecuador y Perú, con el fin de obtener nuevas fuentes de la valiosa medicina. En las regiones más explotadas, los árboles escaseaban. Los ingleses fueron los primeros en establecer plantaciones comerciales de quina en sus colonias del sureste asiático durante el siglo XIX (Madsen, J., 2002).

La invención de nuevos medicamentos sintéticos para el tratamiento de la malaria ha reducido la presión sobre las poblaciones de quina. Siendo ésta una especie de crecimiento relativamente rápida, propia de bosques secundarios, no es difícil que las poblaciones silvestres de recuperen (Madsen, J, 2002).

En la actualidad, la mayor amenaza para la supervivencia de la especie, igual que para miles de otras plantas y animales con los que comparte su hábitat, es la deforestación progresiva de las montañas andinas (Madsen, J., 2002).

2.2 TAXONOMIA

Los datos taxonómicos de *Cinchona pubescens* Vahl se detallan a continuación:

- **Clase:** Equisetopsida C. Agardh
- **Subclase:** Magnoliidae Novák ex Takht.
- **Superorden:** Asteranae Takht.
- **Orden:** Gentianales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
- **Familia:** Rubiaceae Juss.
- **Tribu:** Cinchoneae DC:
- **Género:** *Cinchona* L.
- **Especie:** *pubescens* Vahl.

Fuente: Perez J. Alvaro. Certificado de Identificación *Cinchona pubescens* Vahl. Herbario. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 21/10/2014 (Ver Anexo I)

2.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Cinchona pubescens Vahl, RUBIACEAE, taxonómicamente pertenece a la clase Equisetopsida C. Agardh, a la subclase Magnoliidae Novák ex Takht., al super orden Asteranae Takht., al orden Gentianales Juss Ex Bercht. & J. Presl, a la familia Rubiaceae Juss. y a la tribu Cinchoneae. Esta tribu de acuerdo a Flora del Ecuador No. 50 (Andersson L., & Charlotte M., 1994) presenta los géneros: *Capirona* Spruce, *Ferdinandusa* Pohl, *Macrocnemum* P. Browne, *Ladenbergia* Klotzsch in Hayne, *Cinchona* L., *Remijia* DC., *Joosia* Karsten y *Stilpnophyllum* J. D. Hooker.

El género *Cinchona* Spruce, según el Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador (Jørguensen et al, 1995) presenta las siguientes especies: *Cinchona barbacoensis* H. Karst, *Cinchona capuli* L. (Andersson L., & Charlotte M., 1994), *Cinchona lancifolia* Mutis, *Cinchona lucumifolia* Pav. ex. Lindl., *Cinchona macrocalyx* Pav. ex. DC. *Cinchona mutisii* Lamb, *Cinchona officinalis* L., *Cinchona parabólica* Pav. *Cinchona pitayensis* (Wedd.) Wedd., *Cinchona pubescens* Vahl., *Cinchona rugosa* Pav y *Cinchona villosa* Pav ex Lindl.

La especie *Cinchona pubescens* Vahl, es un árbol de hasta 10 m de altura, con alrededor de 20 cm de diámetro, las ramas jóvenes van desde densamente a escasamente pubescentes; estipulas escasamente pubescentes de 1,2 – 2,6 (x) 0,5 – 1,5 cm; peciolo de 1,2 – 5 cm de largo escasamente pubescente ó hirsutolados.

Las hojas son delgadas y papiraceas cuando se secan de 8,3 – 23 (x) 5,3 – 21 cm (a menudo más largas en los brotes vegetativos); elípticas u ovaladas hasta sub orbiculares,

cuneadas a redondeadas o truncadas (ocasionalmente sub cordadas) en la base, obtusas en el ápice; venas secundarias de 7 a 11 pares, prominentes en los lados anterior y posterior, venas terciarias más o menos distinguibles; superficie adaxial usualmente mate, puberulento o hirteolado en las venas secundarias y en las superficies intervenosas, en ocasiones totalmente glabras, domatia ausente o indistinguible.

Inflorescencias axilares densamente pubescentes, cáliz de 1,3 – 2,8 mm de longitud con lóbulos de 0,4 – 1,2 mm, escasamente a densamente pubescente por afuera, glabro por dentro, sin coleteres, corola rosacea o purpura, pálido en la base, tubos de 8,8 – 14 mm de longitud, glabros o escasamente villosos cerca de la unión de los estambres, lóbulos 3,9 – 6 mm de longitud; filamentos adjuntos a 3,5 – 6,7 mm bajo la base del tubo de la corola; ovario densamente pubescente. Frutos capsulares elipsoides a sub cilíndricos con endocarpo papiraceo a cartaceo.

Semillas aladas de 6,9 – 8,5 x 2,2 – 2,8 mm (Andersson L., & Charlotte M., 1994)

2.4 DATOS ECOLÓGICOS

La quina roja o cascarilla (*Cinchona Pubescens* Vahl) es originaria de las montañas de los Andes. Sus árboles se pueden encontrar a altitudes que habitan desde 300-3900 metros sobre el nivel del mar. Es en Ecuador que *Cinchona Pubescens* Vahl tiene la distribución más amplia en comparación con las demás especies de *Cinchona*.

Esta especie crece de forma nativa en Bolivia, Colombia, Costa Rica, Panamá, Perú y Venezuela y se encuentra como especie introducida en Tahití, Hawai, las Islas Galápagos, Santa Elena y Tanzania.

Los árboles de *Cinchona Pubescens* Vahl llamados también como árboles de la fiebre, crecían en forma nativa en zonas selváticas de espesor de la Cordillera de los Andes inaccesibles e inhóspitas para los seres humanos, por lo que fueron introducidos en diferentes partes del mundo por los agricultores debido a su atractivo poder comercial ya que de ellos se extraía la quinina de su corteza y se distribuía a otras partes del mundo para aumentar sus beneficios económicos (Lowe S. et al, 2004).

La *Cinchona Pubescens* Vahl actualmente reside en una amplia gama de hábitats. Estos hábitats incluyen: zonas agrícolas, a lo largo de las líneas costeras, bosques naturales, así como los bosques plantados, pastizales, áreas perturbadas, y entre los arbustos. La especie prospera bien en áreas disturbadas y mejor en áreas que han sido recientemente quemadas. La *Cinchona Pubescens* Vahl también crece en suelos volcánicos ácidos y tiende a crecer en zonas rocosas. En Ecuador, se encuentra con mayor frecuencia entre los volcanes, así como en las montañas de los Andes. Y hoy en día es considerada como una especie invasora que se entromete en los hábitats forestales y no forestales y está incluida en la lista 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, debido a su crecimiento muy vigoroso, y una producción y diseminación extremadamente rápida, capaz de transformar rápidamente la composición de las especies en el área en que se establece, tal es el caso de las Islas Galápagos, Islas de Tahití e Islas de Hawai. Dos medidas se pueden tomar

para evitar la propagación del árbol, una técnica es arrancar de raíz el árbol, pero los fragmentos cortados todavía son capaces de volver a crecer y la otra técnica es el uso de un herbicida sobre los tocones cortados para evitar el crecimiento, pero esto acabaría por destruir a otras plantas (Lowe S. et al, 2004).

Hábito: Árbol

Origen: Nativo, cultivado

Propagación: Semillas dispersadas por el viento.

Rango nativo: Desde Costa Rica a Venezuela y Perú; también cultivada y naturalizada (Andersson L., & Charlotte M., 1994)

2.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad farmacológica o actividad biológica corresponde a los efectos benéficos o adversos de una droga sobre la materia viva. Cuando la droga es una mezcla compleja, esta actividad es ejercida por los principios activos de la sustancia. Esta actividad depende del cumplimiento de los criterios de ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) y describe la disposición de un compuesto en el organismo ya que éstos cuatro criterios tienen una influencia directa sobre el nivel del fármaco y su farmacocinética al ser expuesto a los tejidos, denominados también bioactivos.(ALEGSA, 2014).

Los antimaláricos de interés en dermatología de la Cinchona son: cloroquina, hidroxicloroquina y quinacrina. Su farmacocinética es cualitativamente similar en adultos

y niños. La cloroquina y la hidroxicloroquina son 4-aminoquinolinas, y solo se diferencian en la sustitución de un grupo etilo por hidroxilo. Figura N° 2. Los dos fármacos muestran

Características farmacocinéticas similares. Son hidrosolubles y son absorbidas rápidamente por el tracto gastrointestinal. Se unen a las proteínas plasmáticas y elementos

Celulares sobre todo plaquetas, monocitos y linfocitos. La concentración plasmática alcanza el máximo pico en 8 horas. Su metabolismo es en el hígado (15%), con eliminación enterohepática (< 10%). La excreción renal es de 50-70%, y puede disminuir la depuración de creatinina en un 10%. Se almacena en grandes cantidades en el hígado, bazo, pulmones y las glándulas suprarrenales, desde donde ejerce su acción tanto tóxica como terapéutica.

Las dosis equivalentes de las tres aminoquinolinas son cloroquina 500 mg, hidroxicloroquina 400 mg y quinacrina 100 mg. Tienen varios efectos relativamente bien definidos de acción sobre los sistemas bioquímicos y celulares. Se describen efectos antiinflamatorios, inmunológicos, antioxidantes, antipalúdicos y anticolinesterasas. Se ha investigado y especulado mucho acerca del posible efecto de pantalla solar de la cloroquina administrada en forma sistémica. La cloroquina absorbe en la región de los rayos UVA del espectro y está ligada en la epidermis en una concentración relativamente alta (Sanchez L, 2008)

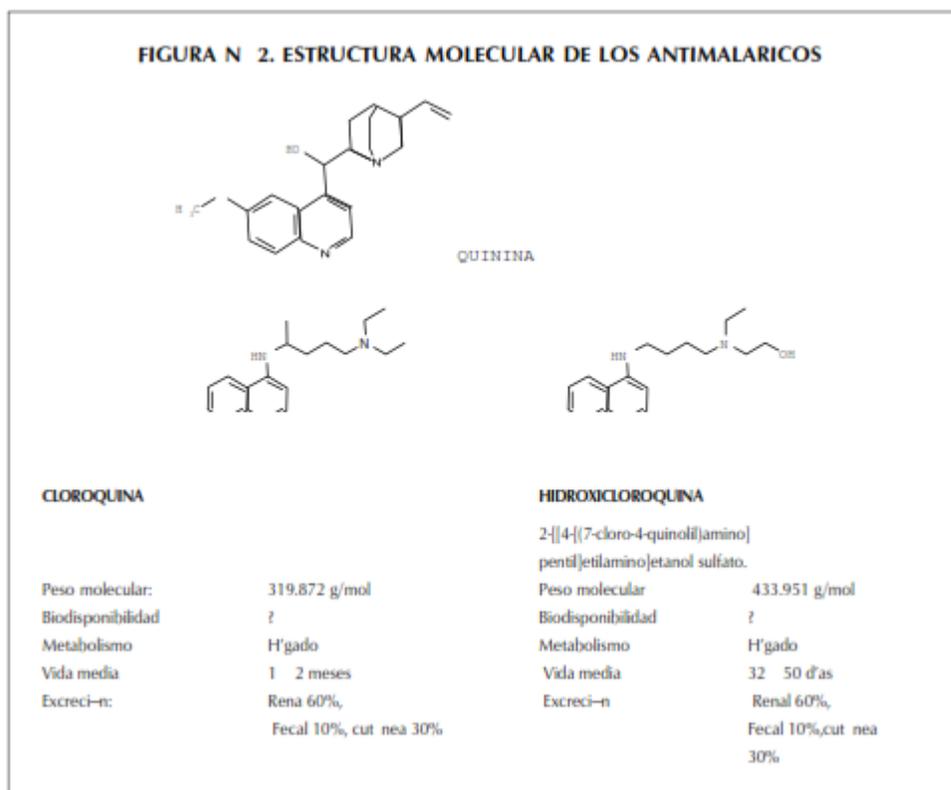


Figura 2. Antimalaricos en Cinchona

Fuente: (Sanchez L, 2008)

En dermatología es donde más se usan estos antimalaricos de síntesis, junto con el uso contra la malaria y artritis reumatoidea, dos de las principales indicaciones. Sus indicaciones más destacadas son en las enfermedades inducidas por la exposición solar, como el lupus eritematoso cutáneo, erupción polimorfa solar, urticaria solar, infiltración linfocítica de Jessner. También se emplea en enfermedades con base inmunológica (dermatomiositis, vasculitis urticarial, pénfigo foliáceo fotoinducido y esclerodermia localizada), enfermedades granulomatosas (sarcoidosis, granuloma anular diseminado, queilitis granulomatosa), así como en otros procesos tales como linfocitoma cutis,

mucinosi eritematosa, porfiria cutánea tarda, dermatiti atópica, liquen plano, paniculiti idiopáticas (Sanchez L, 2008)

- ### ANTIMALÁRICOS EN DERMATOLOGÍA
- Lupus eritematoso
 - ❖ Lupus eritematoso cutáneo agudo
 - ❖ Lupus eritematoso cutáneo subagudo
 - ❖ Lupus eritematoso cutáneo crónico
 - ❖ Síndrome antiofepídico asociado a LES
 - ❖ Prevención de la morbilidad por aterosclerosis
 - ❖ Posible prevención de afectación de órganos mayores
 - Erupción polimorfa solar
 - Urticaria solar
 - Porfiría cutánea tarda
 - Sarcoidosis
 - Dermatomiositis
 - Granuloma anular diseminado
 - Liquen plano oral
 - Síndrome de Sjögren
 - Panniculitis
 - Misceláneas:
 - ❖ Artritis psoriásica
 - ❖ Vasculitis urticarial
 - ❖ Píngulo foliáceo fotoinducido
 - ❖ Queratitis granulomatosa
 - ❖ Enfermedad de Jessner
 - ❖ Linfocitoma cutis
 - ❖ Estomatitis ulcerativa crónica
 - ❖ Epidermolisis bulosa
 - ❖ Liquen esclerótico
 - ❖ Dermatitis atópica
 - ❖ Fascitis eosinofílica
 - ❖ Mucinosi eritematosa reticular
 - ❖ Pseudopelada de Brocq
 - ❖ Acrodermatitis atrófica crónica

Figura 3. Antimalaricos en Cinchona

Fuente: (Sanchez L, 2008)

Los diferentes alcaloides de la *Cinchona Pubescens* Vahl en especial la quinina y quinidina han sido objeto de numerosas investigaciones farmacológicas.

La quinina es antimalárico, activo frente a *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale* en sus estadios de desarrollo de formas intra eritrocitarias hasta trofozoíto joven; es inactiva sobre los esporocitos, formas tisulares y gametocitos y en la actualidad su uso está restringido a casos excepcionales de pacientes parasitados por plasmidios resistentes a la cloroquina o a otros antimaláricos de síntesis (Bello, C., 1995). Bernardino Ramazzini (1633-1714) médico italiano prevenía las fiebres maláricas, recomendando ingerir en forma regular un extracto de cinchona (Puigbo J., 2012).

La quinina y la quinidina aunque también han sido desplazadas por drogas sintéticas, aún se utilizan por su efecto anticronotrópico-antiarrítmico, en el tratamiento de la taquicardia paroxística, arritmia sinusal y fibrilación – anti fibrilante (Pollito P, 2006), reportándose resultados éxitosos por parte de Wenckebach. La administración de la quinina, era capaz de enlentecer la frecuencia ventricular habitualmente rápida, estabilizar las membranas de la célula miocárdica, bloquear los canales de sodio, disminuir la excitabilidad, conductibilidad y contractibilidad (Villamañán et al, 2014), por lo que ha llamado la atención en la terapia de enfermedades del corazón (Sokolow 1951). Además, Lamba et al. (2000) encontraron actividad hipoglucemiante en el tratamiento de pacientes diabéticos.

La quinidina es un dextroisómero de la quinina que fue descrita en 1848 por Van Heyningen y designada con este nombre por Pasteur en 1853. La droga y sus extractos se utilizan para estimular el apetito y las secreciones gástricas (Bello, C., 1995).

La quinina se utiliza para tratar la anemia, la indigestión, trastornos gastrointestinales, fatiga en general, fiebres, paludismo y como estimulante del apetito, es tónica, eupéptica y antifermentativa en los catarrros del estómago con fermentación ácida (favorece la digestión).

En la medicina herbal europea, la corteza se considera anti-protozoos, antiespasmódico, y se utiliza como un estimulante del apetito, para la pérdida del cabello, el alcoholismo, el hígado, trastornos del bazo y la vesícula biliar (El-Naggar S., 2010).

En los EE.UU., la corteza de quinina se utiliza como tónico y ayuda digestiva, para reducir las palpitations del corazón y normalizar las funciones del corazón, para estimular la digestión y el apetito, para las hemorroides, venas varicosas, dolores de cabeza, calambres en las piernas, los resfriados, la gripe, la indigestión, como astringente, bactericida y con acciones anestésicas en varias otras condiciones (El-Naggar S., 2010).

La administración de quinidina causa una notable mejoría en los calambres musculares producidos por una cirrosis hepática (Lee FY, 1991) y en el tratamiento de calambres nocturnos (Bello, C., 1995).

Estudios realizados por Sabah M. M. y El-Naggar S., (2010) mostraron que la *Cinchona officinalis* tuvo un efecto positivo sobre la protección contra el cáncer de riñón.

Los efectos tóxicos tanto de la quinina como de la quinidina son muy bien conocidos. A dosis altas la quinina puede provocar náuseas, vómitos, profundos efectos depresivos, la quinidina *in vitro* puede producir efectos adversos renales mientras que *in vivo* en dosis

altas produce efectos nefrotóxicos. En las fábricas donde se procesa la corteza de la quina, a veces puede ocurrir dermatitis por contacto y asma (Bello, C., 1995).

Wenckebach y Frey empezaron a usar el sulfato de quinidina en dosis menores que las usadas con la quinina como alternativa a disminuir la toxicidad del uso de la quinina y lograr un efecto igual con menor dosificación (Bello, C., 1995).

2.6 USOS DE LA CASCARILLA

Aproximadamente el 60% de cortezas de *Cinchona Pubescens* Vahl se utiliza en la producción de medicamentos y el 40% restante se utiliza principalmente en la industria de alimentos y bebidas, siendo el mayor producto las aguas tónicas (sabor amargo). También se utilizan estos alcaloides en síntesis de moléculas quirales (**Verpoorte R., et al. 1988**)

2.6.1 USOS MEDICINALES

2.6.1.1 Tradicionales

La corteza de la cascarilla (*Cinchona Pubescens* Vahl) contiene varios alcaloides, el principal de los cuales es la quinina, de propiedades medicinales tradicionalmente reconocidas; además quinidina, cinconina y cinconidina (**Loayza, K, 2010**).

La corteza se usa para extraer la quinina, alcaloide usado para curar el paludismo y las fiebres. La corteza, mezclada con aguardiente, se usa para tratar el resfrío y la carraspera de la garganta. **(De la Torre, 2008)**

La medicina tradicional le atribuye también propiedades como antiséptico, preparada en infusión. Las cortezas de otras especies del género *Cinchona*, como *C. calisaya* y *C. officinalis*, también contienen quinina y tienen similares aplicaciones.

Es tónico, aperitivo, digestivo, colagogo, astringente, febrífugo, cicatrizante. La quinidina es un tónico cardíaco, potenciador de la acción de los digitálicos **(San Gregorio M., 2013)**

Está indicado para inapetencia, dispepsias hiposecretoras, disquinesias hepatobiliares. Gripe, astenia, convalecencia, afecciones febriles, malaria. Profilaxis de las arritmias cardíacas, tratamiento de la taquicardia paroxística y la fibrilación auricular. Calambres nocturnos. En uso externo: faringitis, estomatitis **(Gupta, M. P., & Calderón, Á., 2006)**, a manera de tintura como loción capilar para combatir la caspa, seborrea y calvicie, también evita la piorrea, calmando dolores y afecciones bucales **(Chiriani, C., 1992)**.

En América del Sur se menciona que la corteza de quinina se usa como un remedio natural para el cáncer (mama, glándulas, hígado, mesenterio, bazo), infecciones amebiana, los resfriados, la diarrea, la disentería, dispepsia, fiebre, gripe, resaca, el lumbago, la neuralgia, la neumonía, la ciática, la fiebre tifoidea y las venas varicosas (El-Naggar S., 2010).

2.6.1.2 Etnomédicos

En 1630, la cinchona fue una de las primeras plantas medicinales en cruzar el Atlántico hacia España. Según una historia legendaria, en la región donde hoy se encuentra el Perú, un árbol gigante, derribado durante una tormenta, cayó sobre una charca de agua estancada. Con el correr de los días, el agua se enriqueció con los distintos componentes de la corteza del árbol. Un nativo, que casualmente pasaba por el lugar, bebió del agua porque estaba muy sediento, a raíz de la fiebre intermitente que lo aquejaba (malaria). El hombre se desmayó y al despertarse, milagrosamente se había curado. En 1819, Pelletier y Caventou, dos químicos franceses aislaron dos alcaloides diferentes a partir de muestras de corteza de cinchona, la quinina y la cinchonina (Tyler V., 2013).

Algunos antropólogos hacen referencia a medicamentos específicos relativamente desconocidos de las antiguas civilizaciones incas en América del Sur, los aztecas y los mayas en Mesoamérica. La medicina Inca, famosa por la introducción de drogas como la quina (Cinchona) que contiene un agente poderoso quinina contra la malaria, ha sido incluidas en sus prácticas quirúrgicas como la trepanación craneana con el propósito de neurocirugía (tumor el tratamiento de descompresión de la conmoción cerebral o sangrado - eliminación de coágulos). Según Jürgen Thorwald, (1990) en Perú se encontraron hallazgos sorprendentes con un alto porcentaje de sobrevivientes de trepanaciones, se relata que entre cuatro cráneos examinados, tenían doscientos cincuenta casos de curación, y entre setenta y uno de los casos examinados se encuentra sólo doce sin señales de regeneración o de supervivencia (Norris S., 2011)

Se utiliza para desordenes del ritmo cardiaco, fiebres, enfriamientos, calambres musculares, indigestión. Se hierve ligeramente media cucharadita de corteza desmenuzada de hierba troceada (fresca o seca). Se bebe caliente, una taza 3 veces al día. Para resfriado común se toma la infusión. Como febrífuga y antipalúdica, bajo la forma de polvo y otros preparados galénicos, como la tintura, el extracto fluido y varios tónicos y amargos, la dosis es de un gramo (Chiriani, C., 1992).

2.6.2 Otros Usos

2.6.2.1 Cosméticos

De la cocción de la corteza se extrae el agua de cascarilla que se usa para combatir la caída del cabello (Chiriani, C., 1992) y como astringente (Gimenez, A., 2002).

La henna quinquina se le suele llamar al preparado fortificante y revitalizante del cabello (inoloro); suele llevar una base de Cassia y quinina o cinchona (muy común como aditivo en los champús fortificantes) más un preparado de otras hierbas como ortiga o urtica dioica, tomillo o *Thymus vulgaris*, amla o *phyllantus emblica*, abedul o *betula alba* y/o otras plantas, creando un efecto de acondicionado, fortificando los bulbos capilares previniendo su caída, estimulando el crecimiento, engrosando el cabello y en definitiva un preparado apto para cabellos finos, débiles o con tendencia a la caída. También es conocida como tintes vegetales para el cabello (henna, manzanilla y la quina) (Guerra-Tapia, A. & Gonzalez-Guerra, E, 2014).

2.6.2.2 Sociales

De la corteza se extrae el sulfato de quina que es usado en la fabricación de anti conceptivos. Es la flor nacional del Ecuador (De la Torre L., 2008).

2.7 INVESTIGACIONES DE LA CASCARILLA

Se han realizado investigaciones para determinar la actividad citotóxica de plantas antitumorales, a partir del estudio de sus componentes, encontrándose que la corteza del tallo de *Cinchona Pubescens* Vahl debe su débil actividad citotóxica a la presencia de ácido quinóvico. Este ácido y su 3-ramnósido fueron aislados y caracterizados a través de varios derivados, todos los cuales se ensayaron para determinar su citotoxicidad (Raffauf R, 1977)

Debido a su importancia medicinal como fuente de la quinina, el género *Cinchona* ha atraído una atención extraordinaria de taxonomistas históricamente investigando las especies existentes, donde se reconocen 23 especies entre ellas *Cinchona Pubescens* Vahl , que es endémica de una pequeña zona en el sur de Ecuador (Andersson, L.,1998), y que fueron utilizadas durante siglos para tratar las fiebres recurrentes o malaria y su uso se reporta oficialmente desde 1649, siendo los jesuitas quienes informaron por primera vez a Europa de sus propiedades terapéuticas, por lo que son consideradas como las salvadoras de la humanidad (**Zevallos P., 1989**).

Se realiza una investigación mediante análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) del tallo de *Cinchona Pubescens* Vahl, siguiendo el procedimiento de Rondina Coussio (1969) y Miranda (2002) y se aísla la quinina, la cual se identificó mediante sus espectros de masas. El análisis cualitativo permite corroborar la presencia de: alcaloides (+++), aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (++) , triperenos y esteroides (+), quinonas antroquinonas o antrones (+), catequinas (+), flavonoides (+) y saponinas (+) (Córdor E., 2009)

Se realiza un estudio de las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la malaria en el sureste de Nigeria y su determinación fitoquímica. Los resultados indican que *Cinchona Pubescens* Vahl es una de las plantas de uso general para la malaria y también mostraron un contenido de alcaloides de $8,87 \pm 1,96\%$; flavonoides de $1,10 \pm 0,34\%$; taninos $21,07 \pm 0,18\%$; fenoles $0,91 \pm 0,19\%$ y glucósidos cianogénicos $0,213 \pm 0,035\%$. La presencia de estos fitoquímicos, especialmente alcaloides y flavonoides, pueden explicar el uso tradicional de estas plantas por los curanderos tradicionales (Ayoola, G., 2008)

La cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona Pubescens* Vahl y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica realizada en esta investigación ya que esta planta perteneciente a la familia de las Rubiaceae posee a la quinina como principio activo razón por la cual fueron utilizadas durante siglos para tratar la malaria. Este género es una fuente potencial de nuevas plantillas estructurales en la búsqueda de nuevos candidatos antimaláricos. El presente trabajo tuvo como objetivo la identificación y, cuantificación de la quinina y de otros metabolitos presentes en los extractos de diferente polaridad, de

los tallos de *Cinchona Pubescens* Vahl, el aislamiento del ácido oxoquinóvico, la actividad antiplasmodial y, además, la medición de su efecto citotóxico. Los resultados muestran una alta actividad antiplasmodial para el extracto de los alcaloides ($IC_{50} = 2,20 \pm 0,0325 \mu\text{g/mL}$), una baja citotoxicidad ($CC = 80,2 \pm 12,2 \mu\text{g/mL}$), y un alto contenido de quinina el cual fue de $21,3 \pm 0,0247$ ppm. El compuesto ácido oxoquinóvico presentó una actividad antiplasmodial de $IC = 11,3 \pm 0,741 \mu\text{g/mL}$, y una citotoxicidad de $CC = 72,4 \pm 3,85 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados motivan los estudios fitoquímicos en la búsqueda de principios activos y análogos estructurales en diferentes especies de Cinchonas como una fuente de nuevos agentes antimaláricos (Mesa A. et al, 2013)

Se realizó un estudio de la composición química del Tónico Amargo de Quina Roja (*Cinchona Pubescens* Vahl), en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se utilizó como metodología experimental el aislamiento de alcaloides y flavonoides a partir de la preparación del extracto etanólico, mediante cromatografías en capa fina, se tamizó fitoquímicamente dando flavonoides y alcaloides. Como resultado se determinó la presencia de Quinidina y Quinina; de Cinconina y Cinconidina; de Apigenina y Kaempferol; de quercetina, con denotados efectos terapéuticos (Cifuentes M., 2013)

La quinidina es también un alcaloide derivado de la cinchona y ha llamado la atención en la terapia de enfermedades del corazón, especialmente en el caso de fibrilación auricular crónica y de la taquicardia ventricular (Sokolow 1951). Además, Lamba et al. (2000) revisaron una evaluación de algunas plantas y sus componentes activos incluyendo alcaloides de la quina (quinina y quinidina) tienen actividad hipoglucemiante que se

utiliza para tratar a pacientes diabéticos durante siglos. Otras sustancias químicas que se encuentran en la planta principal de la corteza de quinina incluyen: Aricine, ácido cafeico, ácido cinchofulvico, ácido cincholic, cinchonaina, cinchonidina, cinconina, cinchofilamina, ácido cinchotanico, cinchotina, conquinamina, cuscamidina, cuscamina, cusconidina, cusconina, epicatequina, javanina, paricina, proantocianidinas, quinacimina, quinamina, ácido quínico, quinicina, quinina, quinidina, ácido quinóvico, quinovin y sucirubina

La corteza quinina brasileña se utiliza para tratar la anemia, la indigestión, trastornos gastrointestinales, fatiga en general, fiebres, paludismo y se utiliza como estimulante del apetito. En América del Sur se menciona que la corteza de quinina se usa como un remedio natural para el cáncer (mama, glándulas, hígado, mesenterio, bazo), infecciones amebiana, problemas del corazón, los resfriados, la diarrea, la disentería, dispepsia, fiebre, gripe, resaca, el lumbago, la malaria, la neuralgia, la neumonía, la ciática, la fiebre tifoidea y las venas varicosas (El-Naggar, S. M. 2010).

En la medicina herbal europea, la corteza se considera anti-protozoos, antiespasmódico, anti-malaria, un tónico amargo y una fiebre-reductor y se utiliza como un estimulante del apetito, para la pérdida del cabello, el alcoholismo, el hígado, trastornos del bazo y la vesícula biliar, el tratamiento de irregular latido del corazón, anemia, calambres en las piernas y las fiebres de todo tipo. En los EE.UU., la corteza de quinina se utiliza como tónico y ayuda digestiva, para reducir las palpitaciones del corazón y normalizar las funciones del corazón, para estimular la digestión y el apetito, para las hemorroides, venas varicosas, dolores de cabeza, calambres en las piernas, los resfriados, la gripe y la

indigestión y por su astringente, bactericida y acciones anestésicas en varias otras condiciones (El-Naggar, S. M. 2010).

Aunque fueron documentados los efectos beneficiosos de la quinina y ampliamente recomendado para la malaria producida por *Plasmodium falciparum* sin presentar complicaciones (WHO 2006, 2008), especialmente en las mujeres embarazadas (Adam et al 2004b y la OMS de 2006 y 2008), también se registraron algunos efectos secundarios debido a la sobredosis de quinina. Morrison et al (2003) revisaron la intoxicación quinina por sobredosis, y esta afecta a múltiples órganos y sistemas, como la visión, la audición, los sistemas cardiovascular y renal que terminan con la muerte. Agarwal y Rao (1995) informaron que la quinidina *in vitro* puede producir efectos adversos renales mientras que *in vivo* en dosis altas produce efectos nefrotóxicos. Sus datos sugirieron que la quinidina puede alterar el transporte renal y funciones mitocondriales a través de la inhibición de la PAH (p-aminohipurato) y transporte de TEA (tetraetilamonio) en láminas corticales renal y reducir el índice de control respiratorio de la corteza renal. La lesión renal aguda e insuficiencia renal debido a la terapia de quinina también fueron debidamente documentadas (Donadio et al 1968; Ott et al 1991; Hedman y Meijer 1998, Glynn et al 1999, Leroy et al 2008 y Mishra et al., 2006).

Sabah M. y El-Naggar (El-Naggar, S. M. 2010) realizaron el trabajo de investigar el papel protector de *Cinchona officinalis* para prevenir el efecto cancerígeno en el riñón de ratones albinos inducidos por la amina "mutágeno" heterocíclica. El experimento nutricional se llevó a cabo en 20 ratones albinos divididos en cuatro grupos. El primer grupo (A) fue de control y recibió una dieta basal durante 4 semanas y se le dio a beber

agua del grifo. Al segundo grupo (B) se les dio también dieta basal y a beber a diario una bebida preparada a partir de *Cinchona officinalis* en lugar de agua durante 4 semanas. El tercer grupo (C) se trató oralmente por una dosis tóxica de un mutágeno (0,25 mg \ ratón) en el comienzo del experimento y recibió dieta basal y agua del grifo durante 4 semanas. El último grupo (D) recibió la dieta basal y bebió la bebida de *Cinchona officinalis* durante 4 semanas. Al inicio del experimento, el cuarto grupo fue tratado oralmente por una dosis tóxica de la mutágeno (0,25 mg\ratón). Se realizaron estudios histopatológicos e histoquímicos utilizando la microscopía óptica y electrónica. Muchos de los efectos renales histopatológicos fueron encontrados en los grupos experimentales C y D, en comparación con los controles. Estas alteraciones fueron más pronunciados en el grupo (C) e incluían: la reducción, la degeneración, los efectos inflamatorios y signos de carcinogénicos en los corpúsculos renales y túbulos en algunas regiones del riñón. Los resultados mostraron que la *Cinchona officinalis* modula los efectos cancerígenos del mutágeno tóxico en los riñones de los grupos B y C. El estudio histoquímico mostró una ligera disminución en el contenido de carbohidratos y proteínas totales en los tejidos renales de todos los grupos de los ratones tratados con mutágeno en comparación con los controles. Los resultados indicaron que *Cinchona officinalis*, tuvo un efecto positivo sobre la protección contra el cáncer de riñón. Este resultado fue confirmado por la microscopía electrónica que indicó la mejora de la organización celular en ratones tratados con *Cinchona officinalis* (El-Naggar, S. M. 2010).

Este alcaloide quinolínico ha jugado un papel importante y esencial en la medicina por cientos de años, su química ha fascinado a muchos investigadores y ha motivado cambios en la química orgánica, síntesis enantio-selectiva y en la química industrial moderna. Este

poderoso fármaco empleado para tratar las manifestaciones graves causadas por *Plasmodium falciparum* Welch (Haemosporida: Sporozoa), se convirtió en un modelo para sintetizar nuevos agentes antimaláricos como la cloroquina, amodiaquina, mefloquina, primaquina, halofantrina y lumefantrina (Vipan et al., 2009). En la actualidad, la malaria sigue siendo uno de los problemas de salud más graves en muchas partes del mundo, particularmente en África y América Latina, dado que son las regiones con más altos índices de mortalidad (WHO, 2011) por lo que ha surgido un interés por descubrir nuevos metabolitos secundarios a partir de plantas de género *Cinchona*, esto debido a la resistencia que ha desarrollado *P. falciparum* a los medicamentos de síntesis, los cuales actualmente son empleados para tratarla (Robert et al., 2002).

El género *Cinchona*, llamado comúnmente cascarillas o quininas está distribuido desde Costa Rica hasta Bolivia con más de 40 especies e híbridos. Las dos especies *Cinchona* más estudiadas son *C. officinalis* L. y *C. calisaya* Wedd. Donde la mayoría de estas especies contienen los alcaloides: quinina, quinidina, cinconina y cinconidina, los cuales varían en su contenido en la corteza, con un porcentaje entre el 7 - 12%, y una distribución porcentual de 70 - 90% quinina, 1 - 3% cinconidina y hasta 1% quinidina (McCalley D., 2002), también existen otros alcaloides minoritarios que son precursores de la formación de los alcaloides mayoritarios en las distintas rutas biogénicas como el triptófano, ácido quínico, entre otros (Leete E, 1968).

Al inicio del siglo XX la producción estimada de quinina era de 300 a 500 toneladas por año, lo cual significa que debieron procesarse entre 5 a 10 mil toneladas de corteza de *Cinchona* (Córdor et al., 2009). Actualmente, las especies del género *Cinchona*, están

catalogadas en vía de extinción o se encuentran en las listas de especies amenazadas (Jaramillo et al., 2004).

Los factores que influyen son; la explotación que se dio en el siglo XVII por sus propiedades antimaláricas, además de la pérdida de la biodiversidad del norte de los Andes, dada por la transformación de los ecosistemas entre ellos los que acobijan a la distribución de *Cinchona* por nuevas colonizaciones. Estos factores han provocado una reducción en las poblaciones de *Cinchona* en algunas regiones, encontrándose únicamente en pequeños parches o individuos aislados (Fernández et al., 2004). Por otra parte, en otras regiones los impactos de las invasiones de plantas están siendo reconocidas como un de las mayores amenazas a la biodiversidad. En Galápagos-Ecuador, las especies nativas y endémicas de la región se ven amenazadas por la invasión de la especie *Cinchona Pubescens* Vahl, sobre la vegetación nativa, por lo que en algunos casos se han implementado métodos eficaces para su control como la introducción de otras especies que suprimen suabundancia, sin embargo, esta estrategia presenta la desventaja de una invasión por otras especies. La explotación sostenible de la especie *Cinchona Pubescens* Vahl podría ser una estrategia en cuanto a la producción de los principios activos como la quinina, ya que podría disminuir de esta manera el impacto ecológico que genera (Jäger et al., 2007).

Plantas de este género aún son una fuente potencial de quinina y de nuevas plantillas estructurales en la búsqueda de nuevos candidatos antimaláricos (Andrade-Neto et al., 2003). Esto hace necesario que en nuestra región, se exploren nuevas especies de *Cinchona* mediante estudios fitoquímicos que validen la presencia de alcaloides,

principalmente en su contenido de quinina, y que se valide su potencial antimalárico como una estrategia de conservación y preservación de especies tan importantes que han contribuido e impactado el desarrollo de la humanidad. En Colombia, se conocen siete especies, la mayoría exclusivas de la región Andina en altitudes por encima de los 1.000 m.s.n.m. Estas especies se encuentran en el pie de monte pacífico del departamento de Nariño y pueden bajar hasta los 100 metros de altitud, entre las especies conocidas se encuentra la especie *Cinchona Pubescens* Vahl, la cual ha sido poco estudiada desde un punto de vista químico y biológico (Mendoza H. et al., 2004).

En la obtención de extractos de diferente polaridad a partir de los tallos de la planta *Cinchona Pubescens* Vahl, se cuantificó el contenido de quinina presente en estos, se aisló y caracterizó uno de los compuestos de mayor abundancia en el extracto de diclorometano y se determinó el potencial antiplasmodial sobre cultivos continuos de cepas de *P. falciparum* NF-54 sensible a la cloroquina, y su efecto citotóxico en células HepG2, con el fin de contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la malaria y así mismo, contribuir al fortalecimiento de los estudios de especies de género *Cinchona* como fuente importante de quinina y nuevos antimaláricos naturales, además de promover la conservación y preservación de estas especies. (Vanegas A., 2013)

Las últimas publicaciones referidas tratan del aislamiento e identificación de los alcaloides en diversos órganos de la planta obtenidos mediante cultivo celular (Verpoorte R., et al. 1982), (Verpoorte R., et al. 1984).

Además de los alcaloides quinina y quinidina, en las cortezas de Cinchona se encuentran sus análogos no metoxilados: cinconidina y cinconina (Verpoorte R., et al. 1988)

La gran importancia comercial de los alcaloides obtenidos de Cinchona ha conducido a llevar a cabo varios esquemas de síntesis total de la quinina; sin embargo, ninguna de ellas ha logrado tener un interés comercial. Así mismo, en los últimos años se ha realizado la producción de estos alcaloides mediante cultivos celulares de plantas, pero sin lograr resultados satisfactorios para su obtención a gran escala. Por lo tanto, el material vegetal continúa siendo la materia prima para la obtención de estos alcaloides (Córdor. E., 2009)

2.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE LA PLANTA

2.8.1 FITOQUÍMICA

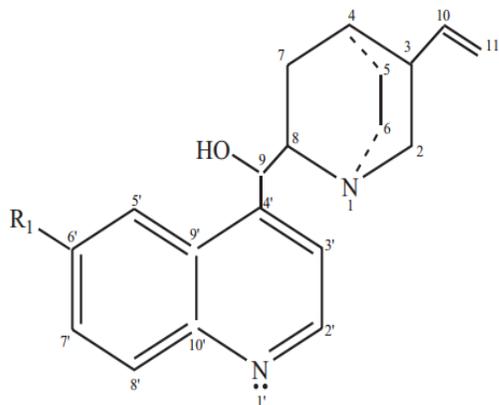
Más de un siglo después que comenzó el uso oficial de la quina, los químicos franceses Pelletier & Carentouaislaz, aislaron varios alcaloides de la corteza de la planta, siendo el más importante la quina que es un molécula levógira y en segundo lugar la quinidina que es una molécula dextrógira. También se han aislado la cinconina y la chinchonidina y otros derivados quinólicos. La determinación de la estructura química de la quinina, teniendo como núcleo químico fundamental la quinolina, sirvió de base para la síntesis de numerosos grupos de compuestos antimaláricos, de los cuales sigue el más importante la cloroquinina (Bello, C., 1995).

2.8.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La comúnmente conocida Cascarilla o *Cinchona Pubescens* Vahl, perteneciente a la familia de las Rubiaceas, contiene principios activos resultantes de su metabolismo primario y secundario (Cóndor E., 2009).

Mediante un ensayo de tamizaje fotoquímico (Tabla 1) y análisis cualitativo de los metabolitos secundarios según procedimiento de Rondina Coussio (1969) y Miranda (2002), se encontró una alta presencia de alcaloides, (+++), amino grupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (++) en una proporción representativa (Cóndor E., 2009), triptenos y esteroides (+), sesquiterpenos, saponinas, quinonas, antroquinonas o antronoles (+), catequinas (+), flavonoides (+) y saponinas (+), compuestos fenólicos, glicósidos cardiotónicos, aminoácidos libres o aminas en general (Loayza K., 2010).

Los alcaloides son sin duda el principal componente identificado, encontrándose un 6,5% de alcaloides totales (aproximadamente 20) entre los cuales el mayoritario es la quinina que representa el 70-90% del par de diastereoisómeros quinina y el 1 % corresponde a quinidina (McCalley , 2002) junto con sus análogos 6-dimetoxi como cinconina y cinconidina, útiles como antipalúdicos y empleados colectivamente para la totaquina (Aerts, R. J., et al, 1991) y otros alcaloides que contienen un grupo OH en lugar del grupo metoxi, como la cupreína y epiquinina (Figura 4) (Cifuentes M., 2013).



	R1	C-8	C-9	C-3
1a quinina	OMe	β H(S)	α H(R)	α H(R)
1b quinidina	OMe	α H(R)	β H(S)	α H(R)
1c cinconidina	H	β H(S)	α H(R)	α H(R)
1d cinconina	H	α H(R)	β H(S)	α H(R)

Figura 4. Principales alcaloides presentes en la corteza de la Cinchona

Fuente: Córdor E. 2009; Cifuentes M, 2013

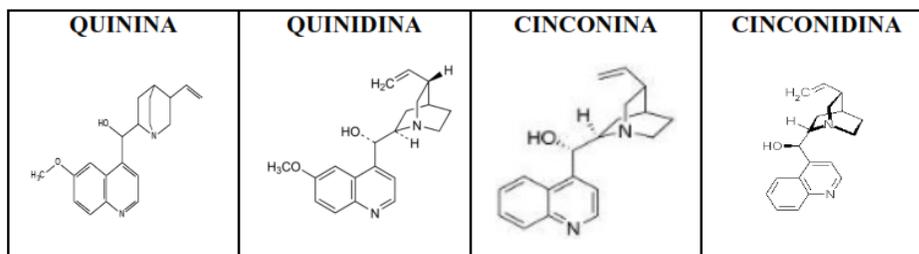


Figura 5. Principales alcaloides presentes en la corteza de la Cinchona

Fuente: Córdor E. 2009; Cifuentes M, 2013

Posee también principios astringentes (taninos proantocianidoles dímeros y trímeros, taninos catéquicos (8%) y otros compuestos como los flavonoides, catequina, kaempferol,

apigenina, y glicósidos así como marcador quercetina y ácidos orgánicos (ácido quinotánico, rojo cincónico), ácidos monoglicosidos como ácido quinóvico (ácido 3 β -hidroxiurs-droxibenzoico) o compuestos terpénicos que intervienen en su amargor y resina (Aerts, R. J., et al, 1991)

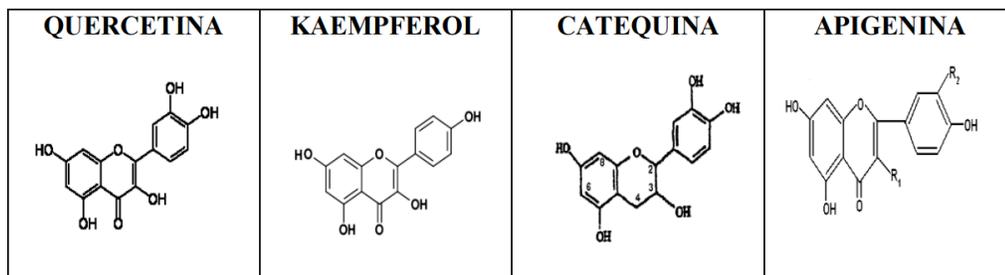


Figura 6. Principales flavonoides presentes en la Quina roja (*Cinchona Pubescens* Vahl)

Fuente: Cifuentes M, 2013

Se han encontrado también siete **antraquinonas** conocidas, alizarina-2-metil-éter, 1,2-anthragallol dimetiléter, purpurina, purpurina-1-metil-éter, 1-hidroxi-2-hydroxymethylantraquinone, 2-hidroxi-1,3,4 trimethoxyantraquinone y 2,5- (o 3,5) dihidroxi 1,3,4 (o -1,2,4) trimethoxyantraquinone, y cinco nuevas antraquinonas, 2-hidroxi-1,3,4,6- (o -1,3,4,7-) tetramethoxyantraquinone, 1,6 (o 1,7-) dihidroxi-2-metilantraquinona, purpurina-5-hidroxi-1-metil-éter, 4,6-(o 4,7) (o-2,6) dimethoxyantraquinone 2,7-dihidroxi y 6,7-dihidroxi-1-metoxi-2-metilantraquinona que han sido aisladas hasta el momento (Wijnsma R., et al, 1986)

En un análisis cuantitativo realizado por Hoet, Gómez y Kanamori (1980) mediante el método de Bruselas – 1948 reveló la presencia de un 0,02% y 0,08% de **aceites**

esenciales en dos muestras de *Cinchona Pubescens* Vahl, colectadas en la Convención (Cusco) y en San Ignacio (Cajamarca) (Condor E., 2009).

Tabla 1. Resultados del tamizaje fotoquímico del extracto de Quina roja (*Cinchona Pubescens* Vahl)

TIPO DE COMPUESTO	PRUEBAS	EXTRACTO DE CORTEZA DE QUINA ROJA (<i>Cinchona pubescens</i>)
Alcaloides	Dragendorff	(+++)
	Mayer	(++)
	Wagner	(+++)
Triterpenos y Esteroides	Lieberman Buchard	(+)
Quinonas	Börntrager	(+)
Catequinas	Catequinas	(+)
Saponinas	Espuma	(+)
Taninos	Cloruro Férrico	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+++)

(+++)
(+) ó (++) cuando la presencia del metabolito secundario es abundante.
(+) ó (++) cuando la presencia del metabolito secundario es poco o escaso.

Fuente: Cifuentes M, 2013

2.8.3 COMPOSICIÓN FARMACOLÓGICA

Cinchona Pubescens Vahl una de las especies perteneciente a la familia de las Rubiaceae, de la que se extrae el alcaloide quinina, uno de los cuatro alcaloides principales encontrados en la corteza del árbol cinchona utilizada por más de tres siglos, es aún el fármaco de escogencia en muchas partes del mundo para el tratamiento de la malaria complicada, severa (Ibarra, R, 2007), para la fiebre y el dolor. Otro alcaloide la quinidina ahora es un estándar de medicamento antiarrítmico y es el origen del sabor amargo en el agua tónica Cifuentes M, 2013).

El gin-tonic se originó en la India colonial británica, cuando la población británica mezclaría su tónico medicinal con la quinina ginebra para que sea más agradable al paladar (Cifuentes M, 2013) y el vino de quina que contiene 2 onzas de corteza de quina, alcohol y vino blanco, que se toma como tónico (De la Vega, M., 1846). El agua tónica es todavía un remedio seguro para calambres en las piernas durante la noche, sin embargo, está muy diluido y generalmente contiene menos de 1 por ciento de la cantidad de quinina que se encuentra en una dosis terapéutica típica (Cifuentes M, 2013)

Los alcaloides le confieren propiedades febrífugas, antipalúdicas y tonificantes de sabor amargo y los taninos catequicos, le dan propiedades fuertemente astringente, en las hidropesías, las hemorragias, los flujos mucosos y la debilidad que sucede a las afecciones tifoideas (Jiménez, M., 1847)

La quina estimula el apetito y facilita la digestión; posee acción estimulante sobre el sistema nervioso, y la respiración, aunque a dosis elevadas ejercen el efecto contrario, debilitando hasta detener totalmente los movimientos respiratorios (Cifuentes M., 2013).

La corteza del tallo de *Cinchona Pubescens* Vahl debe su débil actividad citotóxica a la presencia de ácido quinóico. Este ácido y su 3 - ramnósido se aislaron y caracterizaron través de varios derivados, todos los cuales se ensayaron para determinar su citotoxicidad (Raffauf R. et al, 1977)

Este hallazgo en combinación con la actividad antimicrobiana de las antraquinonas aisladas a partir de callos de *Cinchona pubescens* Vahl, han llevado a la conclusión de que las antraquinonas son fitoalexinas (Wijnsma R et al, 1986).

Esta hierba medicinal que va desde el tratamiento de la malaria, neuralgias, espasmos musculares, fibrilación cardiaca; también encuentra su uso en la industria alimentaria como potenciador del sabor, confiriéndole su característico sabor amargo. Debido a los efectos secundarios de altas dosis de quinina, su concentración se ha limitado por la FDA estadounidense a un máximo de 83 ppm. Este valor es aproximadamente un cuarto del empleado terapéuticamente, aparte de aportar energía, por su contenido en quinina, tiene ciertas propiedades: induce la secreción refleja de las glándulas salivares y gástricas, a la que sigue una vascularización de la mucosa gástrica y cierto grado de actividad de la pared muscular del estómago; de esta forma se refuerza el apetito y la digestión resulta más "rápida y completa", confiriendo propiedades digestivas (Ruiz S., 2012)

2.9 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SU RELACIÓN CON LA COSMÉTICA

2.9.1 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante, es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos y proteínas de ácidos nucleicos. La oxidación de estos sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres, y aquellas especies que sin ser

radicales libres, son lo suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos **(Gómez J., 2000).**

Un radical libre, es cualquier especie, átomo-molécula o ion, que contenga por lo menos un electrón desapareado en su orbital externo y que sea capaz de existir en forma independiente; este estado le permite una mayor capacidad de reacción con otros átomos y moléculas presentes en su entorno normalmente los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, dando lugar a alteraciones en las propiedades estructurales y eventualmente funcionales (Gómez J., 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (EROS o ROS) comprenden a todas aquellas especies reactivas, que siendo o no radicales libres, centran su reactividad en torno al oxígeno, aunque también existen aquellas especies reactivas en torno otras especies como el nitrógeno (RNS) o cloro (Gómez J., 2000).

Los radicales libres como: superóxido, hidroxilo, alcoxi, peroxi, carbonato, óxido nítrico, dióxido nítrico y las especies reactivas no radicales como: peróxido de hidrógeno, hidroperóxido, hipoclorito, oxígeno singulete, ozono y peróxinitrito son las principales especies normalmente generadas en nuestro organismo, como parte del metabolismo de todo ser vivo aerobio (Gómez J., 2000).

Los antioxidantes son un componente fundamental del sistema de protección ya que se encargan de mantener el equilibrio que debe existir en condiciones normales entre la

producción y eliminación de ERO y otros compuestos relacionados con la oxidación como los radicales libres (RL) (Gómez J., 2000).

2.9.1.1 MECANISMOS DE ACCIÓN

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico y en algunos casos revertir el daño oxidativo. El mecanismo más conocido, se debe a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como estabilizadores de diversas especies reactivas, conocido como la actividad scavenger de radicales libres que tienen muchas moléculas antioxidantes. En el caso de los radicales libres consiste en la estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas, este mecanismo definido como SET (single electrón transfer), permite que el radical libre pierda su condición por apareamiento de su electrón desapareado y como consecuencia, el antioxidante se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja reactividad, junto a este mecanismo, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de la transferencia directa de un átomo de hidrógeno, este mecanismo se denomina HAT (hydrogen atom transfer), dejando al radical libre estabilizado. A estos mecanismos pertenecen los antioxidantes no enzimáticos que presentan en su estructura química grupos funcionales hidroxilo fenólicos (polifenoles y tocoferoles), y otros antioxidantes no fenólicos como el glutatión, melatonina, ácido ascórbico, etc. Otros antioxidantes pueden actuar también estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica la adición directa del radical a su estructura, así por ejemplo los carotenoides como β caroteno (Gómez J., 2000).

Algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de EROS y lo hacen inhibiendo ya sea la expresión, la síntesis o la actividad de las enzimas prooxidantes involucradas en la generación de especies reactivas como la NADPH- oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa (XO), etc., este tipo de acción antioxidante no demanda que un antioxidante exhiba en su estructura características que típicamente se asocian a los mecanismos de acción ET o HAT, así por ejemplo existen ciertos polifenoles capaces de inhibir la NOX, la XO, etc.(Gómez J., 2000).

Un segundo mecanismo que también implica la inhibición de la formación de especies reactivas, se relaciona con contraponer la capacidad que tienen ciertos metales de transición como hierro o cobre en estado reducido para catalizar la formación de radicales superóxidos a partir de la reducción de oxígeno y de radicales hidroxilo. Aquellas moléculas que tengan la capacidad de formar complejos quelatos logran inhibir la actividad redox, previniéndose la formación de especies reactivas; se incluyen en este grupo de antioxidantes ciertos péptidos y proteínas como ferritina, ciertos polifenoles cuya característica distintiva es presentar en su estructura flavonoidea un grupo catecol en el anillo β (Gómez J., 2000).

2.9.2 EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PIEL

Bajo ciertas condiciones la velocidad con que se generan las especies reactivas EROS en el organismo, supera la velocidad con la que dichas especies son removidas por los mecanismos de defensa antioxidante, a este desbalance se le denomina Estrés Oxidativo y puede ocurrir en el organismo como resultado de una exacerbada producción de especies

reactivas, aún en presencia de un equilibrado aporte dietario de antioxidantes, una disminuida ingesta de alimentos ricos en antioxidantes o una reducida biosíntesis de alguno de los mecanismos antioxidantes (Clapés S. et al, 2001).

Cuando el estrés oxidativo afecta a sustratos biológicos, el desequilibrio redox se traduce en un daño oxidativo a diversa macromoléculas que aceleran el envejecimiento de muchos tejidos entre ellos de la piel. Pueden dañar el ADN, las membranas lipídicas y las estructuras proteicas, así como también inducir el fotoenvejecimiento al aumentar las metaloproteinasas de la matriz, degradar el colágeno y alterar la elastina (**Chen L., 2012**).

La exposición de la piel al sol es uno de los factores que más significativamente da lugar a la producción de radicales libres de oxígeno y se ha demostrado ampliamente que existe una relación directa entre los procesos de oxidación de las proteínas dérmicas por los rayos UV y el envejecimiento de la piel (Honorato J., 2009) (Figura 4).

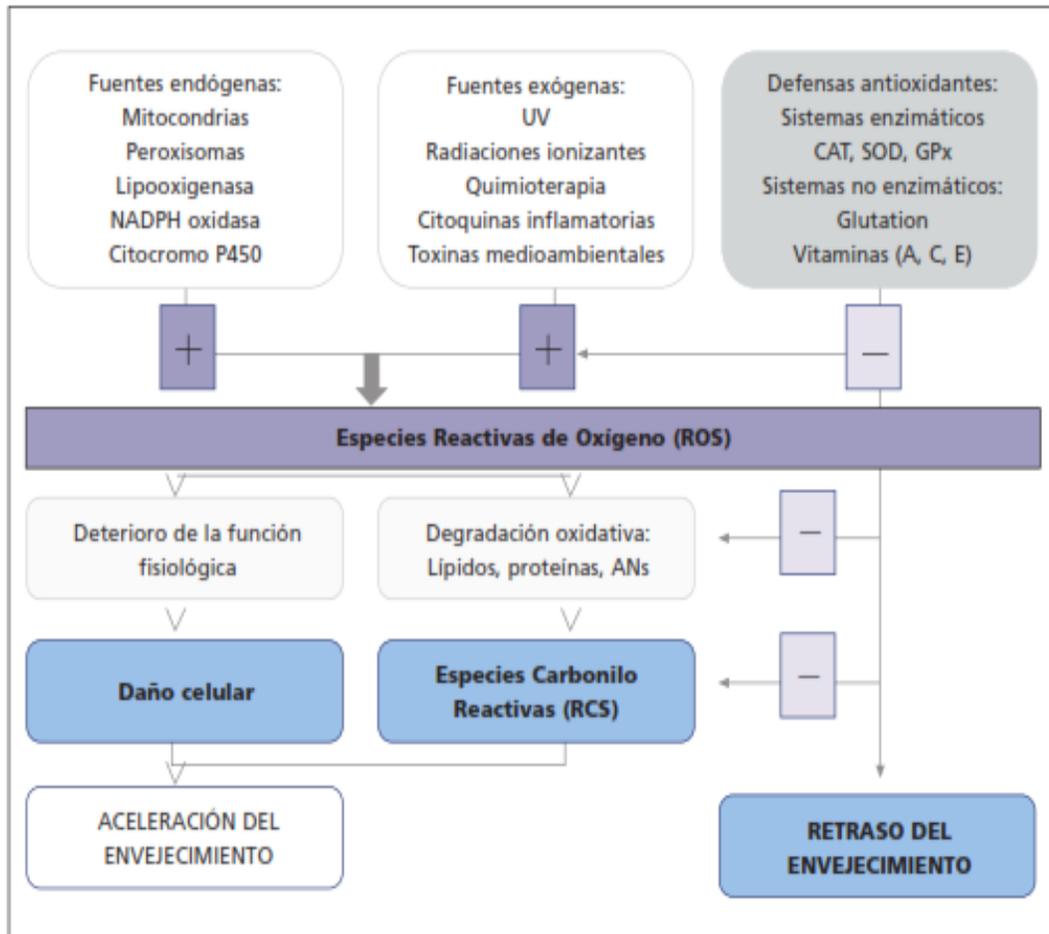


Figura 7. Cadena oxidativa

Fuente: Honorato, J. 2009

Una forma de contrarrestar la oxidación de la piel consiste en aportar antioxidantes de la manera más directa posible. Los antioxidantes más importantes para la piel son las vitaminas A, C y E y el Cinc, que nos protegen del envejecimiento prematuro, retardando la formación de arrugas y reduciendo la formación de cicatrices, ayudan a la piel a defenderse de los radicales libres y protegen la piel, la vitamina A y E protegen la membrana celular del daño ambiental mientras que la vitamina C protege el interior de la célula y el DNA (Paredes F. & Roca J., 2000).

2.9.3 ANTIOXIDANTES MÁS IMPORTANTES PARA LA PIEL

2.9.3.1 VITAMINAS

La vitamina A (beta caroteno), un grupo de quinonas que conforma la vitamina K, la vitamina E cuyo hidroxilo fenólico en el anillo es responsable de la reducción antioxidante, la vitamina C y A se denominan antioxidantes interruptores, porque interrumpen la reacción en cadena de formación de radicales libres (Shite J, 2001) y junto con el glutatión, conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo destructor de estos (Chao JC, et al, 2002).

La vitamina C con una configuración de lactona con grupos hidroxilos asociados al doble enlace, funciona como agente con alto potencial reductor, lo que le permite incluso, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas (Mayer P., 1997). El mecanismo molecular de acción de esta vitamina la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido o de nitrosaminas (Epperly M et al, 2004) además, es el agente que reduce los radicales fenoxilo formados durante la actividad vitamínica E, restableciéndola (Chao JC, 2002), es un co-factor de enzimas críticas en la síntesis de colágeno, así como también inhibe la biosíntesis de elastina para reducir su acumulación, por eso es muy usada en formulaciones antioxidantes, para lo cual debe perder su carga iónica, por ello debe estar en una formulación con pH inferior a 3,5 y en

concentraciones entre el 15% y 25% para que pueda penetrar al estrato córneo (Murray J. et al, 2008).

La vitamina C es un potente antioxidante y estimulante de la síntesis de colágeno, elastina y glucosaminoglucanos. Además, actúa como blanqueador por inhibición de la tirosinasa. Puede utilizarse en alta concentración para aclarar hiperpigmentaciones y mejorar arrugas finas. Se utiliza la solución de vitamina C al 20% con pH 3,0. En forma domiciliaria se continuará con un tratamiento de mantenimiento (Gotlib N, 2015)

2.9.3.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son pigmentos presentes en los vegetales, y son otra forma de proteger al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. y se encuentran dentro del grupo de los fenoles. Los fenoles actúan como antioxidantes en alimentos y cosméticos oxidándose en lugar de la sustancia protegida (Philip S, 1998).

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que debe obtenerlas mediante la alimentación o en forma de suplementos (Martinez S. et al, 2002). Los compuestos más simples son unidades individuales de fenol que se encuentran de forma abundante en las hierbas culinarias, se incluyen el apio (que se encuentra en eneldo y perejil), el carvacol (orégano), etc. que protegen a las plantas del daño por oxidación y realizan la misma función en los humanos (García M, 2014). Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja. Se encuentran también en extractos de plantas como

arándano, ginkgo biloba, cardo, etc. Están 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' (Fig. 8) (Martinez S., 2002).

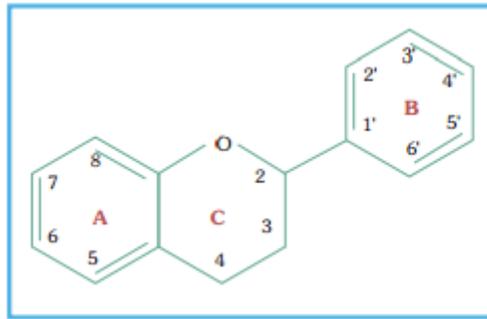


Figura 8. Esqueleto estructural de los flavonoides

Fuente: Gonzalo J. & Alonso M, 2002

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo-OH en posición 3 del anillo C.
Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo-OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
3. Antocianidinas, que tienen unido el grupo-OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

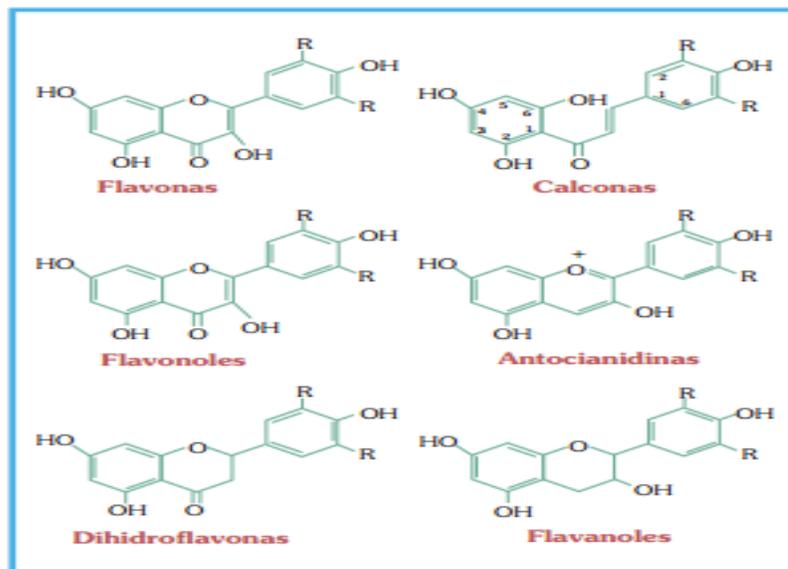


Figura 9. Estructura de los diferentes flavonoides

Fuente: Gonzalo J. &Alonso M, 2002

Tres características estructurales son importantes para su función:

- La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi;
- La presencia de un doble enlace en posición 2,3;
- La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5

La quercitina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (Fig. 10) (Martinez S., 2002).

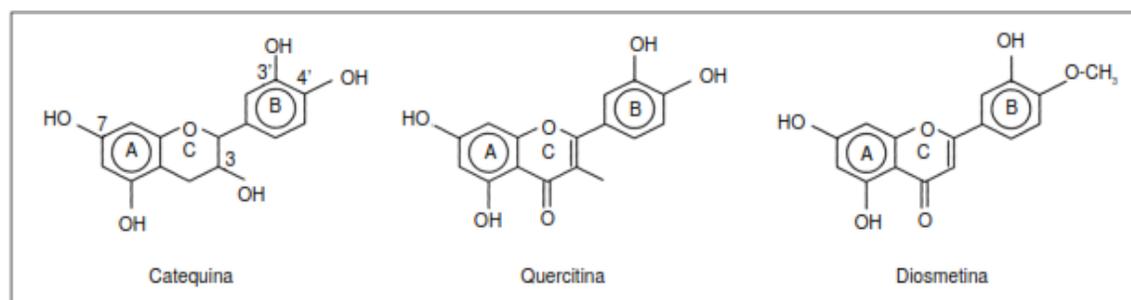


Figura 10: Características estructurales de los principales flavonoides

Fuente: Martinez S., 2002

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico (Martinez S., 2002).

La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Martinez S., 2002).

Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7. Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides. Primero, el radical cargado negativamente no es probable que pase a través de la membrana celular con carga negativa. Segundo, la reacción de los radicales flavonoides con la vitamina E, que es termodinámicamente factible para algunos radicales flavonoides, tiene un obstáculo adicional a causa de la repulsión electrostática entre el anión del radical flavonoide y la membrana fosfolipídica cargada negativamente, donde la vitamina E se incrusta. Tercero, la oxidación de un solo electrón de los flavonoides por cualquier oxidante tendrá una barrera entrópica, porque por lo menos dos protones se intercambian en la reacción. Los protones pueden intercambiarse entre los reactantes o con el solvente en el estado de transición, en este caso, la interface del enlace con hidrógeno debe tenerse en cuenta (Martinez S., 2002).

Su capacidad para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta, sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. Esta capacidad antioxidante se debe a la presencia de estructura O-di hidroxí en el anillo B que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; la doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C y los Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C, estructura que le confiere excelentes propiedades secuestradoras de **RL**, de quelación del hierro y otros metales de transición, así como de la inhibición de oxidasas (Martinez S., 2002).

El flavonoide quercetina encontrado en el té verde tiene una función antioxidante 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C y tiene una hidro solubilidad similar a la de la vitamina E, demostrándose que inhiben la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular (Martinez S. et al., 2002).

La epigallocatequina galato y otras catequinas, también presentes en el té verde son capaces de reducir, en cultivos de células, el radical DPPH y de proteger el DNA genómico del estrés oxidante (Rigano L, 2010) y pueden usarse en productos cosméticos agregados a la fase lipídica para su preservación en la formulación o como ingredientes funcionales (Honorato J., 2009).

La presencia de compuestos fenólicos también puede encontrarse en frutos como el borjón, perteneciente a la Familia de las Rubiaceae, ya que tiene un contenido de polifenoles que oscila entre 600 y 800 mg de ácido gálico/100gr, y gran actividad

antimicrobiana, por lo que puede ser utilizado en la industria agroalimentaria y cosmética (Sotelo D.et al, 2010).

El café perteneciente al género *Coffea* de la familia Rubiaceae, es una de las bebidas más populares en el mundo, debido a su sabor y características sensoriales únicas. Actualmente se conoce que este producto agroalimentario posee una serie de bioactividades, como actividad antioxidante, anticarcinogénica y antimutagénica. Los granos de café verde contienen antioxidantes como ácidos fenólicos, polifenoles y alcaloides; especialmente los ácidos fenólicos elágico, cafeico y clorogénico. El ácido elágico, el cual se encontró en mayor proporción, es un polifenol antioxidante característico de frutas que se conocen por su alta actividad antioxidante como las fresas, frambuesas, arándanos y uvas. Además, este ácido puede inhibir enlaces de ADN de ciertos compuestos cancerígenos, incluidas nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Naranjo M. et al, 2011).

La Cinchona Officinalis y la *Cinchona Pubescens* Vahl pertenecientes también a la familia de las Rubiaceas, exhiben muy buenas propiedades antioxidantes, los compuestos fenólicos de sus extractos ofrecen protección ante el daño oxidativo (Ravishankara M.et al, 2002) y contienen flavonoides como quercetina, apigenina, kaempferol; derivados fenólicos catequinas, flavonoides y alcaloides (Cifuentes M., 2013).

2.9.4 PRODUCTOS COSMÉTICOS ANTIOXIDANTES

El uso de sustancias antioxidantes en cosméticos trae ventajas indiscutibles desde el punto de vista de la formulación y de la eficacia. El conocimiento cada vez más profundo

de los mecanismos moleculares involucrados en muchas situaciones cutáneas, desde el envejecimiento y el foto envejecimiento hasta las patologías, como el vitíligo o el liquen escleroso, evidencia el estrés oxidante causado por radicales libres como un factor importante que provoca la estabilización y la evolución progresiva de estas patologías. Por lo tanto, los tratamientos cosméticos deben estar dirigidos a combatir, de modo puntual, las vías metabólicas desequilibradas que involucran transferencia de electrones y formación de radicales libres (Rigano L, 2010).

2.9.4.1 ANTIARRUGAS

Los productos con importante actividad antioxidante (atrapan e inhiben la generación de radicales libres), mejoran el citoesqueleto celular e inducen la proliferación y activación de fibroblastos senescentes, característicos del foto envejecimiento cutáneo (Lozada & Rueda R., 2010).

El envejecimiento cutáneo es la conjunción de factores intrínsecos (envejecimiento cronológico) y extrínsecos, dentro de estos últimos, la Radiación Ultravioleta (RUV natural o artificial) juega un rol fundamental en el desarrollo del Foto envejecimiento Cutáneo. Los rayos UV B actúan directamente sobre el DNA de las células cutáneas y los UVA dan lugar a la formación de radicales libres oxigenados, inducen la aparición de diversas alteraciones como el engrosamiento epidérmico, queratinocitos con algún grado de atipía, pérdida de polaridad e incremento de la melanogénesis (Lozada & Rueda R., 2010).

En la dermis se observa una desorganización de la red fibrilar con acumulo de fibras elásticas fragmentadas y degeneradas en masas amorfas (elastosis); disminución del colágeno, fibrillas colágenas fragmentadas, fibroblastos senescentes, glicosaminoglicanos (ácido hialurónico y dermatán sulfato) y alteración de los vasos sanguíneos. Sus manifestaciones clínicas son: piel seca rugosa, amarillenta con arrugas profundas, con pérdida de firmeza y de elasticidad de la piel (**Lozada & Rueda R., 2010**).

Entre los productos tópicos más usados para contrarestar estos efectos se encuentran en el mercado:

- Blanqueadores para atenuar el color de las máculas formadas como consecuencia del envejecimiento
- Dermoabrasivos químicos, mediante la aplicación de un ácido débil (pH ácido) o el uso de cristales diminutos bajo presión para eliminar células superficiales, mejorar la textura y reducir máculas
- Técnicas de aparatología como laser, que permite elimina los vasos sanguíneos cercanos a la superficie, incluso las máculas, los lunares y disminuir las arrugas delgadas
- Rellenos dérmicos: Inyecciones de colágeno bovino, ácido hialurónico o hidroxiapatita de calcio que aumentan el espesor de la piel, suavizando arrugas y rellenando surcos (León S., 2010)

Los antioxidantes son una categoría popular de ingredientes para el tratamiento anti-arrugas. Pueden derivarse de recursos naturales o fabricados sintéticamente. Sus criterios

claves de desempeño son los de contrarrestar los radicales libres que pueden hacer mutar las células de la piel. Las fuentes de estos radicales libres son ambientales, como el humo, la exposición al sol o la dieta. El uso de antioxidantes puede mitigar el daño a la piel permitiendo su cura, así como estimulando la producción de nuevo colágeno (Abrutyn E, 2011).

Los antioxidantes pueden ser suministrados como ingredientes solubles en agua o en aceite, aunque los derivados de aceite o solubles en lípidos pueden absorberse más efectivamente en el estrato córneo. Los antioxidantes pueden ayudar en varias funciones, incluyendo: la reducción de las líneas finas y arrugas, apoyando la regeneración de células, la des-pigmentación nocturna de la piel, mitigando los efectos de la psoriasis, sustentando un sistema inmunológico saludable y estimulando la producción de colágeno, los antioxidantes pueden incluir vitaminas como retinilol, esterol, ácido ascórbico, tocoferol, colecalciferol, aminoácidos/péptidos como acetil hexapéptido-22 y decapeptido-6, extractos botánicos, y ácidos carboxílicos, entre una multitud de otros (Abrutyn E, 2011).

2.9.4.2 PROTECTORES SOLARES

Los efectos nocivos de la luz UV es la generación de radicales libre y de sustancias oxidantes que deterioran la piel. Existen varias formas de protección contra la exposición excesiva a la radiación solar. La más efectiva, pero no recomendable, es evitar el sol. Por lo que en los últimos años se han introducido en el mercado productos que actúan como protectores solares, los cuales normalmente se utilizan en las formulaciones de cremas y

lociones que se aplican antes de la exposición al sol. Existen preparaciones que reflejan la luz, las cuales contienen compuestos químicos tales como óxido de zinc u óxido de titanio, que son efectivas pero que normalmente son menos aceptables cosméticamente; su acción se traduce en reflejar tanto las radiaciones UV-A como las UV-B, y finalmente los compuestos orgánicos que actúan como filtros mediante mecanismos a nivel molecular y que disipan la energía lumínica como isoamil metoxicinamato, Octilsalicilato, Octocrileno, Metilantranilato, 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona, Benzofenona 3, etc. pero el dilema se centra en saber si estas sustancias cumplen su función como foto protectores y al mismo tiempo ser lo suficientemente estables a la luz para no generar radicales libres o actuar como sensibilizador en la formación de especies activas oxigenadas. Todo esto significa que el fotoprotector debe disipar la energía que puede producir daños biológicos por lo que es necesario incluir en estas formulaciones moléculas antioxidantes que funcionen como co-activos en la protección de la piel (Vargas, F. et al, 2007).

Entre las sustancias con propiedades antioxidantes destacan algunas vitaminas. Poseen la ventaja de que, al ser productos naturales, tienen más aceptación y no suelen provocar reacciones adversas. Se usan vitaminas del grupo A, es decir, derivadas del ácido retinoico y carotenos. También del grupo C, es decir, ácido ascórbico y sus derivados (Herane M., 2001) y vitaminas del grupo E, es decir, tocoferoles (estos últimos actúan como protectores de la oxidación de las membranas biológicas). Otras sustancias antioxidantes muy usadas son los flavonoides y compuestos con grupos -SH con presunta acción protectora de las proteínas (se usan por su similitud con el glutatión, una molécula orgánica implicada en la cadena de destrucción de radicales libres) (Cuadrado V, 2013).

2.9.4.3 PRODUCTOS PARA DESPUÉS DEL SOL

Los cosméticos para después del sol o “after sun” son productos ideados para corregir o mejorar las condiciones de la piel tras la exposición de la misma, a dosis relativamente elevadas de radiación solar. Sus componentes deben, por lo tanto, poseer propiedades reparadoras, antiinflamatorias, regeneradoras, hidratantes y calmantes. Los principios activos antiinflamatorios deben tratar de paliar los efectos inflamatorios de la luz solar, ayudar a disminuir el eritema y sobre todo el edema posterior a la exposición (Debenedetti, S. 2012).

El activo cosmético antiinflamatorio más importante es el α -bisabolol encontrado en el extracto de manzanilla. También actúan como antiinflamatorios los flavonoides concretamente los presentes en extractos vegetales como el de caléndula, malva, manzanilla o aloe (Matinez S., 2002).

2.10 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS POLIFENOLES

2.10.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de la actividad antioxidantes, pero puede ser útil si se combina con métodos para medir la actividad antioxidante (Villanueva J, 2010).

2.10.2 COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La determinación de los compuestos fenólicos en los extractos son estimados por ensayos espectrofotométricos, basándose en una reacción colorimétrica de oxido-reducción. El agente oxidante utilizado es el reactivo de Folin-Ciocalteu

En esta prueba se mezcla tungstato y molibdato en un medio altamente básico (Na_2CO_3 al 5-10% acuoso).

Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con molibdato formando oxido de molibdeno MoO_3 , este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia de UV/VIS debido a que absorbe a una longitud de onda de 750 nm (Villanueva J, 2010).

2.10.3 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Para identificar flavonoides se utilizan reacciones de coloración, como las que utilizan tricloruro de hierro o de azufre o de aluminio, estas reacciones forman complejos que presentan absorbancias en el espectro ultravioleta por lo que pueden ser identificados mediante la técnica espectrofotométrica UV- visible. Además existen reacciones de color específicas que determinan el tipo de flavonoide al que pertenecen y reacciones de color para comprobar la existencia de sustituyentes en la posición orto (García N, 2007).

El contenido de compuesto fenólico (TPC) se determina como equivalentes de ácido gálico utilizando la ecuación lineal: $A = aC + b$, sobre la base de la curva de calibración donde, A es la absorbancia, y C es equivalentes de ácido gálico.

La prueba se realiza por triplicado y el valor medio se representa.

Este método está relacionado con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción que se produce

Aunque este método no está relacionado con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimar la actividad antioxidante (Cifiuentes M, 2013).

2.11 CROMATOGRAFÍA

Es un sistema analítico que permite separar los diferentes componentes de una muestra problema por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, con el fin de identificarlos y/o cuantificarlos. La fase móvil permite el desplazamiento de los componentes de la mezcla y la fase estacionaria, retiene los componentes de la mezcla. Según el tipo de interacción que se establece entre los componentes de la fase móvil y la fase estacionaria, existen varios tipos de cromatografías (Skoog D. 2008):

- a) Cromatografía por Absorción (Estacionaria = Sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar)

- b) Cromatografía por Partición (Separación por \neq solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, ambas líquidas)
- c) Cromatografía por Intercambio Iónico (Estacionaria= Sólido con grupos funcionales ionizables cuya carga se pueden intercambiar con los iones de la fase móvil)

La cromatografía puede realizarse en: Capa fina, Capa fina de alta eficiencia (HPTLC), Columna, Líquida de alta presión, Gas en Papel

2.11.1. Cromatografía en Capa fina

Es utilizada para separar los componentes puros de una mezcla, de acuerdo con su polaridad. Contiene una capa uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa que puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte, sobre la cual corren las sustancias a separar por medio de un solvente (fase móvil). La fase móvil es líquida y la estacionaria sólida y polar (sílica gel). El eluyente generalmente es menos polar que la fase estacionaria (sílica gel) por tanto, entre más rápido se desplace un componente será menos polar. El valor de referencia depende de las condiciones bajo las cuales se corre la muestra (Absorbente, eluyente, T°, etc.) (Llorens M. 2012).

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil. La fase móvil asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, provocando su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa se saca y se visualiza (Llorens M. 2012).



Figura 11. Cromatografía de Capa Fina

Fuente: Ruiz A, 2006

Se compara el tamaño e intensidad de la mancha de la sustancia problema Vs. Patrones de diferentes concentraciones (Uribe R, 2013).

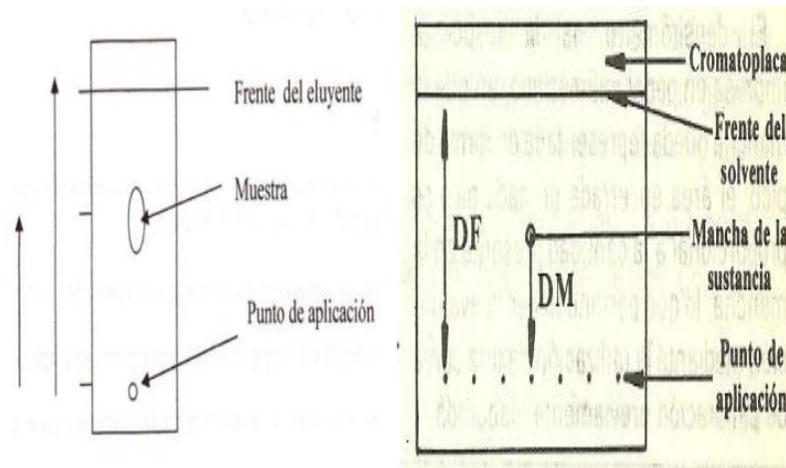


Figura 12. Cromatografía de Capa Fina

Fuente: Uribe R, 2013

El grado de exactitud lo determina el No. de diluciones de los patrones empleados (Uribe R, 2013).

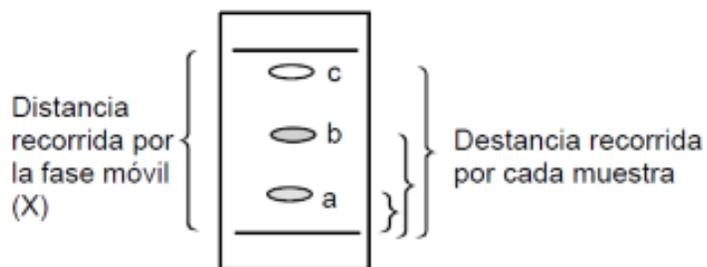


Figura 13. Cromatografía de Capa Fina

Fuente: Uribe R, 2013

El factor de retardo se puede calcular de la siguiente forma:

Ecuación 1: Factor de retardo

Fuente: Uribe R, 2013

$$R_f = \left[\frac{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}{\text{Distancia recorrida por la muestra}} \right]$$

2.12 METODOS DE EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS Y PCL)

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En el análisis *in vitro* se determina la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical (cambio de coloración en función de la concentración), pero este análisis nos da sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* ya que la capacidad antioxidante no viene dada solo por la suma de las

capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto, pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Así diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, etc.) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen las plantas para captar los radicales libres generados (Abad, J. & Cabezas D., 2014)

2.12.1 MÉTODO DEL BARRIDO DE RADICALES LIBRES O METODO DPPH (1, hidrato de 1-difenil-2-picrilhidrazil).

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Willams, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la reacción que se produce es la donación de un hidrógeno RH a DPPH (Castañeda C. et al, 2008) (Fig. 11).

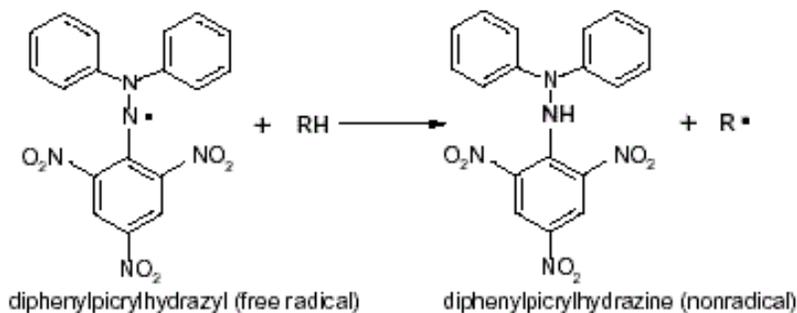


Figura 14. Reducción de reacción de DPPH.

Fuente: Castañeda C., 2008

La absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres. Con los valores de las absorbancias obtenidas se determina el % de captación de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente fórmula (Castañeda C. et al, 2008):

Ecuación 2: Porcentaje de actividad antioxidante

$$\%AA = 100 - \left[\frac{(Am - Ab)}{A \text{ control}} \right]$$

Donde

% AA: Porcentaje de actividad antioxidante

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco

A control: Absorbancia del reactivo DPPH

La relación $(Am - Ab)/A_{control}$ nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra (muestra pura o extracto) (Golfen M. et al, 2008).

Todas las pruebas se realizan utilizando ácido ascórbico como compuesto de referencia, la capacidad para secuestrar el radical DPPH se calcula usando la ecuación señalada. La actividad antioxidante del extracto se expresa como CI_{50} de prueba.

El valor de CI_{50} se define como la concentración (en g/ml) de extracto que inhibe la formación de radicales OH^{\cdot} en un 50% (Das B., 2011).

El radical libre DPPH• posee una absorción característica a 515 nm, la cual decrece significativamente cuando está expuesto a la acción de «barrido» por parte de un extracto rico en compuestos fenólicos antioxidantes- por suministro de átomos de hidrógeno o por donación de electrones. Una disminución en la absorbancia, a 515 nm, indica un alto barrido del radical por parte del extracto. El barrido de los radicales libres es uno de los mecanismos conocidos mediante el cual los antioxidantes inhiben la oxidación de los lípidos (Padilla F. et al, 2008).

Ecuación 3: Porcentaje de inhibición del radical DPPH

$$\% INH = \left[1 - \left(\frac{AA}{AB} \right) \right] \times 100$$

Donde

% *INH*: Porcentaje de inhibición del radical DPPH

AA: Absorbancia del DPPH con el extracto

AB: Absorbancia del DPPH sin el extracto

2.12.2 MÉTODO ABTS (2,2- azinobis-4-etilbenzotiazoline-6-sulfonato)

El método del ABTS se fundamenta en la decoloración del radical catión ABTS⁺ (2,2-azinobis-4-etilbenzotiazoline-6-sulfonato), el radical se genera por adición de un agente oxidante K₂O₈S₂ (2,5 mM). Este radical presenta un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm, en presencia de un agente oxidante se produce una

decoloración del compuesto y por lo tanto la disminución de la absorbancia (Millar y Rice- Evans, 1997).

Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipófila. El radical $ABTS^{\bullet+}$ tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Rea R. et al, 1999).

Ecuación 4: Porcentaje de la capacidad antioxidante ABTS

$$\%INH = 1 - \left(\frac{AA}{AB} \right) \times 100$$

Donde:

%INH: Porcentaje de inhibición de radical ABTS

AA: Absorbancia del ABTS con el extracto

AB: Absorbancia del ABTS sin el extracto

2.12.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FORMAS COSMÉTICAS

2.12.3.1 MÉTODO DE LA FOTOQUIMIOLUMINISCENCIA PCL (PhotoChemiLuminescence)

Los radicales se generan fotoquímicamente, por irradiación UV de un compuesto foto sensibilizador. Estos radicales son parcialmente eliminados de la muestra por reacción con antioxidantes de la muestra. En la unidad de detección de los radicales restantes estos, son cuantificados por la generación de luminiscencia en una reacción química con un producto químico de detección.

Los antioxidantes se cuantifican debido a su efecto inhibitor sobre la generación de la luminiscencia por comparación con un compuesto de normalización (generación de una curva de calibración con Trolox). La capacidad antioxidante se calcula como unidades de equivalentes de Trolox.

La señal del detector es causada por la detección de la luminiscencia y se controla por un tiempo de algunos minutos (100 -180s). Para el análisis de la capacidad antioxidante, la integral de la curva durante un tiempo definido deberá ser calculada automáticamente por un software PCLsoft.

Las muestras deben ser diluidas en el reactivo metanol de manera que la señal detectada este dentro del intervalo de linealidad de la curva de calibración y dentro del rango de detección (Corriente: 0 - 4 V) (Popov L. & Lewin G. 1999).

2.12.4 QUIMIOLUMINISCENCIA

El uso analítico de la quimioluminiscencia (QL) está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos.

Desde hace unos treinta años, el fenómeno de la luminiscencia-originalmente una curiosidad del laboratorio físico, se ha convertido en una rama de la espectrometría aplicada, dentro de la química analítica. Debido a la nueva instrumentación y, especialmente a la incorporación de técnicas modernas, algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, la QL se aplica de forma rutinaria en el análisis tanto cuali- como cuantitativo.

Las grandes aplicaciones analíticas de la QL como método de detección en inyección en flujo, cromatografía líquida (CL) y electroforesis capilar (EC), junto con el gran potencial del inmunoensayo, hacen de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas, que incluyen técnicas de separación en análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico y alimentario, control de calidad, etc.

Las tendencias más actuales en química analítica implican la aplicación de la QL como sistema de detección, combinada con EC como método previo de separación, proporcionando una selectividad y sensibilidad analítica excelentes y permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas.

La QL se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química.

Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. Ambos fenómenos son procesos luminiscentes que se han identificado tradicionalmente mediante un prefijo que identifica la fuente de energía responsable del inicio de la emisión de radiación electromagnética.

Como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción QL, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos.

Una ventaja de las técnicas QL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación.

La QL se describe a menudo como una técnica de “campo oscuro”: la ausencia de niveles altos de luz de fondo, que sí ocurren en espectrofotometría y fluorimetría, reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de QL varía desde sistemas muy simples hasta instrumentación más compleja, pudiéndose usar un fluorímetro simplemente con la fuente de excitación apagada.

No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por QL, como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos,

alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base), y este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en sistemas en flujo, midiendo en periodos de tiempo bien definidos (García A., 2001).

2.12.5 Análisis de antioxidantes hidrosolubles y liposolubles en un sistema con el método PCL

Es un sistema para la cuantificación de antioxidantes en sistemas hidrosolubles y liposolubles. Gracias al método de la fotoquimioluminiscencia se combina el estímulo

fotoquímico de formación radical con la referencia luminométrica sensible.

El método de la quimioluminiscencia fotosensible se caracteriza por ser rápido, exacto, económico y respetuoso con el medio ambiente. Hace posible la investigación de materiales tanto hidrosolubles como liposolubles. El método, a diferencia de otros métodos, no está ligado a un valor de pH determinado ni a la temperatura. El método de medición, fotoquimioluminiscencia, permite una cuantificación del estado antioxidante del organismo y de la dimensión de los daños oxidantes del substrato biológico bajo distintas condiciones patológicas y bajo distintos tipos de terapia relevantes (García A., 2001).

2.12.5.1 Método de análisis

La fotoquimiluminiscencia (PCL), permite la cuantificación tanto de la capacidad antioxidante de las sustancias puras hidrófilos y/o lipófilas, es la medición de la capacidad antioxidante en la fase lipídica (ACL: Antioxidative Capacity in Lipid Soluble Substance) y la fase acuosa (ACW: Antioxidative Capacity in Water Soluble Substance) de matrices complejas de diversos orígenes: sintética, plantas, animales, humana, etc.

Con este método, las propiedades antioxidantes de las sustancias examinadas se pueden determinar de forma rápida y eficaz, lo que limita la pérdida relacionado con la degradación del producto (Lewin, G, 1994).

La metodología se ha basado fotoinducida de luminol, acompañado por una intensa quimioluminiscencia (Lewin, G, 1994). La presencia de antioxidantes inhibe la autooxidación de luminol, debido a la interacción con O_2^- generado fotoquímicamente. Luminol II asume el papel de tanto fotosensibilizador que de reactivo quimioluminiscente. En la presencia de sustancias que actúan como trampas de radicales, la intensidad de la PCL es atenuada como una función de su concentración.

La prueba se puede realizar utilizando dos protocolos diferentes, ACW y ACL, que le permiten destacar la capacidad antioxidante del componente soluble en agua y solubles en grasa, respectivamente. De hecho, en el componente soluble en agua, habitualmente, antioxidantes pertenecientes a las familias de los flavonoides, mientras que en los compuestos solubles tales como tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides y así sucesivamente (Ziosi P. et al, 2010).

Protocolo II ofrece ACL l'utilizzo Trolox® como la norma de referencia, mientras que para l'ACW usando ácido ascórbico, los resultados se expresan, respectivamente, en Trolox y ácido ascórbico equivalentes.

Los antioxidantes se cuantifican sobre la generación de la luminiscencia por comparación con un compuesto de normalización (generación de una curva de calibración con Trolox). La capacidad antioxidante se calcula como unidades de equivalentes de Trolox.

La señal del detector es causada por la detección de la luminiscencia y se controla por un tiempo de algunos minutos (100 -180s) (Popov L & LewinG, 1999).

2.13 FORMULACIONES FITOCOSMÉTICAS

Se puede definir la fitocosmética como el uso de los principios activos de las plantas para cuidado y estética de la piel y el cabello. El uso de unas u otras plantas viene determinado por su actividad fisiológica, que varía de unas plantas a otras, de modo que encontramos plantas para casi todas las necesidades estéticas (Álvarez N. & Bague A., 2012).

Las propiedades cosméticas son muchas y muy variadas: tonificantes, astringentes, detergentes, suavizantes, emolientes, refrescantes etc. Las formas cosméticas de preparación son también numerosas, encontramos formulaciones que utilizan extractos vegetales en cremas, emulsiones, lociones, geles, aceites, jabones, desodorantes, etc. (Álvarez N. & Bague A., 2012)

El uso de productos bioactivos en formulaciones cosméticas no es un hecho reciente, sino que se remonta a épocas muy lejanas. Estas sustancias se consideraron indispensables para la belleza facial y corporal durante los tiempos más remotos (Álvarez N. & Bague A., 2012)

2.13.1 Fito cosméticos

En las últimas décadas se ha incrementado la búsqueda de materias primas que cumplan las expectativas de los consumidores debido a las nuevas tendencias como la “cosmética natural” y la “cosmética orgánica”, esencialmente “fitocosméticos” (Nadinic J, 2009)..

Un fitocosmético es el término que define al producto cosmético (de higiene o tocador) que incluye materias primas de origen vegetal (fitoingredientes) en su formulación con el objetivo de ejercer una acción determinada (Nadinic J, 2009).

Los fitoingredientes son los que aportarán sus propiedades específicas a los fitocosméticos (Nadinic J, 2009).

2.13.1.2 Fito ingrediente

Es cualquier materia prima vegetal que ha sido procesada convenientemente para ser incluida en formulaciones cosméticas y farmacéuticas. Puede provenir de plantas frescas o desecadas, enteras o en partes, extractivos, secreciones, aceites, etc. o puede ser un

producto aislado de las mismas por metodologías especiales, de composición heterogénea.

Hay una lista innumerable de fitoingredientes que son utilizados con propósitos cosméticos, y la Naturaleza es una fuente inagotable de nuevas moléculas que prometen cubrir las expectativas de los consumidores respecto a lo que buscan en un cosmético (Nadinic J, 2009).

2.13.3 Eficacia de Fito ingredientes

Se puede predecir la eficacia de los fitoingredientes y su incidencia en la fórmula de acuerdo a los grupos fitoquímicos mayoritarios presentes en los mismos, los que naturalmente deben ser evaluados por técnicas cromatográficas y espectrofotométricas adecuadas (Nadinic J, 2009).

2.13.4 Grupos fitoquímicos mayoritarios

Los flavonoides son polifenoles y constituyen el grupo más ampliamente distribuido en el Reino Vegetal por lo que son ampliamente estudiados por sus múltiples propiedades terapéuticas y cosméticas (Nadinic J, 2009).

Son conocidos como estimulantes circulatorios, disminuyendo la fragilidad y la permeabilidad de los capilares sanguíneos, reforzando la resistencia de los mismos.

Los flavonoides son atrapadores de radicales libres, tanto en la fase inicial como en la de propagación. En consecuencia, protegen la membrana de la célula y por ende todos los

procesos de la misma, frenando su deterioro, con un efecto antienvjecimiento, proclamado en productos anti-aging (Nadinic J, 2009).

Otro grupo fitoquímico muy aprovechado en cosmética es el de los taninos, las saponinas, entre otros que poseen propiedades humectantes, antimicrobianas, etc. (Nadinic J, 2009).

2.13.5 Definición de cosmético

Se entenderá por producto cosmético toda sustancia o formulación de aplicación local a ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlos en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales Art.1 Decisión 516- Comunidad Andina).

2.13.6 Formas cosméticas

Entendemos por forma cosmética la forma de presentación de un producto concreto, es decir, la morfología del producto en función de los excipientes y aditivos y correctores añadidos. Existen multitud de formas cosméticas diferentes. Entre las más importantes se señala las emulsiones y los geles (Del Pozo A.,2007)

2.13.6.1 Emulsiones

Las emulsiones son sistemas polifásicos constituidos, al menos por un líquido íntimamente disperso en otro en el cual es inmiscible en forma de gotículas, son muy útiles en el campo de la farmacia y formulaciones cosméticas, debido a la afinidad de su estructura con la del cemento intercorneocitario, además de que permiten la incorporación de sustancias hidro y liposolubles, miscibles en el manto epicutáneo, su gran versatilidad en el producto final obtenido pudiendo obtenerse diversos grados de textura, consistencia, extensibilidad y sobre todo buena capacidad de penetración (Del Pozo A.,2007)

2.13.6.2 Geles

Son sistemas dispersos por lo general transparentes o translúcidos formados por líquidos hidrófilos o hidrófobos a los que se adiciona sustancias de naturaleza coloidal capaces de formar una estructura continua, cuya naturaleza y características definen sus propiedades reológicas del conjunto (Juvé J., 2007)

Estos geles son muy apreciados en razón de su ausencia de contenido graso, muy adecuado para aplicar a nivel de cutis graso y seboreico, además de que permiten la vehiculación de los principios funcionales (Juvé J., 2007)

2.14 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD PARA FORMULACIONES COSMÉTICAS

El estudio de la estabilidad de las formulaciones cosméticas: crema y gel, nos indica el grado de su estabilidad relativa en las variadas condiciones a las que pueda estar sujeto desde su fabricación hasta su expiración.

El estudio de la estabilidad de productos cosméticos contribuye a:

- Orientar el desarrollo de la formulación
- Perfeccionar la formulación
- Estimar el plazo de validez del producto
- Monitorear las propiedades organolépticas, físico-químicas y microbiológicas, produciendo información sobre la confiabilidad y seguridad de los productos (Anvisa, 2005).

2.14.1 FACTORES QUE INFLUENCIAN LA ESTABILIDAD

Cada componente, activo o no, puede afectar la estabilidad de un producto. Variables relacionadas a la formulación, al proceso de fabricación, al material de acondicionamiento y a las condiciones ambientales y de transporte pueden influenciar en la estabilidad del producto. Conforme el origen, las alteraciones pueden ser clasificadas como extrínsecas, cuando son determinadas por factores externos; o intrínsecas, cuando son determinadas por factores inherentes a la formulación (Anvisa, 2005).

2.14.1.1 Factores Extrínsecos

Se refieren a factores externos a los cuales el producto está expuesto, tales como:

a) Tiempo

El envejecimiento del producto puede llevar a alteraciones en las características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas y toxicológicas.

b) Temperatura

- Temperaturas elevadas aceleran reacciones físico-químicas y químicas, ocasionando alteraciones en: la actividad de componentes, viscosidad, aspecto, color y olor del producto.
- Bajas temperaturas aceleran posibles alteraciones físicas como turbiedad, precipitación, cristalización.
- Problemas generados, en función de temperaturas elevadas o muy bajas, también pueden ser resultantes de disconformidades en el proceso de fabricación, almacenamiento o transporte del producto.

c) Luz y Oxígeno

- La luz ultravioleta, conjuntamente con el oxígeno, origina la formación de radicales libres y desencadena reacciones de óxido-reducción.
- Los productos sensibles a la acción de la luz deben ser acondicionados en lugares protegidos, en frascos opacos u oscuros y deben ser adicionadas substancias antioxidantes en la formulación, con el propósito de retardar el proceso oxidativo.

d) Humedad

Este factor afecta principalmente las formas cosméticas sólidas como talco, jabón en barra, sombras, sales de baño, entre otras.

Pueden ocurrir alteraciones en el aspecto físico del producto, volviéndolo blando, pegajoso, o modificando su peso o volumen, como también contaminación microbiológica.

e) Microorganismos

Los productos cosméticos más susceptibles a la contaminación son los que presentan agua en su formulación como emulsiones, geles, suspensiones o soluciones.

La utilización de sistemas conservantes adecuados y validados, así como el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación son necesarios para la conservación adecuada de las formulaciones (Anvisa, 2005).

2.14.1.2 Factores Intrínsecos

Son factores relacionados a la propia naturaleza de las formulaciones y sobre todo a la interacción de sus ingredientes entre sí y/o con el material de acondicionamiento.

Resultan en incompatibilidades de naturaleza física o química que pueden, o no, ser visualizadas por el consumidor (Anvisa, 2005).

a) Incompatibilidad Física

Ocurren alteraciones, en el aspecto físico de la formulación, observadas por: precipitación, separación de fases, cristalización, formación de grietas, entre otras.

b) Incompatibilidad Química

Ocurren alteraciones producidas por incompatibilidad entre materias primas o la generación de compuestos que alteran la estabilidad del producto así como sus propiedades físicas

- **pH**

Se deben compatibilizar tres diferentes aspectos relacionados al valor del pH: estabilidad de los ingredientes de la formulación, eficacia y seguridad del producto.

- **Reacciones de Óxido-Reducción**

Ocurren procesos de oxidación o reducción llevando a alteraciones de la actividad de las sustancias activas, de las características organolépticas y físicas de las formulaciones.

- **Reacciones de Hidrólisis**

Sucedan en la presencia del agua, siendo más sensibles las sustancias con funciones éster y amida. Cuanto más elevado es el contenido de agua en la formulación, es más probable que se presente este tipo de reacción.

- **Interacción entre los ingredientes de la formulación**

Son reacciones químicas indeseables que pueden ocurrir entre ingredientes de la formulación anulando o alterando su actividad.

- **Interacción entre ingredientes de la formulación y el material de acondicionamiento**

Son alteraciones químicas que pueden acarrear modificación a nivel físico o químico entre los componentes del material de acondicionamiento y los ingredientes de la formulación (Anvisa, 2005).

2.14.2 ASPECTOS CONSIDERADOS EN LA ESTABILIDAD

- **Físicos:** Deben ser conservadas las propiedades físicas originales como aspecto, color, olor, uniformidad, entre otras;
- **Químicos:** Deben ser mantenidos dentro de los límites especificados para la integridad de la estructura química, el contenido de ingredientes y otros parámetros;
- **Microbiológicos:** Deben ser conservadas las características microbiológicas, conforme los requisitos especificados. El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación y los sistemas conservantes utilizados en la formulación pueden garantizar estas características.

Además de estos aspectos es necesario considerar también el mantener las características del producto en cuanto a la:

- **Funcionalidad:** los atributos del producto deben ser mantenidos sin alteraciones en cuanto al efecto inicial propuesto.
- **Seguridad:** no deben ocurrir alteraciones significativas que influyan en la seguridad de uso del producto (**Anvisa, 2005**).

2.14.3 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN EN LA ESTABILIDAD

Los parámetros a ser evaluados deben ser definidos por el formulador y dependen de las características del producto en estudio y de los ingredientes utilizados en la formulación.

De manera general, se evalúan:

- **Parámetros Organolépticos:** Aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable
- **Parámetros Físico-Químicos:** Valor de pH, viscosidad, densidad, y en algunos casos, el monitoreo de ingredientes de la formulación
- **Parámetros Microbiológicos:** Conteo microbiano, las especificaciones como límite máximo se consideran en referencia a la Secretaria General de la Comunidad Andina según Resolución 1482 (Tabla 2).

Tabla 2. Límites permisibles de microorganismos en cosméticos.

Fuente: Secretaria General de la Comunidad Andina 2012.

ÁREA DE APLICACIÓN Y FASE ETARIA	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Productos para uso en infantes (hasta 3 años) ▪ Productos para uso en área de ojos. ▪ Productos que entran en contacto con las membranas mucosas. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^2 UFC/g ó ml. b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1 g ó ml. c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g ó ml. d. Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g ó ml.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Demás productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^3 UFC/g ó ml. b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1 g ó ml. c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g ó ml. d. Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g ó ml.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Productos a ser utilizados en los órganos genitales externos 	<ul style="list-style-type: none"> a. Ausencia de <i>Candida albicans</i>.

2.14.4 TIPOS DE ESTABILIDAD

Antes de iniciar los Estudios de Estabilidad, se recomienda someter al producto a la prueba de centrifugación. El producto debe permanecer estable y cualquier señal de inestabilidad indica la necesidad de reformulación. Si es aprobado en esta prueba, el producto puede ser sometido a las pruebas de estabilidad.

2.14.4.1 ESTABILIDAD PRELIMINAR

Esta prueba también es conocida como Prueba de Selección o de Corto Plazo, tiene como objetivo auxiliar y orientar en la elección de las formulaciones.

El estudio de estabilidad preliminar consiste en la realización de la prueba en la fase inicial del desarrollo del producto, utilizándose diferentes formulaciones de laboratorio y con duración reducida. Emplea condiciones extremas de temperatura con el objetivo de acelerar posibles reacciones entre sus componentes y el surgimiento de señales que deben ser observadas y analizadas conforme las características específicas de cada tipo de

producto. Debido a las condiciones en que es conducido, este estudio no tiene la finalidad de estimar la vida útil del producto, sino de auxiliar en la selección de las formulaciones (Anvisa, 2005).

Procedimiento para evaluación

La duración del estudio es generalmente de quince días y auxilia en la selección de las formulaciones. Las formulaciones en prueba son sometidas a condiciones de estrés buscando acelerar el surgimiento de posibles señales de inestabilidad (Anvisa, 2005).

Generalmente las muestras son sometidas a calentamiento en estufas, enfriamiento en refrigeradores y a ciclos alternados de enfriamiento y calentamiento.

- Los valores generalmente adoptados para temperaturas elevadas pueden ser:

Estufa: $T = 37 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Estufa: $T = 40 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Estufa: $T = 45 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Estufa: $T = 50 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

- Los valores generalmente adoptados para bajas temperaturas pueden ser:

Nevera: $T = 5 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Congelador: $T = -5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ o $T = -10 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Los valores generalmente adoptados para los ciclos son:

Ciclos de 24 horas a $40 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y 24 horas a $4 \pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ - durante cuatro semanas.

Ciclos de 24 horas a 45 ± 20 °C y 24 horas a -5 ± 20 °C – durante 12 días
(6 ciclos).

Ciclos de 24 horas a 50 ± 20 °C y 24 horas a -5 ± 20 °C – durante 12 días
(6 ciclos).

En este tipo de estudio, las muestras son almacenadas en condiciones distintas de temperatura, alternadas en intervalos regulares de tiempo (Anvisa, 2005).

La periodicidad de evaluación de las muestras puede variar conforme la experiencia técnica, las especificaciones del producto, las características especiales de algún componente de la formulación o el sistema conservante utilizado, sin embargo lo más usual en este estudio preliminar es que sean evaluadas, inicialmente, en tiempo cero y durante todos los días en que estuvieren sometidas a las condiciones de estudio (Anvisa, 2005).

De manera general, los parámetros a evaluar son:

- Características Organolépticas: aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable.
- Características Físico-Químicas: valor de pH, viscosidad y densidad, u otros.

Se debe tomar una muestra de referencia, que en general puede ser mantenida en nevera o a temperatura ambiente, al abrigo de la luz. También, pueden ser también utilizados muestras de mercado, cuya aceptabilidad sea conocida, u otros productos semejantes, considerados satisfactorios en lo referente a los parámetros evaluados (Anvisa, 2005).

2.14.4.2 ESTABILIDAD ACELERADA

También conocida como Estabilidad Normal o Exploratoria tiene como objetivo proporcionar datos para prever la estabilidad del producto, tiempo de vida útil y compatibilidad de la formulación con el material de acondicionamiento.

Emplea generalmente condiciones menos extremas que la prueba anterior. Sirve como auxiliar para la determinación de la estabilidad de la formulación. Es un estudio predictivo que puede ser empleado para estimar el plazo de validez del producto (Anvisa, 2005).

Procedimiento para evaluación

Generalmente tiene una duración de noventa días y las formulaciones en prueba son sometidas a condiciones menos extremas que en la prueba de Estabilidad Preliminar.

En algunos casos, la duración de esta prueba puede ser extendida por seis meses o hasta un año, dependiendo del tipo de producto. Las muestras pueden ser sometidas a calentamiento en estufas, enfriamiento en refrigeradores, exposición a la radiación luminosa y al ambiente.

- Los valores generalmente adoptados para temperaturas elevadas son:

Estufa: $T = 37 \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Estufa: $T = 40 \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Estufa: $T = 45 \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Estufa: $T = 50 \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$

- Los valores generalmente adoptados para bajas temperaturas pueden ser:

Nevera: $T = 5 \pm 20^\circ \text{C}$

Congelador: $T = -5 \pm 20^\circ \text{C}$, o $T = -10 \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$

- Exposición a la Radiación Luminosa

La radiación luminosa puede alterar significativamente el color y el olor del producto y llevar a la degradación de componentes de la formulación. Para la conducción del estudio, la fuente de iluminación puede ser la luz solar captada a través de vitrinas especiales para ese fin o focos que presenten espectro de emisión semejante al del Sol, como los focos de xenón. También son utilizadas fuentes de luz ultravioleta (Anvisa, 2005).

La periodicidad de la evaluación de las muestras puede variar conforme la experiencia técnica, especificaciones del producto, características especiales de algún componente de la formulación o sistema conservante utilizado, sin embargo lo más usual en este estudio acelerado es que sean evaluadas inicialmente en tiempo cero, 24 horas y a los 7, 15, 30, 60 y 90 días (Anvisa, 2005).

De manera general los parámetros a ser evaluados son:

- Características organolépticas: Aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable;
- Características físico-químicas: Valor de pH, viscosidad y densidad, entre otros;
- Características microbiológicas: Conteo microbiano (Anvisa, 2005).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 MATERIAL VEGETAL



Figura 15. *Cinchona Pubescens* Vahl en la Parroquia de Ulloa Provincia de Pichincha

Fuente: Las autoras

3.1.1 RECOLECCIÓN MATERIAL VEGETAL

3.1.1.1 Ubicación

La recolección de la corteza de la Cascarilla “*Cinchona Pubescens Vahl*”, se realizó a 617,09 m de la Estación de bombeo de Petrocomercial “el Corazón”.(Latitud: 0°16'50.5”S. Longitud 78°41'25.5”W). Parroquia de Ulloa Provincia de Pichincha

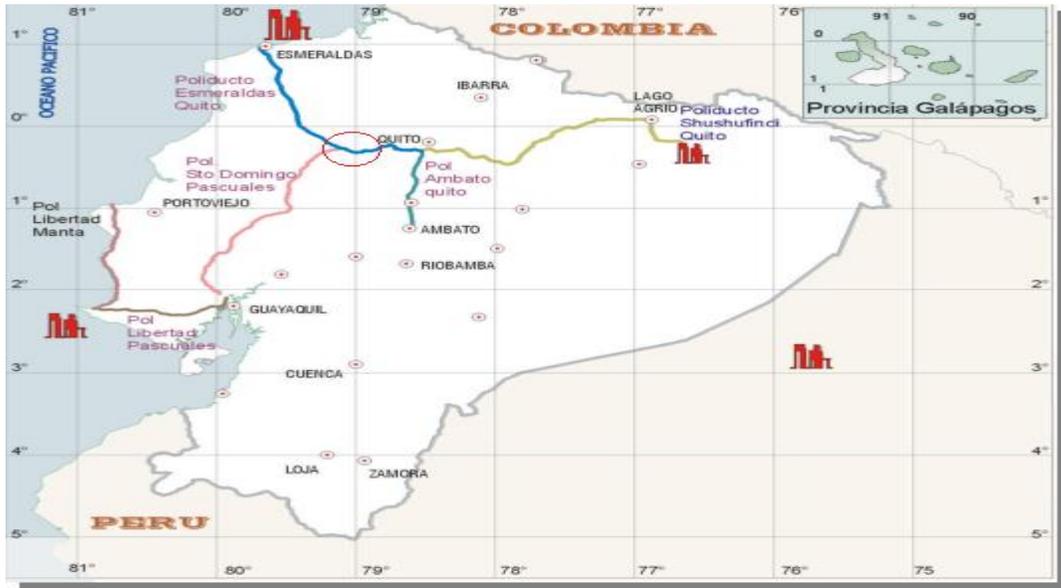


Figura 16 Sector de recolección del material vegetal

Fuente: Estación de bombeo de Petrocomercial “El Corazón”.

Transporte de Derivados a través de poliductos

http://www.eppetroecuador.ec/idc/groups/public/documents/peh_otros/000579.pdf



Figura 17. Estación de bombeo de Petrocomercial “El Corazón”

Fuente: Vivanco J., 2010

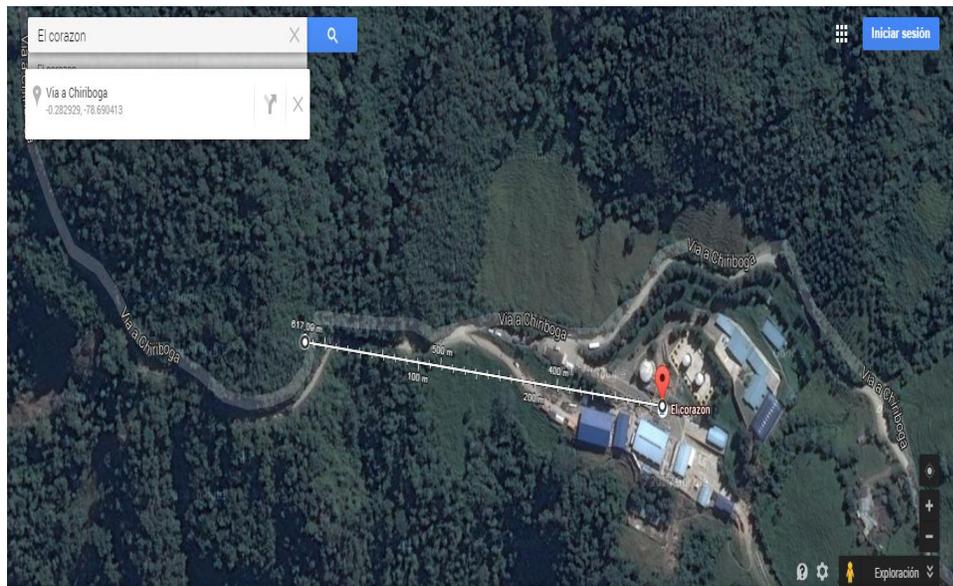


Figura 18. Panorámica Sitio de Recolección

Fuente: <https://www.google.com.ec/maps/>

3.1.1.2 Recolección y Tratamiento del Material Vegetal

A 617.09 m de la estación “Corazón” se realiza la recolección de la Cascarilla “*Cinchona Pubescens* Vahl”, en el mes de febrero del 2014. En este sector el clima es frío característico de Bosque húmedo nublado.

Se recolectan las siguientes muestras:

- Para Herbario: Se toma 3 muestras de la planta que contengan hojas, tallo y flores en buen estado, luego este material es prensado inmediatamente siguiendo la disposición del tallo con sus hojas y flores. Una vez prensadas, se secan, por un periodo de 20 días y luego se coloca una etiqueta identificativa, de acuerdo al procedimiento propuesto por Lorea F. & Riba R. 1990 (Cardiel J., 2014) (Ver Anexo 1) para ser enviada al herbario de la Universidad Católica del Ecuador
- Para la Investigación: Las cascaras del tronco de *Cinchona Pubescens* Vahl se separan del tallo de la planta con ayuda de un machete, se reservan en bolsas de plástico hermético y se transportan para ser procesadas (Anexo 2)



Figura 19. Recolección de Cascarilla “*Cinchona Pubescens* Vahl”

Fuente: Las Autoras

A cada ejemplar obtenido se lo guarda en bolsas de plástico y se cierra la bolsa herméticamente, con el fin de mantener la humedad en su interior



Figura 20. Recolección de Cascarilla” *Cinchona Pubescens Vahl*”

Fuente: Las Autoras

3.1.1.3 Identificación del material vegetal

La identificación del material se realiza en el Herbario Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el botánico Alvaro. J. Perez (Ver Anexo 3)

3.2 PROCESAMIENTO DE LA DROGA

3.2.1. Secado

La cascarilla así obtenida, se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y se lava con agua potable varias veces para eliminar impurezas, insectos, polvo, etc. y lograr la limpieza completa, luego se deja escurrir en un bastidor (Aldana C& Guayasamin P, 2014). Se lleva a una estufa con aire recirculando a 30°C por 4 días hasta que la planta se encuentre completamente seca

3.2.2. Molido

Con la planta completamente seca (verificando que la planta no quede cauchosa) se lleva a un molino tipo tornillo sin fin, hasta obtener un polvo fino que pase por una malla de 500 μ m (Cóndor E, 2009).

3.2.3 Elaboración del Extracto Seco de *Cinchona Pubescens* Vahl y *Camellia sinensis*

a) Equipos, Materiales y Reactivos

Materiales:

- Vasos de precipitación de 300 ml
- Embudos de vidrio de 250ml
- Matraz aforado 50ml
- Varillas de Vidrio
- Soporte universal
- Pinzas de doble nuez
- Recipientes de vidrio de 100ml
- Caja petri
- Espátula
- Papel filtro
- Pipeta 5ml

Equipos:

- Percoladores de 250 ml
- Rotavapor (balón de 500 ml, baño maría, refrigerante) Marca Tecnal, modelo TE-21D.
- Balanza Scout TM Pro ($A \pm 0,2g$)
- Estufa Marca MEMMERT ($A \pm 0,1^{\circ}C$)
- Bomba de vacío Marca QANA Gast Modelo DQA-PF04-AA
- Equipo de filtración al vacío kitasato

Reactivos:

- Té verde (*Camellia sinensis*) Marca Yamamoto Yama. Pomona C.A, lote JFC-104552.
- Cascarilla (*Cinchona Pubescens* Vahl)
- Etanol de 96%
- Agua desionizada

b) Procedimiento

Se realiza el siguiente procedimiento tanto para el material vegetal *Cinchona Pubescens* Vahl así como para *Camellia sinensis* que será usado como referente químico natural (Oh, J., et al 2013), (Anesini, C., et al 2008).

Para la extracción se homogeniza 300 g del material vegetal seco y molido y se divide en 3 porciones de 100 g cada una (Ver anexo 4).

Cada porción de 100 g se humecta con etanol de 96° (un volumen no menor del peso de la droga) y se deja reposar de 30 min a 45 minutos (para que la masa vegetal embeba el menstruo y se hinche) y luego se pasa a 3 percoladores para obtener el extracto por el método de percolación (Miranda M, 1995) (Ver Anexo 5)

Posteriormente, el extracto obtenido se filtra en un matraz kitasato con bomba de vacío para separar el menstruo (Ver Anexo 6)

Luego se retira el solvente empleado en la extracción con un rotavapor (100 rpm, T 50°C) (Ver anexo7), siguiendo el esquema de extracción que se muestra en la Figura 18.

Una vez obtenido el extracto, se concentra en estufa eléctrica a 60°C (Ver Anexo 8)

Una vez que se ha evaporado todo el solvente y la muestra se encuentra completamente seca, se pesa, envasa, almacena en frasco ambar y se colocan en un desecador para evitar su posterior hidratación, tanto para el extracto seco de *Camellia sinensis*, como para el extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl* (Ver anexo 9 y 10)

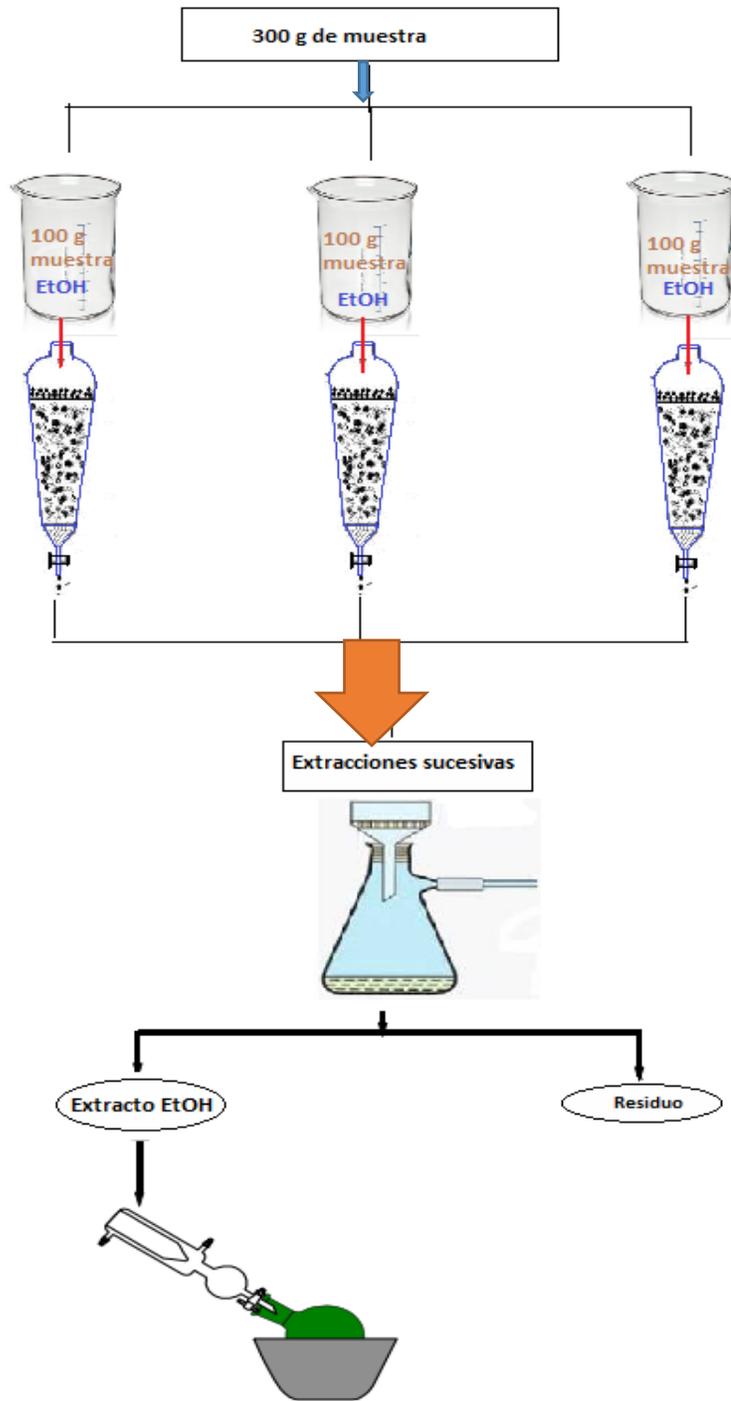


Figura 21. Obtención del extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia sinensis*

Fuente: Las autoras

3.3. DETERMINACIONES QUÍMICAS

3.3.1 Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales en el Extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia sinensis* (Método de Folin-Ciocalteu)

a) Equipos, Materiales y Reactivos

Materiales:

- Matraz erlenmeyer
- Matraz aforado 50ml
- Embudo
- Papel filtro
- Pipeta 5ml
- Frascos de 5 ml
- Micropipeta de 100 μ L (marca: SUMEDIX, modelo: GE758511)
- Celdas de vidrio

Equipos:

- Espectrofotómetro, marca Shimadzu modelo: UV mini 1240

Reactivos:

- Extracto seco de *Camellia sinensis*
- Extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl*
- Tungstato de sodio dihidratado
- Ácido Fosmolibdico
- Carbonato de sodio deshidratado

- Ácido gálico

b) Procedimiento

Se realiza el siguiente procedimiento para el extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl y para el extracto seco de *Camellia sinensis* que será usado como referente químico natural (Oh J., et al 2013) (Anesini C., et al 2008).

3.3.1.1 Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu

Se disuelven 10g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosmolíbico y 5 ml de ácido fosfórico al 85% en 75 ml de agua destilada. Se refluja la solución así formada por 2 horas y después se completa con 100 ml de agua.

3.3.1.2 Preparación para la Curva de Calibración

A partir de una solución madre de 2000 ppm de ácido gálico se prepararon soluciones etanólicas de 100, 250, 500 y 1000 ppm para la curva de calibración.

- Preparación del Blanco: 4 ml de agua destilada más 0,25 ml de Reactivo de **Folin Ciocalteu**, se deja en reposo 2 minutos, se agrega 0,75 ml de Na_2CO_3 al 20%, se deja en reposo en un lugar oscuro y a temperatura ambiente por 2 horas, luego se lleva al espectrofotómetro para medir la absorbancia a 765 nm.
- Preparación del estándar: Se toman 0,05 ml de las soluciones de ácido gálico preparadas (100, 250, 500 y 1000 ppm), se agregan 3,95 ml de agua destilada más 0,25 ml de reactivo de **Folin Ciocalteu**, se deja en reposo 2 minutos, se agrega 0,75 ml de

Na₂CO₃ al 20%, se deja en reposo en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 2 horas y luego se lleva al espectrofotómetro para medir la absorbancia a 765 nm.

- Preparación de la muestra con *Cinchona Pubescens* Vahl: Se toman 0,25 ml de la solución que contiene el extracto seco (0,1 g en 100 ml de etanol) más 3,75 ml de agua destilada, más 0,25 ml de reactivo de **Folin Ciocalteu**, se deja en reposo 2 minutos, se agrega 0,75 ml de Na₂CO₃ al 20%, se deja en reposo en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 2 horas y luego se lleva al espectrofotómetro para medir la absorbancia a 765 nm.
- Preparación de la muestra con *Camellia sinensis* (referente químico natural): Se toman 0,25 ml de la solución que contiene el extracto seco (0,2 g en 100 ml de etanol) más 3,75 ml de Agua destilada, más 0,25 ml de Reactivo de **Folin Ciocalteu**, se deja en reposo 2 minutos y se agrega 0,75 ml de Na₂CO₃ al 20%, se deja en reposo nuevamente en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 2 horas y luego se lleva al espectrofotómetro para medir la absorbancia a 765 nm

El cálculo de fenoles totales se realiza mediante la ecuación generada por regresión lineal de la curva de calibración (Tabla 3).

Tabla 3. Método de Folin Ciocalteu

Fuente: Las autoras

Soluciones Curva de Calibración	Agua Destilada	Reactivo de Folin Ciocalteu	Na₂CO₃ al 20%	Solución Acido Gálico	Solución extracto	Volumen Total
Blanco	4,00 ml	0,25 ml	0,75 ml	---	---	5,00 ml
Estándar	3,95 ml	0,25 ml	0,75 ml	0,05 ml	---	5,00 ml
Muestra <i>Cinchona Pubescens Vahl</i> (0,1g/100ml)	3,75 ml	0,25 ml	0,75 ml	---	0,25 ml	5,00 ml
Muestra <i>Camellia Sinensis</i> (0,2g/100 ml)	3,75 ml	0,25 ml	0,75 ml	---	0,25 ml	5,00 ml

3.3.2 Cuantificación de Flavonoides Totales en el Extracto de *Cinchona Pubescens*

Vahl y *Camellia sinensis*

a) Equipos, Reactivos y Materiales

Materiales

- Frascos ámbar de 5 mL y 10 mL
- Celdas de vidrio
- Pipeta de 5 mL, marca Brinkman
- Micropipeta de 100 µL marca SUMEDIX y puntas
- Papel aluminio

Equipos:

- Espectrofotómetro, marca Shimadzu modelo: UV mini 1240

Reactivos

- Hiperósido
- Etanol al 96%,
- Acetato de potasio
- Cloruro de aluminio
- Agua destilada
- Extracto seco de *Camellia sinensis*
- Extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl

b) Procedimiento

Se realiza el siguiente procedimiento para el extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl y el extracto seco de *Camellia sinensis* que será usado como referente químico natural (Oh, J., et al 2013) (Anesini, C., et al 2008).

- Se preparan diluciones de hiperósido con etanol al 96% a partir de una solución madre (1000 ppm) en frascos ambar de 5 ml con etanol (200, 500 y 700 ppm).

3.3.2.1 Preparación de la curva de Calibración

- Blanco: 500 µl de etanol
- Preparación del estándar: 0,5 ml de soluciones de hiperósido, se adiciona 2,8 ml de agua destilada, 1,5 ml de etanol al 95%, 0,1 ml de acetato de potasio y 0,1 ml de cloruro de aluminio al 10%, se deja en reposo durante 30 minutos y se realizan las lecturas en el espectrofotómetro a 415 nm. Se genera una curva de calibración.

- Preparación de la muestra con *Cinchona Pubescens* Vahl: 0,5 ml de Extracto (0,1g /100 ml) con 2,8 ml de agua destilada con 1,5 ml de etanol al 95%, con 0,1 ml de acetato de potasio y 0,1 ml de cloruro de aluminio al 10%, se deja en reposo durante 30 minutos y se realizan las lecturas en el espectrofotómetro a 415 nm. Se genera una curva de calibración.
- Preparación de la muestra con *Camellia sinensis* (referente químico natural): Se toman 0,5 ml de extracto de *Camellia sinensis* (0,2 g /100 ml) con 2,8 ml de agua destilada con 1,5 ml de etanol al 95%, con 0,1 ml de acetato de potasio y 0,1 ml de cloruro de aluminio al 10%, se deja en reposo durante 30 minutos y se realizan las lecturas en el espectrofotómetro a 415 nm.
- Se genera una curva de calibración (Ver anexo)

Tabla 4. Método de Flavonoides Totales

Fuente: Las autoras

# Frasco	Hiperosído (muestra)	Agua destilada	Etanol al 96%	Acetato de potasio	Cloruro de aluminio al 10%
Blanco	-	2.8mL	2ml	0.1ml	0.1ml
St ₁	0.5mL	2.8mL	1.5ml	0.1mL	0.1ml
St ₂	0.5mL	2.8mL	1.5ml	0.1mL	0.1mL
St ₃	0.5mL	2.8mL	1.5ml	0.1mL	0.1mL
Muestra <i>Cinchona. Pubescens</i> Vahl	0.5mL	2.8mL	1.5mL	0.1mL	0.1mL
Muestra <i>Camellia Sinensis</i>	0.5mL	2.8mL	1.5mL	0.1mL	0.1mL

3.3.3 Separación e Identificación de los flavonoides en el Extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* por cromatografía en Capa Fina (TLC)

a) Equipo, materiales y reactivos

Materiales

- Placas de silica gel cromatográficas 10 x 10 cm
- Papel aluminio,
- Cubeta para cromatografía 10 x10cm

Equipos

- Nebulizador (Marca Fisher Cientific)
- Ultrasonido (Marca: Branson, modelo 1510R-MTH)
- Cromatógrafo (marca: CAMAG, modelo Linomat 5)

Reactivos:

- Extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl*
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Acetato de etilo
- Agua destilada
- Etanol de 96%
- Solución de DPPH
- Cloruro de aluminio

b) Procedimiento

- Colocar 20 μL del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl en un frasco ámbar de 5 mL y 980 μL de metanol. Se deja en el ultrasonido por 5 minutos
- Fase móvil: Mezclar acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua en proporciones 100:11.11.27
- Preparar 20 μL de solución de DPPH al 0,5% en etanol al 96%
- Preparar 50 μL de solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol al 96%
- Tomar 20 μL de la solución metanólica con el capilar y se coloca en el cromatógrafo para imprimir las muestras.
- Colocar la fase móvil en la cubeta para cromatografía y se pone la placa de sílica gel.
- Dejar reposar en una sorbona hasta que el solvente casi alcance el final de la placa cromatográfica
- Se retira la placa y se deja secar
- Tapar un lado de la placa cromatográfica con papel aluminio y se rocía la otra en solución de cloruro de aluminio usando el nebulizador.
- Se deja secar y se cubre con papel aluminio mientras se descubre el lado cubierto al principio.
- Se rocía el otro lado con la solución de DPPH y se fotografía la placa inmediatamente identificando las fracciones que se formen más transparentes.
- Se deja secar la placa y se la lleva a la cámara de luz UV para observar la separación de las manchas que se pudieron apreciar donde se roció el cloruro de aluminio (Ver Fig 10 y Ec. 1)

3.3.4 Actividad Antioxidante del Extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia sinensis*

3.3.4.1 Evaluación de la Capacidad Antioxidante del Extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia sinensis* por el método de DPPH

a) Equipos, Materiales y Reactivos

Materiales

- Balón aforado de 10mL
- Balón aforado de 100mL
- Micro pipeta de 1 a 3000 μ L (marca DROPTTEK, modelo DX40253) con varias puntas,
- Frascos ámbar de 5 mL, 10 mL y 250 mL
- Espátula, papel aluminio
- Celdas de vidrio

Equipos

- Espectrofotómetro, marca Shimadzu modelo: UV mini 1240
- Balanza analítica; marca Meter Toledo, modelo: ML204/01

Reactivos

- Solución de DPPH
- Agua bidestilada,

- Ácido Ascórbico
- $K_2S_2O_8$
- Etanol 96%
- Extracto seco de *Camellia sinensis*
- Extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl*

b) Procedimiento

Preparación de la solución de DPPH:

- Preparamos una solución de 1×10^{-4} M de DPPH de en etanol al 96% (Se pesan 9,85 mg de DPPH y se afora a 250 mL con alcohol en la oscuridad), colocamos en un frasco ámbar y mantener en refrigeración hasta realizar el ensayo

Preparación del estándar:

- A partir de una solución de 400 ppm de ácido ascórbico, se preparan soluciones de 0,10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ L
- A cada solución de ácido ascórbico se le agregan 2,9 mL de DPPH, para ajustar a un volumen final de 3 mL

Preparación de las muestras con extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia sinensis*

Se realiza el siguiente procedimiento para el extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* y para *Camellia sinensis* (referente químico natural)

- Se pesan por separado 0,1g de extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* y 0,2 g de *Camellia sinensis*, se añaden etanol al 96% para disolver y aforar a 25 mL en un

balón volumétrico. Se preparan soluciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μL , añadiendo a cada muestra 2,9 mL de DPPH para ajustar a un volumen final de 3 mL.

- Se colocan las muestras en frascos de color ámbar y se llevan a agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.

c) Curva de Calibración

- Se programa el espectrofotómetro a 517 nm y se encera con etanol de 96%,
- Se mide las absorbancias del blanco y los demás
- Se calcula el porcentaje de inhibición y se construye una gráfica de % de inhibición versus la concentración ya que la actividad antioxidante se expresará como una concentración IC_{50} en $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se requiere para el 50% de inhibición de la formulación del radical DPPH (Ver Ec. 3)

Tabla 5. Método DPPH, Curva de Calibración

Fuente: Las autoras

# Frasco	Acido Ascórbico (μL)	DPPH (ml)	Etanol (μL)
Blanco	0	2.9	100
St ₁	10	2.9	90
St ₂	20	2.9	80
St ₃	40	2.9	60
St ₄	60	2.9	40
St ₅	80	2.9	20
St ₆	100	2.9	0

3.3.4.2 Evaluación de la Capacidad Antioxidante del Extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl y *Camellia sinensis* por el método de ABTS.

a) Equipos, materiales y reactivos

Materiales:

- Cubeta,
- Espátula,
- Micropipetas de 10 a 1000 μ L (marca: DROPTTEK; modelo: DX40253)

Equipos:

- Espectrofotómetro, marca Shimadzu modelo: UV mini 1240 y celdas de vidrio.

Reactivos:

- Solución ABTS
- Agua bidestilada
- $K_2S_2O_8$
- Etanol de 96%
- Extracto seco de *Camellia sinensis*
- Extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl

b) Procedimiento

Preparación de la solución de ABTS

Se disuelven 0,0275 g (27,5 mg) de ABTS en 25 mL de etanol, la solución formada debe ser azulada y mantenerse estable por 48 horas.

Preparación de la solución de $K_2S_2O_8$

Se prepara una solución 70mM de $K_2S_2O_8$ obtenida disolviendo 188,2 mg de $K_2S_2O_8$ en 10 mL de agua bidestilada.

Preparación del ABTS radicalizado

A la solución de ABTS radicalar añadimos 250 μ L de solución de $K_2S_2O_8$, se agita y conserva en la oscuridad por 6 horas para permitir la radicalización. La solución debe ser estable por 2 días y permanecer azulada

Preparación de las soluciones

Blanco: Se toma 100 μ L de etanol al 96% con 2,9 mL de ABTS

Soluciones con extracto de *Camellia sinensis* (0,2 g/100 ml), referencial: Preparar soluciones de 3, 5,10, 20,50 y 100 μ L de extracto con 2,9 mL de ABTS y completar a 3 mL con etanol al 96%.

Soluciones con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl (01g/100ml): Preperar soluciones de 2, 5,10, 20,50 y 100 μ L de extracto con 2,9 mL de ABTS y completar a 3 mL con etanol al 96%.

Preparación de ABTS para lecturas espectrofotométricas

Se toman 2 mL de ABTS radicalizado y se añade aproximadamente 25 mL de etanol o hasta obtener una absorbancia de $A_{734nm} = 0,70 \pm 0,02$.

Se calcula el porcentaje de la capacidad antioxidante (Ver Ec. 4)

3.3.4.3 Evaluación de la Capacidad Antioxidante del Extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl por el método de DPPH en Capa Fina (TLC)

a) Equipo, materiales y reactivos

Materiales:

- Capilares,
- Frasco âmbar de 5 mL,
- Pipetas,
- Papel aluminio
- Placas cromatográficas de sílica gel
- Cubeta para cromatografía 10 x10cm

Equipos:

- Cámara de Luz UV 254-366nm
- Nebulizador, Bomba de aire
- Ultrasonido (Marca: Branson, modelo 1510R-MTH)
- Cromatógrafo (marca: CAMAG, modelo Linomat 5)
- Balanza analítica (marca: Mettler Toledo, modelo: ML2014/01)

Reactivos:

- Extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Acetato de etilo

- Agua destilada,
- Etanol de 96%
- Cloruro de aluminio
- Solución DPPH

b) **Procedimiento**

- Se coloca 20 ul del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl en un frasco ámbar de 5 mL con 980 ul de metanol. Se deja en el ultrasonido por 5 minutos
- Se realiza una mezcla entre acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua en porciones 100:11:11:27 para la fase móvil
- Se prepara una solución de DPPH al 0,5% en etanol al 96%
- Se prepara una solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol
- Se toman 20 uL de la solución metanólica y se coloca en el capilar y se lleva al cromatógrafo para imprimir las muestras
- Colocar la fase móvil en la cubeta cromatográfica y se coloca la placa de sílica gel.
- Dejar en reposo en una Sorbona hasta que el solvente casi alcance el final de la placa cromatográfica
- Retirar la placa y se deja secar
- Se tapa un lado de la placa cromatográfica con papel aluminio y se rocía la otra en solución de cloruro de aluminio usando el nebulizador.
- Se deja secar y se cubre con papel aluminio mientras se descubre el lado cubierto al principio

- Rociar el otro lado con la solución de DPPH y se toman fotografías de la placa inmediatamente identificando las fracciones que se tornen amarillas.

3.4 FORMULACIONES FITOCOSMÉTICAS CON EXTRACTO DE *Cinchona Pubescens Vahl*.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto seco de *Cinchona pubescens* Vahl (Cascarilla), en una formulación cosmética, se preparara un referente químico natural de actividad antioxidante (*Camellia sinensis*) y dos tipos de formulaciones Emulsión O/A y Gel, debido a que estas son 2 de las formulaciones mas convencionales existentes en el mercado que permiten el transporte del activo hacia la piel (hidrofílico-lipofílico)

1. Una Crema (emulsión aceite en agua O/A): Se preparara una emulsión base típica que no contenga principios funcionales y otras con extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl* al 0.5%, 0.75% y 1% como único principio funcional
2. Un gel base típico que no contenga principios funcionales y otros con extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* al 0,25%, 0,5% y 0,75 % como único principio funcional
3. Emulsión y gel típicos a base de extracto de *Camellia sinensis* al 0.5% como referencial para comparaciones de capacidad antioxidante como único principio funcional

Se realiza una verificación de la solubilidad del extracto seco de *Cinchona Pubescens Vahl* con propilenglicol como solvente no irritante y de naturaleza afin al extracto, asi como la verificación de la consistencia adecuada para considerar al producto

formulado como una emulsión semi sólida con 3 de los emulsionantes más comunes en el mercado: Polawax, alcohol cetílico y Brij S2, mismos que se encuentran elaborados para desarrollar emulsiones de tipo aceite en agua en un porcentaje determinado y el resto de los excipientes de la formulación como vehículos para transporte de activos (agua), preservantes de denotada actividad microbiana ya regulados por los listados internacionales para productos cosméticos permitidos (mezcla de parabenos), según lo establece el artículo 3 de la Decisión 516-Armonización en legislación de productos cosméticos

3.4.1 Formulación tipo crema (Emulsión aceite en agua O/A)

a) Materiales, equipos y reactivos

Materiales

- Papel aluminio,
- Pipetas volumétricas 10, 20 y 50ml
- Vasos de precipitación 250, 500 y 1000ml
- Termómetro (Marca Hanna de -10 a 100°C)
- Recipientes de acero inoxidable de 2l

Equipos

- Estufa Marca Memmert
- Agitador de hélice (Marca Stirrer DLH, modelo VELP Scientifica)
- Potenciómetro (Marca Oakion, PC 700)
- Balanza analítica (marca Meter Toledo, modelo: ML204/01)

Reactivos

- Cetylstearyl Alcohol (and) Polysorbate 60
- Cetyl Alcohol
- Steareth-20
- Mineral oil
- Aqua
- Propylene-glycol
- *Camellia sinensis* leaf Extract
- Dimethicone
- Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben

b) Procedimiento

- Se disuelve en un solo recipiente los ingredientes que constituyen la fase oleosa calentándola hasta 70°C y luego se mezclan a la misma temperatura con la mezcla que contiene la fase acuosa, se agita hasta la temperatura de 40°C, se agrega el extraco de *Cinchona Pubescens* Vahl previamente disuelto en Propylene-glycol, finalmente se agrega el preservante y la silicona (Tabla 6).
Este procedimiento se realiza de igual foema para el referente quimico natural *Camellia sinensis* al 0.5% (Tabla 5).
- Se mide el pH, del producto obtenido

Tabla 6. Formulación de la emulsión al 0.5% con extracto seco de *Camellia Sinensis*
Fuente: Las autoras

Ingredientes INCI*	Ingredientes Nombre Tradicional	Función	% de uso en formula
Cetylstearyl Alcohol (and) Polysorbate 60	Polawax	Emulsificante	8,00
Cetyl Alcohol	Alcohol cetílico	Emulsificante	3,00
Steareth-20	Brij S2	Estabilizante	3,00
Mineral oil	Aceite de Vaselina	Agente Humectante	20,00
Aqua	Agua destilada	Vehículo	c.s.p.
Propylene-glycol	Propilenglicol	Solubilizante	5,00
Camellia sinensis leaf Extract	Extracto de Té Verde	Antioxidante	0,5
Dimethicone	Dimeticona	Factor de consistencia	0,5
Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben	Phenova	Conservante	0,8

* International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (Tomado de CosIng- Cosmetic ingredient database)

Tabla 7. Formulación de la emulsión al 0.5%, 0.75% y 1% con extracto seco de
Cinchona Pubescens Vahl

Fuente: Las autoras

Ingredientes INCI*	Función	PORCENTAJE		
		0.5% (Ext. Cinchona Pubescens Vahl)	0.75% (Ext. Cinchona Pubescens Vahl)	1% (Ext. Cinchona Pubescens Vahl)
Cetylstearyl Alcohol (and) Polysorbate 60	Emulsificante	8,00	8,00	8,00
Cetyl Alcohol	Emulsificante	3,00	3,00	3,00
Steareth-20	Estabilizante	3,00	3,00	3,00
Mineral oil	Agente Humectante	20,00	20,00	20,00
Aqua	Vehículo	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
Propylene-glycol	Solubilizante	5,00	10,00	15,0
Chinchona pubescens Vahl Bark extract	Antioxidante	0,5	0,75	1

Dimethicone	Factor de consistencia	0,5	0,5	0,5
Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben	Conservante	0,8	0,8	0,8

* International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (Tomado de CosIng-Cosmetic ingredient database)

3.4.2 Formulación Gel

a) Equipos Materiales y Reactivos

Materiales:

- Papel aluminio,
- Pipetas volumétricas,
- Vasos de precipitación

Equipos:

- Potenciómetro (Marca Oakion, PC 700)
- Balanza analítica; marca Meter Toledo, modelo: ML204/01

Reactivos:

- Acrylates Copolymer
- Triethanolamine
- Aqua
- Propylene-glycol
- *Camellia Sinensis* leaf Extract
- Dimethicone
- Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben

b) Procedimiento

- Se disuelve primero el carbopol en el agua, se agita hasta tener una solución homogénea, se agrega la TEA (Triethanolamine), el extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl previamente disuelto en Propylene-glycol, finalmente se agrega el preservante y la silicona (Tabla 8).

Este procedimiento se realiza de igual foema para el referente químico natural *Camellia sinensis* al 0.5% (Tabla 7).

- Se mide el pH, del producto obtenido

Tabla 8. Formulación del Gel al 0.5%, con extracto seco de *Camellia Sinensis*

Fuente: Las autoras

Ingredientes INCI	Ingredientes Nombre Tradicional	FUNCIÓN	PORCENTAJE 0.5% (Ext. <i>Camellia Sinensis</i>)
Acrylates Copolymer	Carbopol	Agente viscosante	20,00
Triethanolamine	Trietanolamina	Agente estabilizador de pH	1,00
Aqua	Agua destilada	Vehículo	c.s.p.
Propylene-glycol	Propilenglicol	Solubilizante	5,00
<i>Camellia Sinensis</i> leaf Extract	Extracto de Té Verde	Antioxidante	0,5
Dimethicone	Dimeticona	Factor de consistencia	0,5
Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben	Phenova	Conservante	0,8

Tabla 9. Formulación del Gel al 0,25%, 0,5% y 0,75% con extracto seco de *Cinchona*

Pubescens Vahl

Fuente: Las autoras

Ingredientes INCI	Función	PORCENTAJE		
		0,25% (Ext. <i>Cinchona</i> <i>Pubescens Vahl</i>)	0,5% (Ext. <i>Cinchona</i> <i>Pubescens Vahl</i>)	0,75% (Ext. <i>Cinchona</i> <i>Pubescens Vahl</i>)
Acrylates Copolymer	Agente viscosante	20,00	20,00	20,00
Triethanolamine	Agente estabilizador de pH	1,00	1,00	1,00
Aqua	Vehículo	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
Propylene-glycol	Solubilizante	5,00	7,00	10,00
<i>Cinchona pubescens</i> Bark extract	Antioxidante	0,5	1	2
Dimethicone	Factor de consistencia	0,5	1	2
Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben	Conservante	0,8	0,8	0,8

3.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FORMULACIONES ELABORADAS CON EXTRACTO SECO DE *Cinchona Pubescens Vahl* Y *Camellia sinensis*

3.5.1 EVALUACIÓN POR EL METODO DE PCL (Emulsión y Gel)

a) Equipos, Materiales y Reactivos

Equipos y materiales

- Photochen con un kit analítico ACL (AnalyticJena, Jena, Alemania)

Reactivos

- Trolox
- Metanol

b) Procedimiento

La muestra de emulsión elaborada con extracto de *Camellia sinensis* y extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl se evalúan por el método de PCL (Protocolo ACL)

Se elabora una curva de calibración con Trolox y se calcula la capacidad antioxidante como unidades de equivalentes de Trolox.

Las muestras se diluyen en el reactivo metanol de manera que la señal detectada este dentro del intervalo de linealidad de la curva de calibración y dentro del rango de detección (Corriente: 0 - 4 V) (Popov, G.Lewin, 1999).

La señal del detector se obtiene por luminiscencia y se controla por un tiempo de algunos minutos (100 -180s).

Los valores de la capacidad antioxidante, se obtienen mediante la integral de la curva en función del tiempo misma que es obtenida automáticamente por un software PCLsoft.

Para la emulsión se elaboran 3 muestras de *Cinchona Pubescens* Vahl a concentraciones de 0,5%, 0,75% y 1%, una fórmula base y una emulsión al 0,5% de *Camellia Sinensis* como referente químico natural.

Para el gel se elaboran 3 muestras de *Cinchona Pubescens* Vahl a concentraciones de 0,25%, 0,5% y 0,75%, un gel base y un gel al 0,5% de *Camellia Sinensis Sinensis* como referente químico natural.

Los análisis se realizan en el laboratorio de la Universidad Degli Studi di Ferrara- Italia

3.5.2 EVALUACION POR EL MÉTODO DE DPPH PARA EL GEL

a) Equipos Materiales y Reactivos

Materiales

- Balón aforado de 10ml
- Balón aforado de 100ml
- Micro pipeta de 1 a 3000 μ l (marca DROPTTEK, modelo DX40253) con varias puntas,
- Frascos ámbar de 5 ml, 10 ml y 250 ml
- Cubeta, espátula, papel aluminio

Equipos

- Espectrofotómetro, marca Shimadzu modelo: UV mini 1240 y celdas se vidrio
- Balanza analítica; marca Meter Toledo, modelo: ML204/01

Reactivos

- Solución DPPH

- Agua bidestilada
- $K_2S_2O_8$,
- Etanol 96%

b) Procedimiento

Preparación del reactivo DPPH:

- Preparamos una solución de 1×10^{-4} M de DPPH de en etanol al 96% (Se pesan 9,85 mg de DPPH y se afora a 250 mL con alcohol en la oscuridad), colocamos en un frasco ámbar y mantener en refrigeración hasta realizar el ensayo

Preparación de la muestra:

- Se prepara el gel formulado con *Cinchona Pubescens* Vahl en las tres concentraciones, 0.5, 1 y 2% y un blanco. Para ello se pesan 0,5g de gel, se añaden 10 mL de etanol de 96% se disuelve y se afora a 10mL en un balón. Se preparan soluciones de 0,10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ L, añadiendo a cada muestra 2,9 mL de DPPH para ajustar a un volumen final de 3 mL.
- Se repite el mismo procedimiento para el referencial *Camellia Sinensis* al 0.5%

Curva de Calibración

- Programar el espectrofotómetro a 517 nm y se encera con etanol de 96%
- Se mide las absorbancias del blanco y las muestras
- Se calcula el porcentaje de inhibición y se construye una gráfica de % de inhibición versus la concentración ya que la actividad antioxidante se expresará

como una concentración IC₅₀ en µg/mL, que se requiere para el 50% de inhibición de la formulación del radical DPPH.

3.6.- ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES

Las pruebas de estabilidad preliminar y acelerada se realizan en el Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de la Calidad Multianalytica Cia. Ltda.

3.6.1 Análisis de Estabilidad Preliminar

Los parámetros considerados a evaluar en la estabilidad preliminar de las formas cosméticas emulsión y gel elaborados a partir del extracto seco de la corteza de *Cinchona Pubescens* Vahl son:

- Propiedades Organolépticas: Aspecto, color, olor y volumen
- Físico-químicos: pH (Método INEN 783)

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de Estabilidad Preliminar

Fuente: Las autoras

Parámetros	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
pH			
Propiedades organolépticas	Estado		
	Color		
	Olor		
	Contenido o declarado		

- **Conteo Microbiano:** Las especificaciones como límite máximo se consideran en referencia a la Secretaria General de la Comunidad Andina según Resolución 1482.

Tabla 11. Conteo Microbiológico

Fuente: Resolución 1482 CAN

Parámetros	Resultado (UFC/g)*	Método
Recuento de aerobios totales		AOAC 990.12
Recuento de coliformes totales		AOAC 991.14
Recuento de mohos		AOAC 997.02
Recuento de levaduras		AOAC 997.02

*Unidades formadas por colonia por gramo

3.6.2 Análisis de Estabilidad Acelerada

Los parámetros considerados a evaluar en la estabilidad acelerada de las formas cosméticas emulsión y gel elaborados a partir del extracto seco de la corteza de *Cinchona Pubescens* Vahl son los mismos que se evalúan en el análisis de estabilidad preliminar pero en tres mediciones sucesivas con intervalos de un mes:

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos de Estabilidad Acelerada

Fuente: Las autoras

Parámetros	Ensayo 1er mes	Ensayo 2do mes	Ensayo 3er mes
pH			
Propiedades organolépticas	Estado		
	Color		
	Olor		

Contenido
declarado

Tabla 13. Conteo Microbiológico

Fuente: Resolución 1482 CAN

Parámetros	Resultado (UFC/g)* 1er mes	Resultado (UFC/g)* 1er mes	Resultado (UFC/g)* 1er mes	Método
Recuento de aerobios totales				AOAC 990.12
Recuento de coliformes totales				AOAC 991.14
Recuento de mohos				AOAC 997.02
Recuento de levaduras				AOAC 997.02

*Unidades formadas por colonia por gramo

3.7 ESTADÍSTICA

3.7.1 MÉTODO PCL EN CREMA Y GEL FORMULADOS CON *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia Sinensis*

a) ANALISIS DE MEDIA Y LÍMITES DE CONFIANZA

Se analiza 4 muestras de producto (crema y gel) a diferentes concentraciones, se determinara el Coeficiente de Variación (CV)

Tabla 14 Media y Límites de Confianza

Fuente: Las autoras

Muestra	n	Media	E.E	D.E.	LI (95%)	LS (95%)	Varianza	CV	Lectura del Producto
<i>Camellia Sinensis</i>	3								$\bar{x} \pm DE$

0,5%		
<i>Cinchona Pubescens</i>	3	$\bar{x} \pm DE$
Vahl 0,5%		
<i>Cinchona Pubescens</i>	3	$\bar{x} \pm DE$
Vahl 0,75%		
<i>Cinchona Pubescens</i>	3	$\bar{x} \pm DE$
Vahl 1%		

Cuando el análisis de la varianza no es aplicable debido a incumplimientos de las suposiciones del modelo, es necesario aplicar la prueba de Kruskal-Wallis.

b) Prueba de Kruskal Wallis:

La prueba de Kruskal-Wallis es el método más adecuado para comparar poblaciones cuyas distribuciones no son normales. Se analizaron los datos en el programa SPSS.

Se plantean las siguientes hipótesis:

- H0: La actividad anti-oxidante en la crema no es distinta de acuerdo a la concentración.
- H1: La actividad anti-oxidante en la crema es distinta de acuerdo a la concentración.

Tabla 15. Prueba de Kruskal Wallis

Fuente: Las autoras

Prueba de Kruskal Wallis								
Tratamiento	n	Media	D.E.	Mediana	gl	H	p	Sig. Monte Carlo
Muestra								
Producto								

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (Método de Folin-Ciocalteu)

La *Camellia Sinensis* (té verde) posee una alta concentración de polifenoles 25 a 35% (Jun X. et al, 2010) por lo que es usado como referente químico natural (Aldana C. & Guayasamin P., 2014)

En la Tabla 16 se observa que la cantidad de fenoles totales es mayor en el extracto seco de *Camellia Sinensis* (té verde) con 78 mg/g comparado con el extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl (cascarilla) con 30.08 mg/g

Tabla 16. Fenoles totales en los extractos secos de *Camellia Sinensis* y *Cinchona Pubescens* Vahl

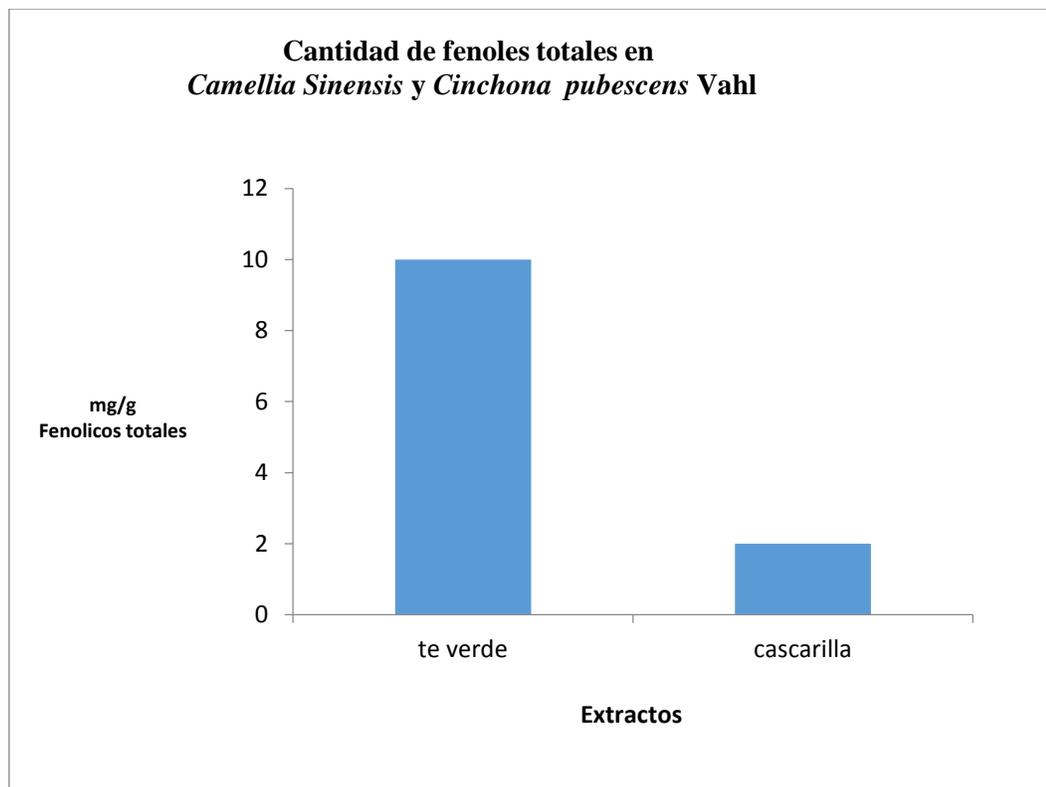
Fuente: Las autoras

Extracto Seco	Absorbancia a 765 nm			Promedio Ā	Desv. ST δ	Concentración [mg/g](fenólicos)
	A ₁	A ₂	A ₃			
<i>Camellia Sinensis</i>	0,668	0,667	0,669	0,668	0,001	78
<i>Cinchona. Pubescens</i> Vahl	0,637	0,635	0,639	0,637	0,001	30,08

En el Gráfico 1 se puede visualizar la cantidad de fenoles totales en los extractos de *Camellia Sinensis* (té verde) y *Cinchona pubescens* Vahl (Cascarilla) y la diferencia que existe entre ellos.

Gráfico 1. Comparación de los fenoles totales entre los extractos de *Camellia Sinensis* (té verde) y *Cinchona pubescens* Vahl

Fuente: Las autoras



4.2. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

El valor del contenido de flavonoides totales para *Camellia Sinensis* es de 10mg/g y el valor de contenido de flavonoides totales de la *Cinchona pubescens* Vahl es de 2mg/g (Tabla 17) es decir que el té verde contiene 5 veces más flavonoides que la cascarilla (Ver anexo 13)

Tabla 17. Flavonoides totales en los extractos secos *Camellia Sinensis* y *Cinchona Pubescens* Vahl

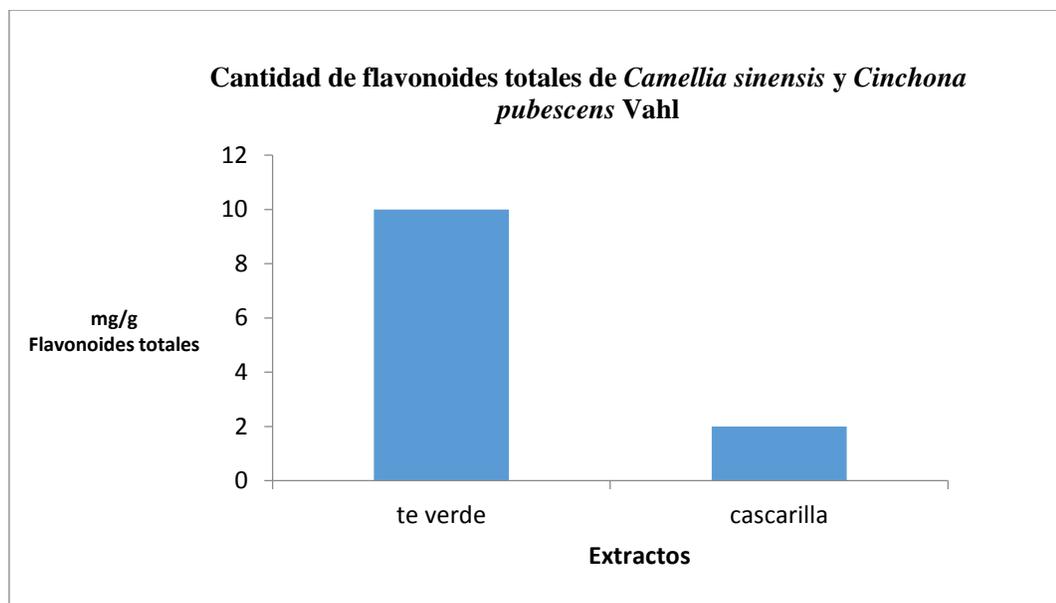
Fuente: Las autoras.

Extracto seco	Absorbancia a 415nm			Promedio Ñ	Desv. ST δ	[mg/g] (flavonoides)
	A ₁	A ₂	A ₃			
<i>Camellia Sinensis</i>	1,667	1,661	1,653	1,660	0,007	10
<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	1,546	1,541	1,540	1,542	0,003	2

En el Gráfico 2 se presenta una comparación de la cantidad de flavonoides totales encontrados en los extractos de *Camellia sinensis* y *Cinchona pubescens* Vahl y la diferencia que existe entre ellos.

Gráfico 2. Comparación de los flavonoides totales entre los extractos de *Camellia sinensis* y *Cinchona pubescens* Vahl

Fuente: Las autoras.



4.3 IDENTIFICACIÓN QUÍMICA DEL TLC (CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA)

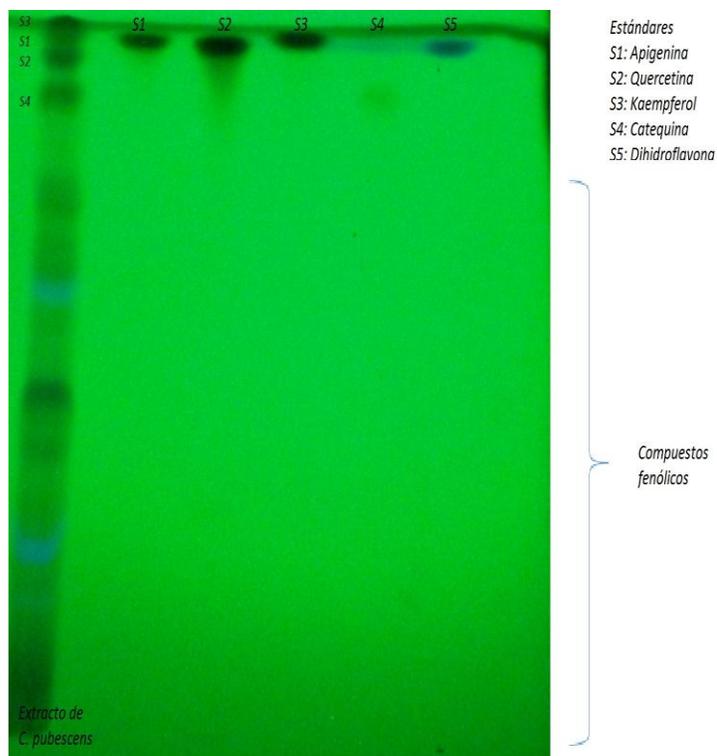
Se utilizó únicamente el extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl para realizar la cromatografía de capa fina TLC ya que éste extracto es el objetivo de nuestra investigación

En el Gráfico 3 se observan 12 manchas predominantes de color amarillo y en menor porcentaje de color azul que corresponden presumiblemente a flavonoides. También se aprecia que existe un mayor porcentaje de compuestos fenólicos que de flavonoides

Se realiza la comparación por contraste, con placas de estándares conocidos de flavonoides y se determina que 4 de las manchas que se visualizan en la placa del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl corresponden a los flavonoides: Apigenina (S1), Quercetina (S2), Kaempferol (S3) y Catequina (S4)

Gráfico 3. Placa Cromatográfica del extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl

Fuente: Las autoras.



4.4. ACTIVIDAD ANTOXIDANTE DEL EXTRACTO

4.4.1 MÉTODO DPPH

En este ensayo se tomo el valor de IC_{50} que corresponde a la concentración necesaria para disminuir un 50% la absorción inicial del DPPH: Valores más bajos de IC_{50} mayor actividad antioxidante.

Estudios in vitro demuestran que los polifenoles de la *Camellia Sinensis* son neutralizadores efectivos para las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno incluyendo los radicales superóxidos (Nakagawa, T., & Yokozawa, T., 2002) por lo que esta planta es considerada como un referente químico natural en éste estudio al igual que la ya conocida Vitamina C o Ácido Ascórbico

Los ensayos de DPPH se realizaron para los extractos de *Camellia Sinensis* y *Cinchona pubescens* Vahl como para el Acido ascórbico (estándar) para determinar su valor de IC₅₀ manteniendo la concentración de DPPH constante, es decir que aunque se aumente la concentración habrá un límite de decoloración y por tanto de absorbancia.

Los extractos de *Camellia Sinensis* y *Cinchona pubescens* Vahl muestran actividad antioxidante, sin embargo se evidencio mayor capacidad para atrapar el radical DPPH en el extracto de *Camellia Sinensis*.

Los datos de la actividad antioxidante del ácido ascórbico y los extractos de *Camellia Sinensis* y *Cinchona pubescens* Vahl, se observan con los valores de IC₅₀ en las tablas 18, 19, y 20 respectivamente.

Tabla 18 Actividad antioxidante (DPPH) del ácido ascórbico

Fuente: Las autoras

Acido Ascórbico					
[mg/ml]	Absorbancia 517nm			Promedio Ā	Inh (%)
	A₁	A₂	A₃		
0	0,67	0,67	0,679	0,673	0
0,0013	0,493	0,492	0,492	0,492	26,844
0,0026	0,27	0,272	0,284	0,275	59,088
0,0053	0,141	0,141	0,141	0,141	79,049
0,008	0,105	0,106	0,106	0,105	84,299
0,00235	IC ₅₀ mg/g				

Tabla 19. Actividad antioxidante (DPPH) del extracto de *Camellia Sinensis*

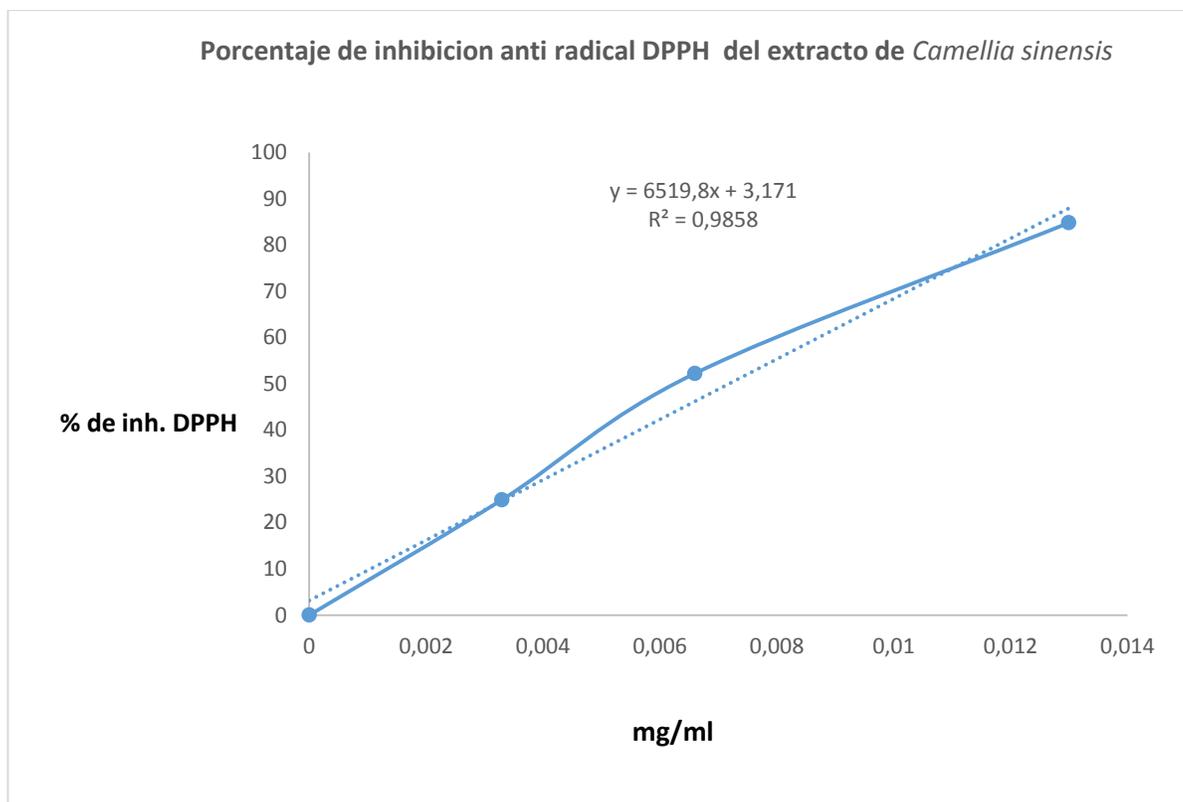
Fuente: Las autoras

<i>Camellia Sinensis</i>					
[mg/ml]	Absorbancia 517nm			Promedio Ã	Inh (%)
	A ₁	A ₂	A ₃		
0	0,686	0,683	0,682	0,684	0
0,0033	0,512	0,513	0,515	0,513	24,951
0,0066	0,326	0,327	0,327	0,327	52,241
0,013	0,104	0,104	0,104	0,104	84,795
0,0072	IC ₅₀ mg/ml				

El IC₅₀ para *Camellia sinensis* (té verde) es 3 veces mayor que el IC₅₀ del ácido ascórbico, demostrando que el ácido ascórbico tiene mayor capacidad antioxidante que el té verde. Sin embargo el valor de IC₅₀ del Té verde (*Camellia Sinensis*) es bajo, confirmándose su alta capacidad antioxidante y de ahí su uso como referente químico (Tabla 18 y 19).

Grafico 4. Porcentaje de inhibición anti-radical DPPH del extracto seco de *Camellia Sinensis*

Fuente: Las autoras



En el gráfico 4 de porcentaje de inhibición del té verde se observa que la captación de radicales se inicia desde las concentraciones menores (0,0033mg/l) y continúa al aumentar la concentración

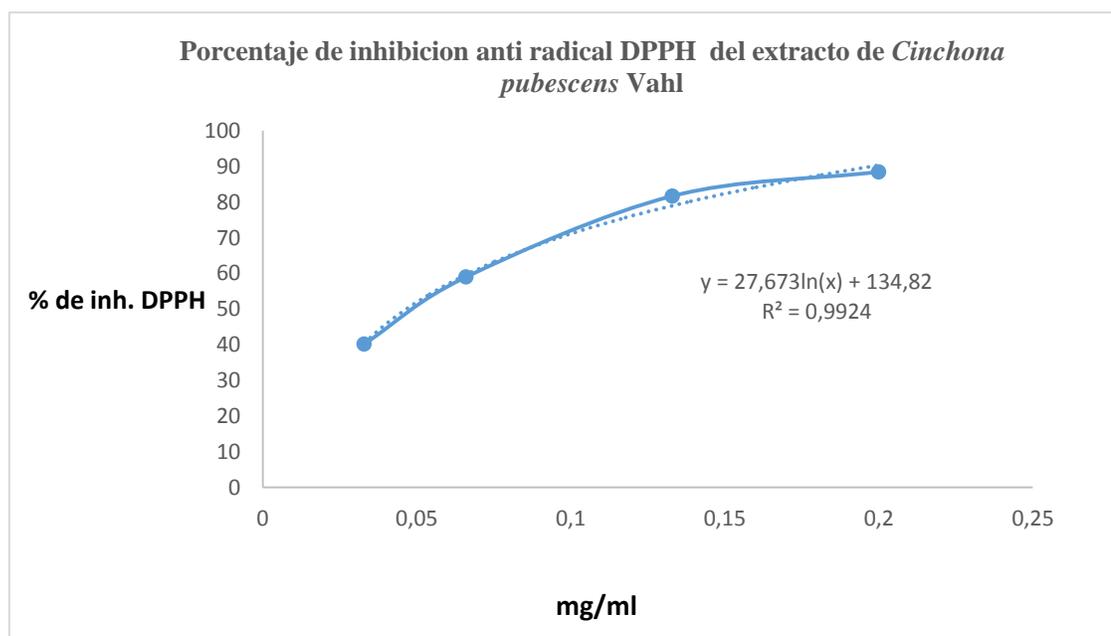
Tabla 20. Actividad antioxidante (DPPH) del extracto de *Cinchona Pubescens Vahl*

Fuente: Las autoras

<i>Cinchona Pubescens Vahl</i>					
[mg/ml]	Absorbancia 517nm			Promedio \bar{A}	Inh (%)
	A_1	A_2	A_3		
0	0,686	0,683	0,682	0,684	0
0,033	0,409	0,409	0,409	0,409	40,204
0,066	0,281	0,281	0,28	0,281	58,966
0,133	0,12	0,127	0,129	0,125	81,676

0,2	0,079	0,079	0,079	0,079	88,450
0,0466	IC50 mg/ml				

Grafico 5. Porcentaje de inhibición anti-radical DPPH del extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl **Fuente:** Las autoras



En el gráfico 5 se observa que el porcentaje de inhibición del radical DPPH para la *Cinchona Pubescens* Vahl se muestra en una grafica logarítmica, esto quiere decir que la captación de radicales comenzó a concentraciones bajas pero empezó a ser constante a una concentración intermedia (0,133mg/ml) y a pesar de aumentar la concentración la captación de radicales DPPH no aumento. Es decir que aunque se aumente la concentración la captación del radical será constante.

Se comparo los IC₅₀ para el extracto de té verde (0,0072 mg/ml) y para el extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl (0,046 mg/ml) y se observa que el IC₅₀ del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl es 6,3 veces mayor que el extracto de *Camellia Sinensis*, por tanto este tiene mayor capacidad antioxidante, sin embargo la capacidad antioxidante del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl es alta por lo que puede ser utilizado como un activo antioxidante

Para inhibir en un 50% la oxidación del radical DPPH la *Camellia sinensis* necesita 0,0062 mg/ml mientras que la *Cinchona pubescens* Vahl necesita 0,046 mg/ml, siendo está concentración inhibitoria 6.3 veces mayor que la del té verde por tanto la capacidad antioxidante de la *Cinchona pubescens* Vahl es menor comparada con la capacidad antioxidante de *Camellia sinensis* (referente de actividad antioxidante), sin embargo la actividad antioxidante que muestra la *Cinchona pubescens* Vahl es aceptable y hace que esta pueda ser considerada como otra fuente natural de antioxidantes con potencial aplicación en industria cosmética.

4.4.2 MÉTODO ABTS

En este ensayo también se tomó en cuenta el valor de IC₅₀, y la concentración de ABTS se mantiene es constante, es decir que aunque se aumente la concentración habrá un límite de decoloración y por tanto de absorbancia. Durante la reacción el radical ABTS azul se vuelve incoloro (neutro).

En la Tabla 21 y 22 se observa que tanto el té verde (estándar natural) y la *Cinchona Pubescens* Vahl poseen actividad antioxidante considerable que se confirman con los valores de IC₅₀.

Tabla 21 Actividad antioxidante (ABTS) del extracto de *Camellia Sinensis*

Fuente: Las autoras

<i>Camellia Sinensis</i>					
mg/ml	Absorbancia 734nm			Promedio Ñ	Inh (%)
	A ₁	A ₂	A ₃		
0	0,763	0,767	0,767	0,766	0
0,0013	0,706	0,703	0,701	0,703	8,224
0,0033	0,552	0,559	0,56	0,557	27,284
0,033	0,257	0,257	0,258	0,257	66,449
0,0231	IC ₅₀ mg/ml				

Tabla 22. Actividad antioxidante (ABTS) del extracto *Cinchona Pubescens* Vahl

Fuente: Las autoras

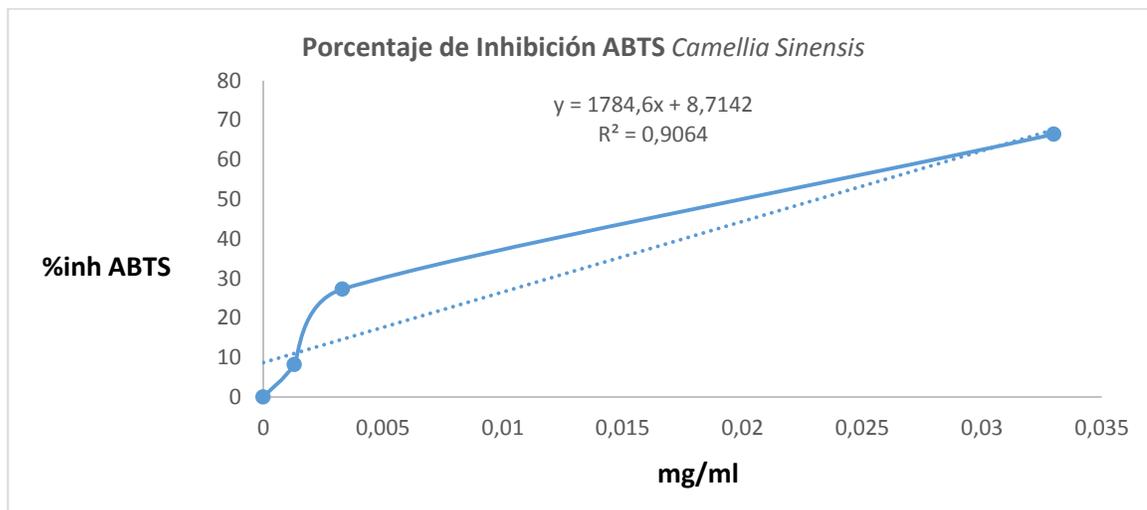
<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl					
mg/ml	Absorbancia 734nm			Promedio Ñ	Inh (%)
	A1	A2	A3		
0	0,686	0,683	0,682	0,684	0
0,033	0,45	0,451	0,457	0,453	33,820
0,066	0,33	0,356	0,352	0,346	49,415
0,133	0,175	0,176	0,173	0,175	74,463
0,2	0,079	0,079	0,079	0,079	88,450
0,088	IC ₅₀ mg/ml				

El grafico 6 muestra que la captación de los radicales ABTS comienza desde concentraciones menores y alcanza una inhibición del 66% para *Camellia Sinensis* con una concentración de apenas 0,023 mg/ml.

Se observa que la curva de calibración de *Camellia Sinensis* tiene un comportamiento similar a la línea de tendencia.

Grafico 6. Porcentaje de inhibición de ABTS del extracto seco de *Camellia Sinensis*

Fuente: Las autoras



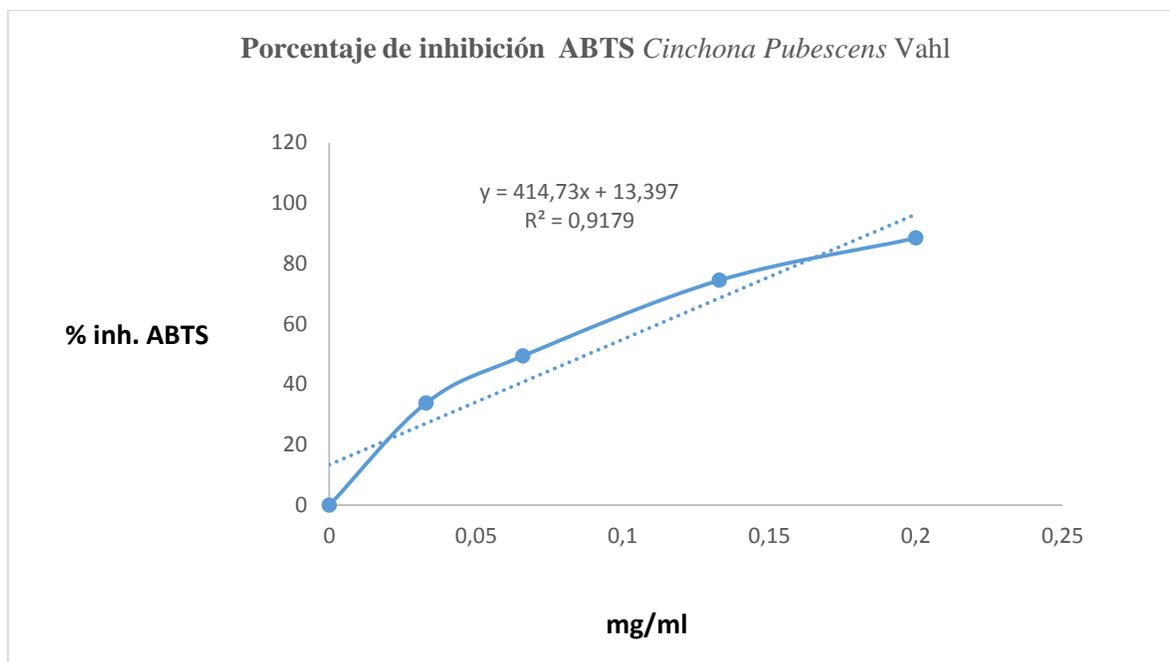
La capacidad antioxidante de la *Cinchona Pubescens* Vahl es 3 veces menor que la de *Camellia Sinensis*, esto se muestra con los valores de IC_{50} de 0,088 y 0,0231 respectivamente (tablas 21 y 22).

En el gráfico 7 observamos que el porcentaje de inhibición para el extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl a la mayor concentración es de 88.45%. Se observa también que la curva de calibración pasado esta concentración comienza a tener un comportamiento constante, no sigue la línea de tendencia que va en aumento.

Grafico 7. Porcentaje de inhibición de ABTS del extracto seco de *Cinchona Pubescens*

Vahl

Fuente: Las autoras



En la tabla 23 y en el gráfico 8 se muestra la comparación del valor de IC₅₀ entre el ácido ascórbico, *Camellia Sinensis* (té verde) y *Cinchona Pubescens* Vahl (cascarilla) y se observa que el té verde (*Camellia Sinensis*) tiene una buena capacidad antioxidante comparada con el ácido ascórbico. Mientras que la *Cinchona Pubescens* Vahl tiene una capacidad antioxidante menor a *Camelia Sinensis*, pero útil para que el extracto sea utilizado como activo en formulaciones cosméticas ya que se observa la inhibición de los radicales en la solución de ABTS + cascarilla y eso se evidencia con una pérdida de color similar a la de los referentes.

Tabla 23. Comparación del IC₅₀ del ácido ascórbico y los extractos de *Camellia Sinensis* y *Conchona Pubescens* Vahl

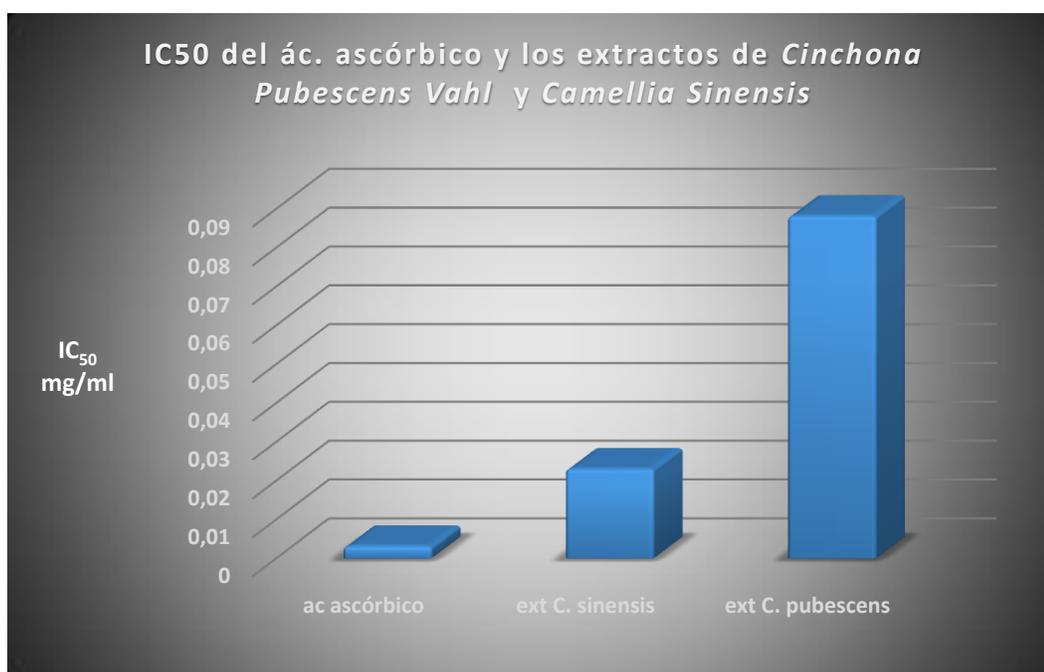
Fuente: Las autoras

IC50

	DPPH	ABTS
Extracto	(mg/ml)	(mg/ml)
Ac. Ascórbico	0,00253	0,00317
Camellia Sinensis	0,0072	0,0231
Cinchona Pubescens Vahl	0,0466	0,088

Grafico 8. Porcentaje de inhibición de ABTS del ácido ascórbico y los extractos secos de *Cinchona Pubescens Vahl* y *Camellia Sinensis*

Fuente: Las autoras



4.4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN CAPA FINA

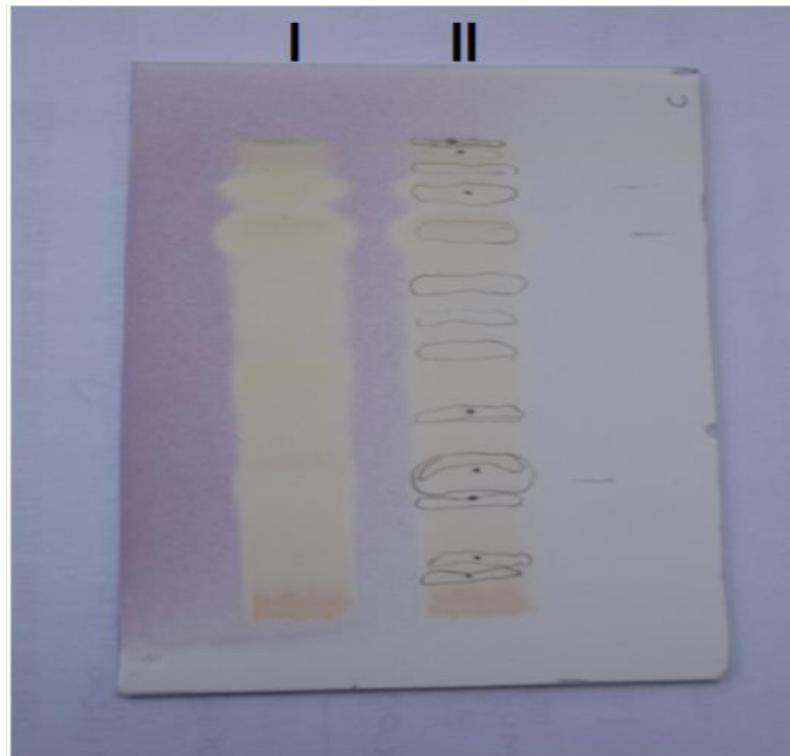
En el gráfico 9 se observa que todos los compuestos tienen capacidad antioxidante, en I se observa a los compuestos luego de la aspersión de una solución de DPPH al 0.5%.

En II se observa a los compuestos separados antes de la revelación de DPPH.

La gráfica nos permite observar que las manchas se volvieron transparentes al instante de aplicar el rociador demostrando la capacidad antioxidante que posee el extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl ya que casi todo el recorrido de la muestra se ha vuelto transparente

Gráfico 9. Actividad antioxidante en capa fina (DPPH) del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl

Fuente: Las autoras



4.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FORMULACIONES CREMA Y GEL

4.5.1 MÉTODO DPPH GEL

Se determinó la capacidad antioxidante de:

- Gel base

- Gel con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,25, 0,5% y 0,75%
- Gel con extracto de *Camellia Sinensis* al 0,5%

4.5.1.1 MÉTODO DPPH GEL BASE

En la tabla 24 se muestra el porcentaje de inhibición para el gel base y se puede observar que los valores son constantes es decir no hay captación de radicales y por tanto el valor de IC₅₀ es alto, no hay capacidad antioxidante.

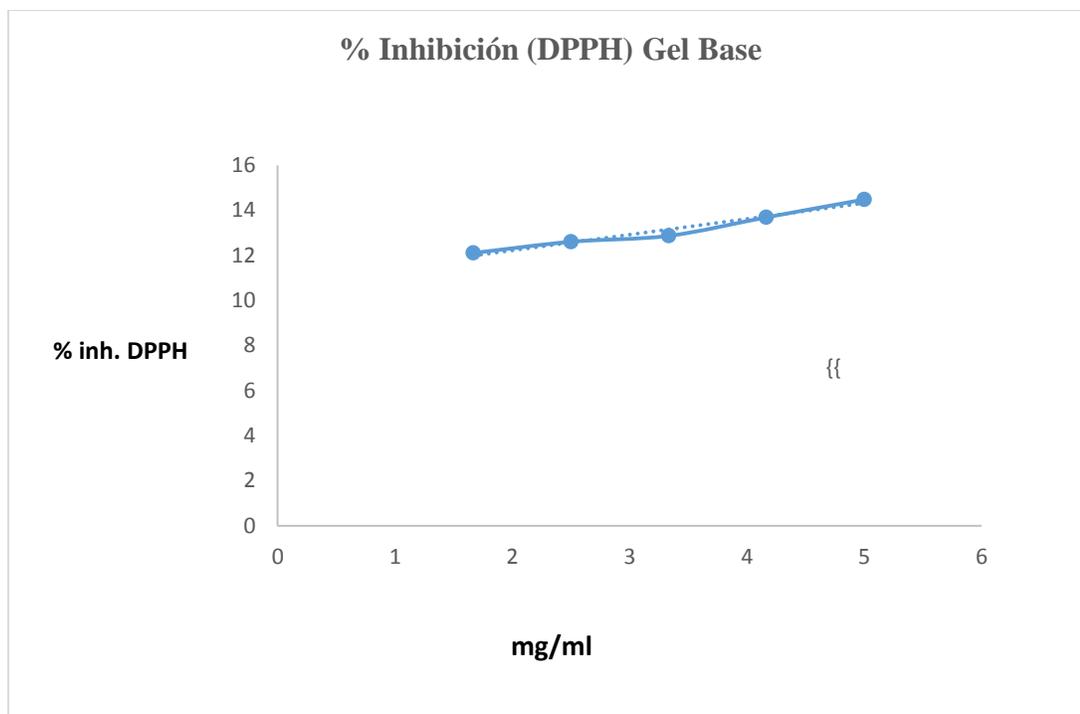
Tabla 24 Actividad antioxidante (DPPH) del extracto de *Gel base*

Fuente: Las autoras

Gel Base					
mg/ml	Absorbancia 517 nm			Promedio	Inh (%)
	A₁	A₂	A₃		
0	1,136	1,138	1,137	1,137	0
1,666	1	0,999	0,999	0,999	12,107
2,5	0,993	0,994	0,994	0,994	12,606
3,333	0,991	0,99	0,991	0,991	12,870
4,166	0,983	0,98	0,981	0,981	13,690
5	0,973	0,972	0,972	0,972	14,482
55,99	IC50 mg/ml				

Grafico 10. Porcentaje de inhibición de DPPH del Gel base

Fuente: Las autoras



En el gráfico 10 se evidencia que no hay captación de radicales DPPH en la muestra de gel base, por tanto el porcentaje de inhibición se muestra con una curva de calibración con tendencia constante.

4.5.1.2 MÉTODO DPPH GEL FORMULADO CON *Cinchona Pubescens Vahl*

En las tablas 25, 26 y 27 se observa el porcentaje de inhibición del gel formulado con *Cinchona Pubescens Vahl*. Los valores del IC₅₀ muestran una diferencia del doble entre el gel formulado con el extracto de 0,25% (IC₅₀= 6,04 mg/ml) y 0,50% (IC₅₀ =3,33 mg/ml).

Se evidencia también que el gel formulado con el 0,25% de extracto de *Cinchona Pubescens Vahl* tiene mejor capacidad antioxidante. El gel formulado al 0,75% (IC₅₀=3,40 mg/ml) muestra que aunque se aumente la concentración de extracto a la formulación, esto no aumenta la capacidad antioxidante del gel.

Tabla 25. Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con *Cinchona Pubescens*

Vahl (0,25%)

Fuente: Las Autoras

<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,25%)					
mg/ml	Absorbancia 517 nm			Promedio \bar{A}	Inh (%)
	A ₁	A ₂	A ₃		
0	1,136	1,138	1,137	1,137	0
2,5	0,873	0,872	0,871	0,872	23,306
3,333	0,819	0,819	0,82	0,819	27,939
4,166	0,77	0,769	0,768	0,769	32,365
5	0,654	0,653	0,659	0,655	42,362
6,06	IC50 mg/ml				

Tabla 26. Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con *Cinchona Pubescens*

Vahl (0,50%)

Fuente: Las Autoras

<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,5%)					
mg/ml	Absorbancia 517 nm			Promedio Ñ	Inh (%)
	A ₁	A ₂	A ₃		
0	1,136	1,138	1,137	1,137	0
2,5	0,627	0,626	0,625	0,626	44,942
3,333	0,51	0,51	0,509	0,510	55,1745
5	0,385	0,39	0,39	0,388	65,845
3,33	IC50 mg/ml				

Tabla 27 Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con *Cinchona Pubescens* Vahl (0,75%)

Fuente: Las Autoras

<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl (0,75%)					
mg/ml	Absorbancia 517 nm			Promedio Ñ	Inh (%)
	A1	A2	A3		
0	1,136	1,138	1,137	1,137	0
1,666	0,749	0,748	0,749	0,749	34,154
2,5	0,632	0,631	0,63	0,631	44,503
3,333	0,581	0,58	0,58	0,580	48,959
4,166	0,53	0,529	0,529	0,529	53,444
3.40	IC₅₀ mg/ml				

4.5.1.3 MÉTODOS DPPH GEL FORMULADO CON *Camellia Sinensis* (TÉ VERDE)

Se determino la capacidad antioxidante del gel formulado con extracto de *Camellia Sinensis* al 0,5% para ser utilizado como estándar natural y compararlo con el gel formulado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0.5%.

En la tabla 28 y el grafico 11 se puede observar que el porcentaje de inhibición del gel al 0,5% va aumentando conforme aumenta la concentración, pero se vuelve constante en la concentración más alta, esto se debe a que ya no hay captación de radicales.

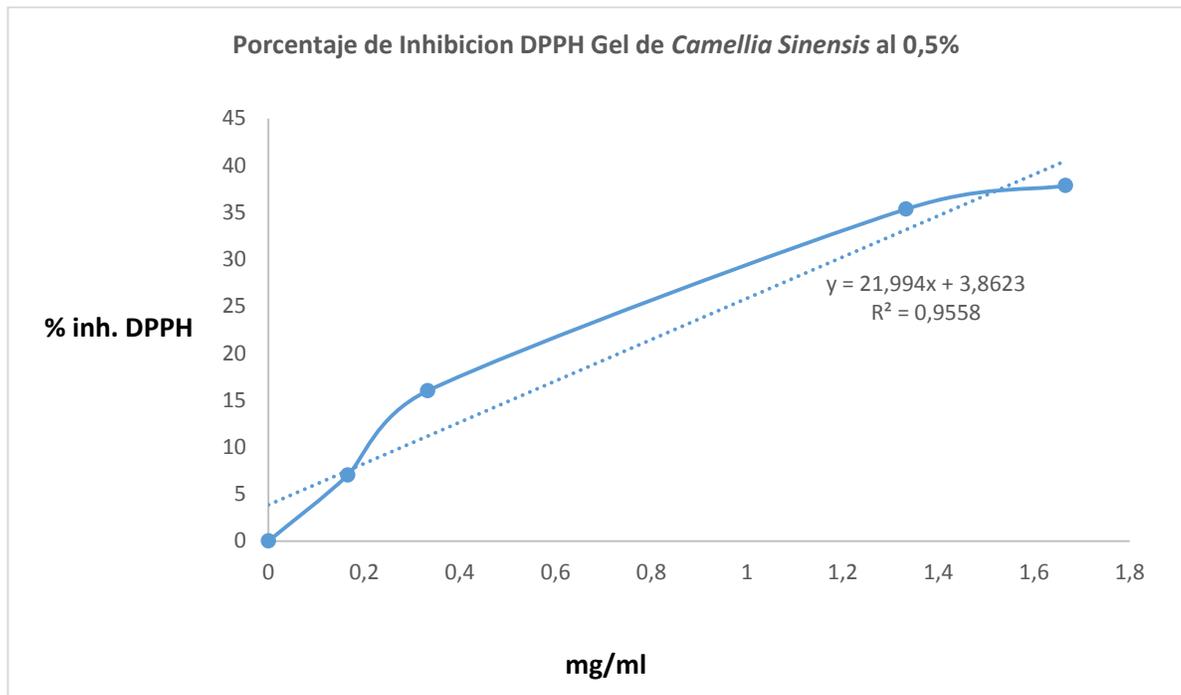
El valor del IC₅₀ para el gel formulado con extracto de *Camellia Sinensis* al 0,5% es de 2.09 mg/ml.

Tabla 28. Actividad antioxidante (DPPH) del Gel formulado con *Camellia Sinensis* (0,5%)

Fuente: Las autoras

<i>Camellia Sinensis</i> (0,5%)					
mg/ml	Absorbancia 517 nm			Promedio Ñ	Inh (%)
	A ₁	A ₂	A ₃		
0	1,136	1,138	1,137	1,137	0
0,166	1,058	1,057	1,056	1,057	7,036
0,333	0,951	0,955	0,958	0,955	16,007
1,333	0,731	0,738	0,735	0,735	35,356
1,666	0,707	0,706	0,707	0,707	37,848
2,09	IC50 mg/ml				

Grafico 11. Porcentaje de inhibición de DPPH de *Camellia Sinensis* (0,5%)



4.5.2 COMPARACION ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE GEL FORMULADO CON *Camellia Sinensis* (TÉ VERDE) Y GEL FORMULADO CON *Cinchona Pubescens* Vahl (CASCARILLA)

El gel formulado con extracto de te verde al 0,5% muestra un valor de IC50 de 2,09 mg/ml, mientras que el gel formulado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5% muestra un valor de IC50 de 3,33mg/ml. La comparación de estos dos valores muestra que la capacidad antioxidante del gel formulado con *Cinchona Pubescens* Vahl es 1,6 veces menor que el gel formulado con extracto de *Camellia Sinensis*.

Tabla 29. Comparación de la actividad antioxidante (DPPH) del Gel base y el formulado con *Camellia Sinensis* (0,5%) y *Cinchona Pubescens* Vahl (0,5%)

Fuente: Las autoras

Extracto	DPPH [mg/ml]
Gel Base	55,99
Gel <i>Camellia Sinensis</i>	2,09
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	3,33

4.5.3 MÉTODO PCL GEL Y CREMA

El análisis se realiza en el laboratorio de la Universidad Degli Studi di Ferrara- Italia (2014).

4.5.3.1 MÉTODO PCL GEL

En la tabla 30 se muestra la actividad antioxidante del gel en las diferentes concentraciones donde la generación de luminiscencia de los compuestos antioxidantes (flavonoides, fenoles) presentes en el gel se muestra por la comparación con el trolox (compuesto normalizado).

Mediante la curva de calibración se observan las variaciones de lecturas para Gel elaborado con *Camellia Sinensis* al 0,5% y para el gel elaborado con *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,25%, 0,75% y 0,75% respectivamente

Tabla 30. Actividad antioxidante (PCL) del Gel formulado con *Camellia Sinensis* (té verde) y *Cinchona Pubescens* Vahl (0,5%)

Muestra	Lect 1	Lect 2	Lect 3	Media	Desv.
Gel <i>Camellia Sinensis</i> 0,5%	10,999	10,784	11,072	10,952	0,150
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl 0,25%	7,927	7,419	6,707	7,351	0,613
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl 0,5%	12,534	12,263	12,534	12,444	0,156
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl 0,75%	14,189	13,682	13,598	13,823	0,320

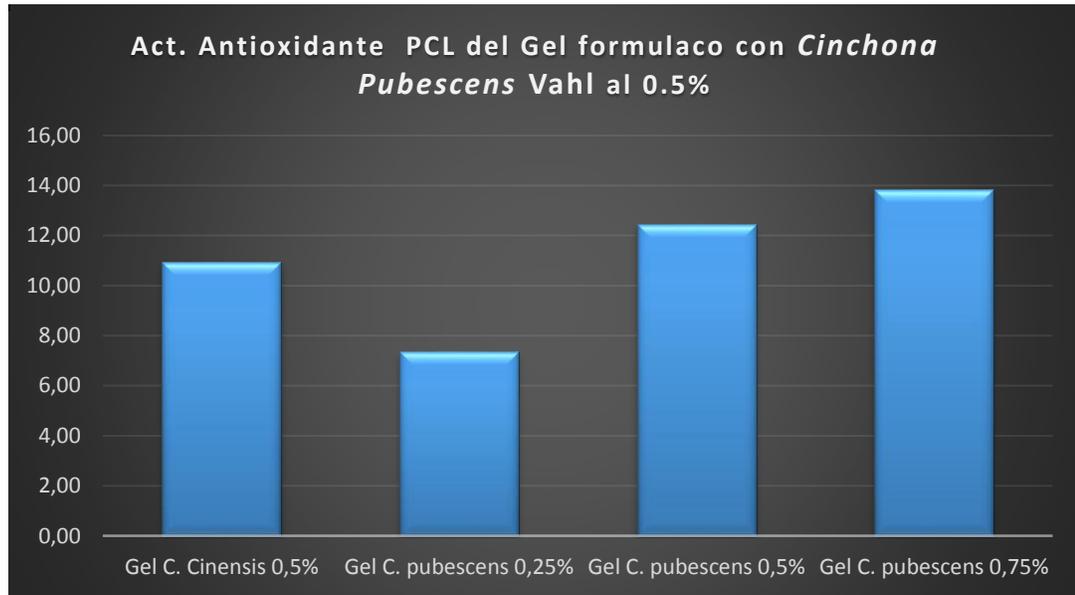
Producto	Act antioxidante umoles de trolox/gramo
Gel <i>Camellia Sinensis</i> 0,5%	10,95 ± 0,150
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl 0,25%	7,35 ± 0,613
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl 0,5%	12,44 ± 0,156
Gel <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl 0,75%	13,82 ± 0,320

Se observa también que la capacidad antioxidante del Gel al 0,5% es la formulación más adecuada, pues la variación de la concentración no afecta en gran medida la actividad antioxidante pues no se evidencia gran aumento de actividad antioxidante al aumentar la concentración.

La capacidad antioxidante del gel formulado al 0,5% de extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl (12,44 umoles de trolox /gramo) comparada con la capacidad antioxidante del gel formulado con *Camellia Sinensis* al 0,5% (10,95 umoles de trolox /gramo) no muestra un diferencia considerable, el *Camellia Sinensis* es tan solo 1,1 veces más antioxidante que el gel formulado con extracto *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%. (Gráfico 11).

Gráfico 12. Comparación de la capacidad antioxidante del gel formulado con *Camellia Sinensis* y el gel formulado con *Cinchona Pubescens* Vahl (0,25, 0,5 y 0,75%).

Fuente: Las autoras



4.5.3.2 MÉTODO PCL CREMA

En la tabla 31 se observa también que la capacidad antioxidante de la crema al 0,5% es la formulación más adecuada, pues la variación de la concentración no afecta en gran medida la actividad antioxidante pues no se evidencia gran aumento de actividad antioxidante al aumentar la concentración. Es decir que una crema formulada con un extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5% tiene un potencial efecto antioxidante que supera ligeramente al de 0,75%

Tabla 31 Actividad antioxidante (PCL) de la crema formulado con *Camellia Sinensis* y*Cinchona Pubescens* Vahl (0.5%)

Fuente: Las autoras

Muestra	Lect 1	Lect 2	Lect 3	Media	Desv.
Crema <i>Camellia Sinensis</i> al 0,5%	5,353	5,561	5,413	5,442	0,107
Crema <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 0,5%	10,773	8,841	11,293	10,302	1,292
Crema <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 0,75%	14,150	14,071	14,387	14,203	0,165
Crema <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 1%	15,192	14,602	14,675	14,823	0,322

Producto	Act antioxidante µmoles de trolox/gramo
Crema <i>Camellia Sinensis</i> al 0,5%	5,442 ± 0,107
Crema <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 0,5%	10,302 ± 1,292
Crema <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 0,75%	14,203 ± 0,165
Crema de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl al 1%	14,823 ± 0,322

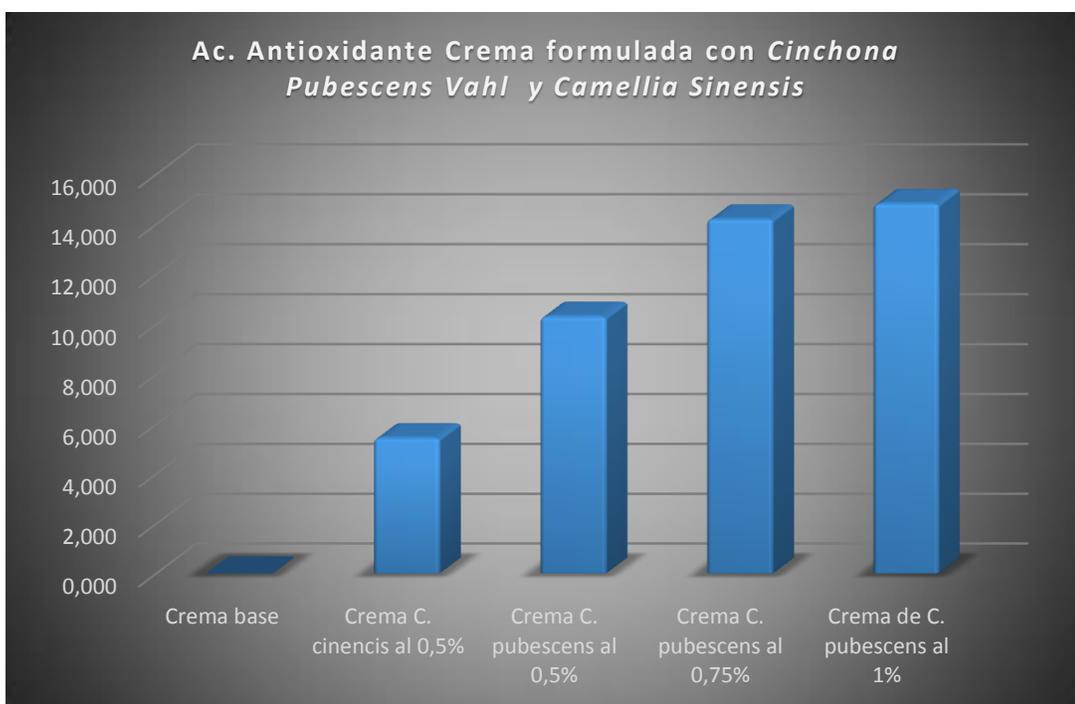
La capacidad antioxidante de la crema formulado al 0,5% de extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl (10,302µmoles de trolox /gramo) comparada con la capacidad antioxidante de la crema formulado con té verde al 0,5% (5,442 umoles de trolox /gramo) se muestra en este caso que la crema formulado con *Cinchona Pubescens* Vahl es 1.8 más antioxidante que el té verde. Estos datos muestran una mejor afinidad del extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl que el de *Camellia Sinencis* en la formula.

En este caso el té verde a perdido su actividad antioxidante, probablemente se oxido o no tiene afinidad con la formulación, mientras que *Cinchona Pubescens* Vahl mantiene su

capacidad antioxidante, dándole así una ventaja al extracto en prueba para ser utilizado en formulaciones cosméticas. (Gráfico 13)

Gráfico 13. Comparación de la capacidad antioxidante de la emulsión formulada con *Camellia Sinensis* y la emulsión formulado con *Cinchona Pubescens* Vahl (0.25, 0,5 y 0,75%).

Fuente: Las autoras



4.6 ESTABILIDAD

4.6 ESTABILIDAD PRELIMINAR Y ACELERADA DE LAS FORMULACIONES: EMULSIÓN Y GEL

Los estudios de ensayos fisicoquímicos y microbiológicos para la estabilidad preliminar y acelerada, para las muestras de gel y emulsión formulados con extracto seco de

Cinchona Pubescens Vahl al 0,5% fueron evaluados en el Laboratorio de Análisis y Ensayos Multianálitica

4.6.1 ESTABILIDAD DEL GEL

En la tabla 32 se muestra los datos e información obtenida luego del analisis de estabilidad preliminar y acelerada para el gel formulado al 0,5% con *Cinchona Pubescens* Vahl y se observa que ni pH ni sus propiedades organolépticas han variado notablemente

Tabla 32. Resultados de la estabilidad preliminar:

Fisicoquímicos y organolépticos

Fuente: Las autoras

Parámetros		Valor
	pH	5.2
Propiedades organolépticas	Aspecto	Semi-solido
	Color	Característico
	Olor	Característico
	Contenido	100g

Tabla 33. Resultados de la estabilida Acelerada

Fisicoquímicos y organolépticos

Parámetros	1 er mes	2do mes	3er mes	
pH	5.2	5.21	5.25	
Propiedades organolépticas	Aspecto	Semi-solido	Semi-solido	Semi-solido
	Color	Característico	Característico	Característico
	Olor	Característico	Característico	Característico
	Contenido	100g	100g	100g

Fuente: Las autoras

En las tablas 34 y 35 se muestran los datos de conteo Microbiano preliminar y acelerado para la muestra de gel formulado con 0.5% de extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl.

Tabla 34. Conteo Microbiológico Preliminar

Fuente: Las autoras

Parámetros	Resultado (UFC/g)*
Recuento de aerobios totales	30
Recuento de coliformes totales	< 10
Recuento de mohos	< 10
Recuento de Levaduras	< 10

*Unidades formadas por colonia por gramo

Tabla 35. Conteo Microbiológico Acelerado

Fuente: Las autoras

Parámetros	Resultado (UFC/g)* 1er mes	Resultado (UFC/g)* 2do mes	Resultado (UFC/g)* 3er mes
Recuento de aerobios totales	30	50	60
Recuento de coliformes totales	< 10	< 10	< 10
Recuento de mohos	< 10	< 10	< 10
Recuento de Levaduras	< 10	< 10	< 10

*Unidades formadas por colonia por gramo

La formulación cumple con los parámetros de límites de contenido microbiológico establecidos, los que permite validar la calidad microbiana del producto formulado según lo establece la Cosmetics Europe - The Personal Care Association, así como también se establece que la formulación tiene un tiempo de vida útil no menor a 18 meses

4.6.2 ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN (CREMA)

En las tablas 36-37 se muestra los datos e información obtenida luego del análisis de estabilidad preliminar y acelerada para la crema formulada al 0,5% con *Cinchona Pubescens* Vahl y se observa que sus propiedades organolépticas se mantiene constante al igual que el valor de pH reportado, mismo que se encuentra dentro de los valores considerados dentro del manto ácido de la piel humana (4-6) (Ohman H. & Vahlquist A., 1994) y necesarios para que el activo pueda ejercer su acción antioxidante (Gotlib N. et al, 2015).

Tabla 36. Resultados de la estabilidad preliminar de la emulsión: Fisicoquímicos y organolépticos

Fuente: Las autoras

Parámetros		Resultado
	pH	3.65
Propiedades organolépticas	Aspecto	Semi-solido
	Color	Característico
	Olor	Característico
	Contenido	100g

Parámetros	Resultado 1er mes	Resultado 2do mes	Resultado 3er mes
pH	3.65	3.66	3.68
Propiedades organolépticas	Aspecto	Semi-solido	Semi-solido
	Color	Característico	Característico
	Olor	Característico	Característico

Contenido	100g	100g	100g
-----------	------	------	------

Tabla 37. Resultados de la estabilidad acelerada de la emulsión: Fisicoquímicos y organolépticos

En la tabla 38 se muestran los resultados de conteo Microbiano de estabilidad preliminar para la muestra de crema formulada con 0.5% de extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl.

Tabla 38. Conteo Microbiológico

Fuente: Las autoras

Parámetros	Resultado (UFC/g)*
Recuento de aerobios totales	20
Recuento de coliformes totales	< 10
Recuento de mohos	< 10
Recuento de Levaduras	< 10

*Unidades formadas por colonia por gramo

Tabla 39. Conteo Microbiológico Acelerado

Fuente: Las autoras

Parámetros	Resultado (UFC/g)* 1er mes	Resultado (UFC/g)* 2do mes	Resultado (UFC/g)* 3er mes
Recuento de aerobios totales	20	40	60
Recuento de coliformes totales	< 10	< 10	< 10
Recuento de mohos	< 10	< 10	< 10
Recuento de Levaduras	< 10	< 10	< 10

*Unidades formadas por colonia por gramo

La formulación cumple con los parámetros de límites de contenido microbiológico establecidos, los que permite validar la calidad microbiana del producto formulado según lo establece la Cosmetics Europe - The Personal Care Association, así como también se establece que la formulación tiene un tiempo de vida útil no menor a 18 meses (tabla 39).

4.7 ANALISIS ESTADISTICO

Es importante tomar en cuenta que el CV puede dar valores muy grandes, que no necesariamente implican dispersión de datos, esto ocurre cuando no hay los suficientes datos, en este caso mediciones de actividad anti-oxidante, por tanto no se puede verificar la variabilidad de la dispersión de los datos, no se da un análisis de varianza aplicable.

Cuando el análisis de la varianza no es aplicable debido a incumplimientos de las suposiciones del modelo, es necesario aplicar la prueba de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica)

4.7.1 MÉTODO PCL EN CREMA FORMULADA CON *Cinchona Pubescens* Vahl y *Camellia Sinensis*

a) ANALISIS DE MEDIA Y LÍMITES DE CONFIANZA

En la tabla 40 se observa que la muestra de crema formuladas al 0,5% con *Cinchona Pubescens* Vahl tiene un valor de CV de 12.54, lo que nos indica que los valores de actividad antioxidante (variable) son heterogéneos, existe mayor dispersión de los valores.

En los valores de CV para las muestras de *Camellia Sinensis* al 0.5% y *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,75% y 1% muestras que existe una menor dispersión de valores.

Tabla 40. Media y Límites de Confianza emulsión

Fuente: Las autoras

Muestra	n	Media	E.E.	D.E.	LI (95%)	LS (95%)	Varianza	CV	Lectura del Producto
C. sin 0,5%	3	5,44	0,05	0,11	5,35	5,52	0,01	1,97	5,442 ± 0,107
C. pub 0,5%	3	10,25	0,61	1,29	8,84	11,15	1,67	12,54	10,302 ± 1,292
C. pub 0,75%	3	14,2	0,08	0,16	14,07	14,34	0,03	1,16	14,203 ± 0,165
C. pub 1%	3	14,82	0,15	0,32	14,6	15,09	0,1	2,17	14,823 ± 0,322

b) Prueba de Kruskal Wallis:

Se analizaron los datos en el programa SPSS.

Tabla 41. Análisis de Varianza de Kruskal Wallis

Fuente: Las autoras

Prueba de Kruskal Wallis								
Tratamiento	n	Media	D.E.	Mediana	gl	H	p	Sig. Monte Carlo

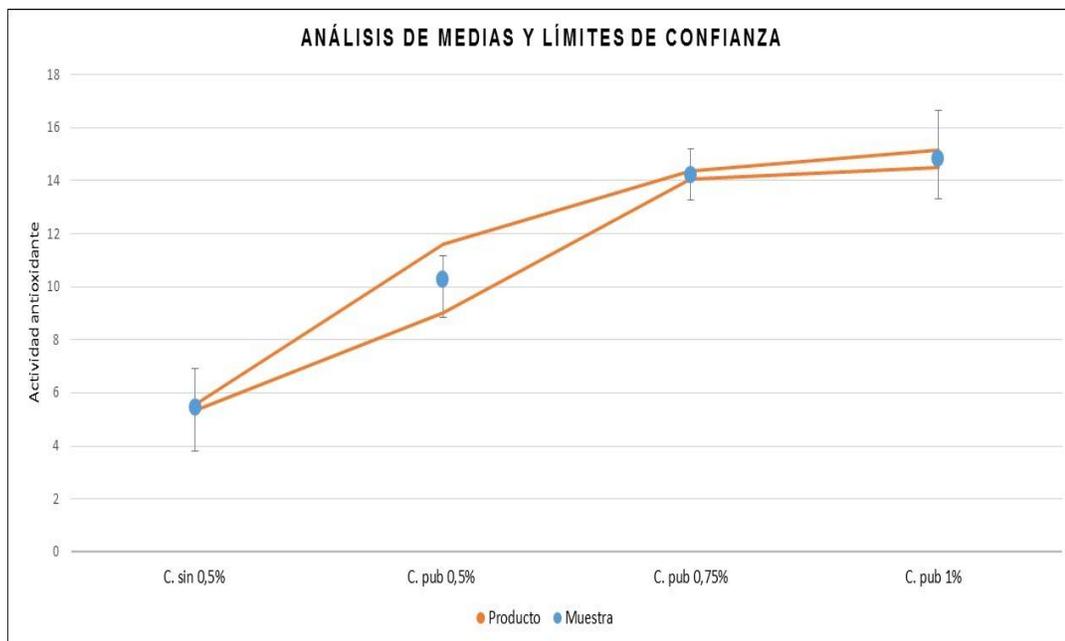
Muestra	12	11,19	3,89	12,68	1	0,03	0,01556	LI	LS
Producto	4	1.25	0,45	1,00				0,947	0,958

Nivel de significancia del 5%.

En la tabla 41 se observa que el valor calculado de p es menor a 0,05 por lo tanto no se acepta la Hipotesis nula. Lo que quiere decir que existe variación entre las concentraciones apreciable en el gráfico 14

Gráfico 14. Variación de la actividad antioxidante en las emulsiones evaluadas

Fuente: Las autoras



a) ANALISIS DE MEDIA Y LÍMITES DE CONFIANZA

En la tabla 42 se observa que la muestra de gel formulado al 0,5% con *Cinchona Pubescens* Vahl tiene un valor de CV de 8,34, lo que nos indica que los valores de actividad antioxidante (variable) son heterogéneos, existe mayor dispersión de los valores.

En los valores de CV para las muestras de *Camellia Sinensis* al 0.5% y *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,25% y 0,75% muestras que existe una menor dispersión de valores.

Tabla 42- Media y Límites de confianza Gel

Fuente: Las autoras

Muestra	n	Media	E.E.	D.E.	LI	LS	Varianza	CV	Lectura del
					(95%)	(95%)			Producto
C.sin 0,5%	3	10,95	0,09	0,15	10,78	11,06	0,02	1,37	10,95 ± 0,150
C. pub 0,5%	3	7,35	0,35	0,61	6,71	7,81	0,38	8,34	7,35 ± 0,613
C. pub 0,25%	3	12,44	0,09	0,16	12,26	12,53	0,02	1,26	12,44 ± 0,156
C. pub 0,75%	3	13,82	0,18	0,32	13,6	14,08	0,1	2,31	13,82 ± 0,320

b) Prueba de Kruskal Wallis:

Se analizaron los datos en el programa SPSS.

Tabla 43. Análisis de Varianza de Kruskal Wallis

Fuente: Las autoras

Prueba de Kruskal Wallis

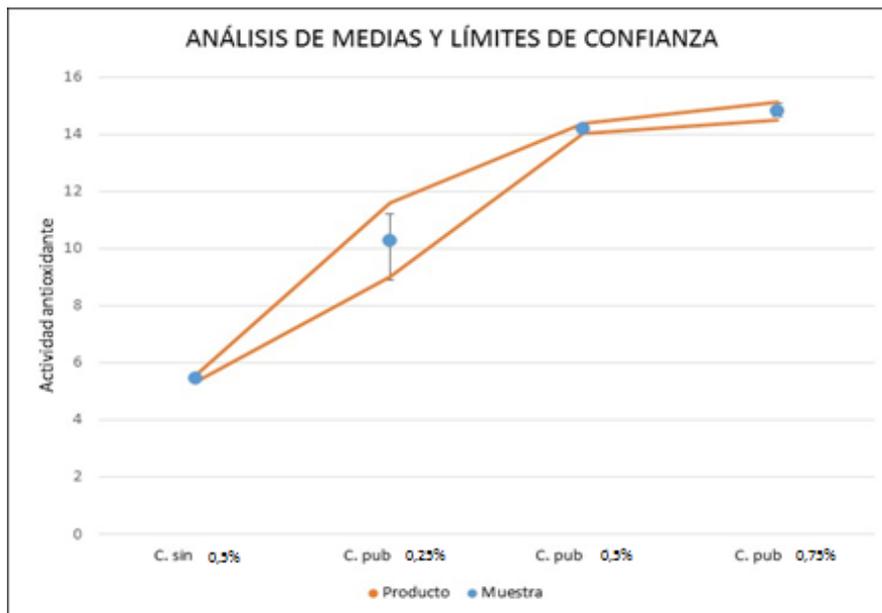
Tratamiento	n	Media	D.E.	Mediana	gl	H	p	Sig. Monte Carlo	
Muestra	12	11,19	3,89	12,68	1	0,03	0,01531	LI	LS
Producto	4	1.25	0,45	1,00				0,947	0,958

Nivel de significancia del 5%.

En la tabla 43 se observa que el valor calculado de p es menor a 0,05 por lo tanto no se acepta la Hipotesis nula. Lo que quiere decir que existe variación entre las concentraciones apreciable en el gráfico 15

Gráfico 15. Variación de la actividad antioxidante en los geles evaluados

Fuente: Las autoras



CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Mediante certificado de identificación obtenido en el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, podemos concluir que la planta proveniente del sector de Parroquia de Ulloa Provincia de Pichincha corresponde a *Cinchona pubescens* Vahl de la clase Equisetopsida C. Agardh, subclase Magnoliidae Novák ex Takht, familia de las Rubiaceae Juss., tribu Cinchoneae DC, género *Cinchona* L., especie *pubescens* Vahl y cuyo nombre común por el que se identifica es “casarilla” (Ver anexo 3)
- La determinación de fenoles totales realizada mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, nos permite concluir que el extracto seco de *Cinchona pubescens* Vahl

obtenido mediante método de percolación, posee un 30,8% de compuestos antioxidantes expresados como fenólicos totales, ya que este método se basa en la propiedad de los fenoles de reaccionar frente a agentes oxidantes.

- Mediante los resultados obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu se puede concluir que a pesar de que el extracto *Cinchona Pubescens* Vahl es 3 veces menor que su referente químico natural *Camellia sinensis* (Té verde) (30,8 mg/g y 78 mg/g respectivamente de compuestos fenólicos), este valor obtenido es alto si lo comparamos con los valores encontrados en otros estudios para plantas como la uña de gato (17,3 mg/g), aguaymanto (9,4 mg/g), maca (9,3mg/g) y yacon (12,8mg/g) a los cuales se les ha atribuido alta capacidad antioxidante (Doreto V, 2013).
- Los valores de flavonoides totales obtenidos para el té verde son del 10% mientras que para la *Cinchona Pubescens* Vahl los valores de flavonoides totales encontrados mediante este análisis son del 2%, concluyéndose que el té verde contiene 5 veces más flavonoides totales que la *Cinchona Pubescens* Vahl.
- Mediante la técnica de cromatografía en capa fina, se encontraron compuestos flavonoides como: apigenina, quercetina, koempferol, catequina, dihidroflavona y compuestos fenólicos no identificados que por la coloración amarilla que se reflejo en el espectro obtenido se concluye que todos los compuestos identificados tienen carácter antioxidante ya que toda la banda se decolora evidenciándose una marcada capacidad antioxidante

- El IC50 obtenido para el ácido ascórbico mediante ensayo de DPPH es de 0,00235 mg/mL, mientras que para té verde 0,0072 mg/mL, y para la *Cinchona Pubescens* Vahl el IC50 es de 0,0466 mg/mL, por lo que se concluye que por lo que se concluye que la *Cinchona Pubescens* Vahl posee una capacidad antioxidante que es 6 veces menor que el té verde 19,82 veces menor que el ácido ascórbico
- Mediante ensayo de ABTS, se obtiene que el ácido ascórbico presenta un IC50 de 0,00317mg/mL, el té verde tiene un IC50 de 0,0231 mg/mL y la *Cinchona Pubescens* Vahl tiene un IC50 de 0,082 mg/mL., por lo que se concluye que la *Cinchona Pubescens* Vahl posee una capacidad antioxidante que es 3,8 veces menor que el té verde 27,8 veces menor que el ácido ascórbico
- Por el método de DPPH para el gel base se encontró un IC50 de 55,99 mg/mL, que comparado con las muestras de gel elaborado con extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,25%, 0,5% y 0,75% con valores de su IC50 de 6,04 mg/mL, 3,33 mg/mL y 3,40 mg/mL respectivamente, se evidencia una variación de la capacidad antioxidante de un gel simple con uno elaborado con extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl y que la concentración del extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl en un gel con la mayor capacidad antioxidante es al 0,5% ya que su valor de IC50 es menor
- El valor del IC50 obtenido por el método de DPPH para el gel elaborado con extracto de té verde al 0,5% es de 2,09 mg/mL que en comparación con el IC50 de 3,33

mg/mL para el gel elaborado con el 0,5% de extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl nos permite concluir nuevamente que la *Cinchona Pubescens* Vahl posee una capacidad antioxidante 1,59 veces menor que el té verde

- Por el método de PCL para determinar la actividad antioxidante de la crema elaborada con extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%, 0,75% y 1% se obtuvieron valores de 10,30 μmmoles de trolox/gramo, 14,20 μmmoles de trolox/gramo y 14,82 μmmoles de trolox/gramo respectivamente, lo que nos permite concluir nuevamente que la concentración al 0,5% de extracto seco en la crema de tipo aceite en agua formulada es la que mejor actividad antioxidante refleja
- Al comparar el valor de la actividad antioxidante de la crema elaborada con extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5% con el estándar de referencia té verde de la misma concentración cuya actividad antioxidante es de 5,44 μmmoles de trolox/gramo podemos encontrar que la crema elaborada *Cinchona Pubescens* Vahl tiene una actividad antioxidante que es 1,89 veces menor que la actividad antioxidante del té verde. De acuerdo a este valor podemos decir que no existirá mucha diferencia en cuanto a las formulaciones desarrolladas con extracto de té verde, esto se debe a que el té verde se ha oxidando por lo que la capacidad antioxidante esperada se ha reducido, por tanto podemos concluir que el extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl en gel como en crema mantienen su capacidad antioxidante a largo plazo a diferencia del té verde

- Para que una formulación sea considerada como antioxidante el valor de μmmoles de trolox/gramo (método PCL) debe ser de 20. (Manfredini S. 2014). En nuestro caso tanto la crema como el gel formulados al 0,5% con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl son de 10,30 trolox/gramo y 12,44 trolox/gramo respectivamente valores que son 0,55 veces menos que el valor referencial (20 trolox/gramo)
- En función de las formulaciones planteadas en el presente estudio se puede concluir que tanto la crema de tipo aceite en agua como el gel acuoso permiten incorporar y mantener el extracto sin que sus componentes alteren la capacidad antioxidante del principio funcional
- Con los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a capacidad antioxidante y formulaciones, podemos concluir que las formulaciones desarrolladas con extracto seco de *Cinchona Pubescens* Vahl pueden ser empleadas no solo en productos anti edad, sino también para potenciar la acción de los protectores solares, los after sun, etc.

5.2 RECOMENDACIONES

- ✓ Conociendo la capacidad antioxidante, del té verde y ahora de la *Cinchona Pubescens* Vahl y los resultados de PCL elaborados con los 2 extractos, se recomienda hacer un estudio combinado de los dos extractos para alcanzar una formulación que contenga 20 μmmoles de trolox/gramo para que sea considerada como una formulación antioxidante

- ✓ Se recomienda desarrollar formulaciones con un pH ácido ya que a éste pH se garantiza que los flavonoides ingresen a través de la membrana celular y cumplan con su actividad antioxidante y no interfieran con la acción de otros antioxidantes naturales existentes en la piel

- ✓ Además de la capacidad farmacológica reconocida para la *Cinchona pubescens* Vahl “cascarilla” como antimalárica, mediante éste estudio planteamos una nueva alternativa para dar un uso cosmético a una planta que está catalogada como invasiva en ciertos lugares del Ecuador, este uso se puede traducir en la creación de proyectos alternativos para la eliminación de la planta sin necesidad de usar métodos convencionales como la incineración, introducción de una especie eliminadora, proliferación de la invasión por un proyecto que sea poco agresivo con el ambiente y redituable para las comunidades afectadas

- ✓ Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la *Cinchona pubescens* Vahl puede ser una fuente natural de antioxidantes con potencial aplicación en industria cosmética dada la importante actividad encontrada en el extractos bajo los dos modelos in vitro (DPPH, ABTS) evaluados.

- ✓ Una terapia antioxidante provee una alternativa buena para el tratamiento de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo en la piel ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales como la *Cinchona Pubescens* Vahl. Por lo cual es importante el establecimiento de métodos de referencia confiables para la

cuantificación de componentes antioxidantes como herramientas para el estudio de nuevas plantas y sus posibles usos cosméticos.

- ✓ La crema y gel formulados con extracto seco de *Cinchona pubescens* Vahl al 5% mostraron una buena capacidad antioxidante que podría ser potenciada con la combinación de un extracto de *Camellia Sinensis* y obtener una crema o gel antioxidantes que manifiesten efectos protectores tópicos (daño oxidativo de radicales libres) contra el envejecimiento, y puedan ser usados diariamente como un hábito de protección a la piel.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, J. & Cabezas D. (2014). *Estudio de la Actividad Antioxidante y Antimicrobiana del Aceite Esencial de las hojas de Piper Pubinervulum C. DC Proveniente de Macas Ecuador*. Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito

Adam, I., Idris, H. M. and El Bashir, M. I. (2004). Quinine for chloroquine-resistant falciparum malaria in pregnant Sudanese women in the first trimester. *Eastern Mediterranean Health Journal* 10(4-5):560-565.

Achan, J., Tibenderana, J. K., Kyabayinze, D., et al. (2009). *Effectiveness of quinine versus artemether-lumefantrine for treating uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: Randomised trial*. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 339:b2763.

Aerts, R. J., de Waal, A., Pennings, E. J., & Verpoorte, R. (1991). *The distribution of Strictosidine Synthase Activity and Alkaloids in Cinchona Plants*, 183(4), 536-541.

Aldana C. & Guayasamin P. (2014) *Estudio de la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de Ficus Citrifolia y caracterización química de los polifenoles*, Ing en Biotecnología de los recursos naturales UPS

Alonso, J. R. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. Rosario Argentina, Corpus, (pp. 1037-1042)

Álvarez N. & Bague A. (2012). *Fitocosméticos*, 1ª Edición, ISBN: 9788496709768

Andersson, L. (1998). A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Memoirs-New York Botanical Garden*.

Andrade-Neto V, Brandão M, Stehmann J, Oliveira L, Krettli A. (2003). *Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil*. *J Ethnopharmacol* 87: 253 - 256.

Andersson, Lennart T, Charlotte M. (1994). *Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapelteae* [162(14)]. *Flora of Ecuador*. University of Göteborg; Riksmuseum; Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Göteborg; Stockholm; Quito 50, 114 pp.

Anesini, C., Ferraro, G. E., & Filip, R. (2008). Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9225-9229.

ANVISA, 2005. (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria), *Diario Oficial da Uniao: Poder Executivo*, de 23 de septiembre del 2005Brasil

Ayoola, G. A., Coker, H. A., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). *Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024

Bello, C. A. (1995). *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Santa Fe de Bogotá, D.C.-Colombia: CYTED. Pag. 475-478

Cardiel J. (2014). *Instrucciones para la recolección y preparación de muestras de herbario (Plantas Vasculares) -v. 2.1: Universidad Autónoma de Madrid –UAM, Madrid*.

Consultado el 15 de abril del 2014. En:

https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/jcardiel/ asignaturas/botanica/docuemntosPDF/HERBARIO-2.1.pdf

Castañeda C., Ramos L., Ibañez V. (2008). *Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*. *Revista Horizonte Médico*, | Volumen 8, N° 1, Julio 2008, Consultado el 15 de abril del 2013. En:

http://www.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf

Chao JC, Yuen MD, Chen PY & Chien SW (2002). *Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients*. J Nut Biochem 13(11):653-63.

Chen L, (2012). *The role of antioxidants in photoprotection*. A critical review. J Am Acad Dermatol, 2012 67(5):1013-24

Chiriani, C. H. B. (1992). *La vuelta a los vegetales*. 10 Edición

Cifuentes M. (2013). *Estudio de la composición química del tónicoamargo de la corteza de quina roja (Cinchona Pubescens Vahl)*, Tesis de licenciatura, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba- Ecuador

Clapés, S., Torres, O., Companioni, M., Villariño, U., Broche, F., & Céspedes, E. M. (2001). *Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 20(2), 93-98.

Cóndor E., Oliveira B., Loayza K. y Reyna V. (2009). *Estudio químico de los tallos de chinchona pubescens Vahl*. Rev Soc Quím Perú. Vol.7, N° 1: pp 54-63.

Cuadrado O. (2013). *Cosmética solar: El envejecimiento prematuro y la protección solar*. Ciencia y Salud Virtual, 3(1), 123-134.

Das B. (2011). *In vitro Antioxidant Activities of Tetrastigma Thomsonianum Planch leaves and stems*, Revista Pharmacologyonline, 2:193-204.

Debenedetti, S. L. (2012). *Lo que necesitamos saber para proteger nuestra piel del sol*.

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU

Roginsky

De La Vega M. (1846). *Farmacopea Mexicana*, Academia Farmacéutica de la República de México

Del Campo, A., Giampapa, V. & Ramírez, O. (2004). *Cirugía plástica y medicina antienvjecimiento. El manejo integral de los pacientes*. 14(1), 35-39.

Del Pozo A., et al (2007).- *Emulsiones en Dermofarmacia*. Unidad de Tecnología Farmacéutica, Facultad de farmacia, Universidad de Barcelona , Aula de Farmacia, pag 50

Diener, H. C., Dethlefsen, U., Dethlefsen Gruber, S. and Verbeek, P. 2002. *Effectiveness of quinine in treating muscle cramps: A double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicentre trial*. *International Journal of Clinical Practice* 56(4):243-246.

Doroteo, V. H., Díaz, C., Terry, C., & Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1), 13-20.

Dinehart, M. E., Hayes, J. E., Bartoshuk, L. M., et al. (2006). *Bitter taste markers explain variability in vegetable sweetness, bitterness and intake*. *Physiology and Behavior* 87(2):304-313.

Donadio Jr., J. V., Whelton, A. and Kazyak, L. 1968. Quinine therapy and peritoneal dialysis in acute renal failure complicating malarial haemoglobinuria. *Lancet* 1(7539):375-379.

El-Naggar, S. M. (2010). *Study on the Effect of Cinchona officinalis in the Protection of Kidney from Cancer*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 8(1), 15-27.

Epperly MW, Osipor AN, Martín I, Kawai KK (2004). *Ascorbate as a “redox sensor” and protector against irradiation-induced oxidative stress*. *International J Radiation Oncol.* 58(3):851-61.

Faria, A., Monteiro, R., Mateus N., Acevedo I., Calhau, C. (2007). *“Effect of pomegranate (punica granatum) juice intake on hepatic oxidative stress”*. *European Journal of Nutrition*, Vol. 46, Number 5

Farinas L. (2004). *Alteraciones del Balance Oxidativo de la piel con la exposición a las radiaciones ultravioletas solares*, Revista Habanera de Ciencias Médicas, Vol. 3, N°9, Cuba.

Fernández J, Jiménez C, Fonfria J. (2004). *Las quinas de Caldas*. Actas VIII del Congreso de la Sociedad Española de la Historia de las Ciencias y las Técnicas, Madrid, España.

García A. (2001). *Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo*. BAEYENS WRG; ZHANG X; ALÉS F. University of Granada, Faculty of Sciences, Dept. of Analytical Chemistry, Granada, Spain, *Ars Pharmaceutica*, 42:1; 81-107, 2001

García Nava, M. J. (2007). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. Memorias del Programa verano de la Ciencia.

Guerra-Tapia, A., & Gonzalez-Guerra, E. (2014). *Hair Cosmetics: Dyes*. *Actas Dermosifiliográficas (English Edition)*, 105(9), 833-839.

Gigout, S., Louvel, J., Kawasaki, H., et al. (2006). Effects of gap junction blockers on human neocortical synchronization. *Neurobiology of Disease* 22(3):496-508.

Gimenez, A. (2002). *Normas para medicamentos naturales, tradicionales y homeopáticos. In Perfil de la situación actual de la medicina tradicional y complementaria en Bolivia* (14-14).

Golfen M., Toro A. & Robles J. (2008). *Evaluación electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la Bauhinia guianensis var. Kuntiana Aubl.* Rev Soc Quím Perú. 74 (4)

Gómez, J. F., Saiach, S., & Lecuna, N. (2000). *Envejecimiento.* Revista de Posgrado de la Cátedra vía Medicina, (100), 21-23.

Gonzalo, J. R., & Alonso, M. G. (2002). *Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante.* Alimentación Nutrición y Salud, 9(2), 31-38

Gupta, M. P., & Calderón, Á. (2006). *Estado del arte sobre utilización industrial de plantas medicinales en la Región Andina.* Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN), Facultad de Farmacia, Universidad de Panamá

Herane M. (2001). *Vitamina C tópica: usos en dermatología / Topic vitamin C: use in dermatology;* 17(3):191-196, 2001

Honorato J. (2009). *Los procesos de Aplicación y oxidación en el envejecimiento de la piel.* Simposio Satélite La Roche Posay, XXI reunión del Grupo español de dermatología Cosmética

- Ibarra, R. G. (2007). *Una visión a la terapia antimalarica tradicional y actual desde el descubrimiento hasta su posible desarrollo*. Departamento de Farmacia – Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Cartagena-Campus de Zaragocilla Cartagena Colombia. *Scientia et Technica*. Año XIII, No 33, UTP. ISSN 0122-1701 5
- Itoh, F., Takasaki, W., Sasaki, T., et al. 2006. Species differences in enantioselective 2-oxidations of RS-8359, a selective and reversible MAO-A inhibitor and cinchona alkaloids by aldehyde oxidase. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 27(3):133-139.
- Jäger H, Tye A, Kowarik I. (2007). *Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (Cinchona Pubescens Vahl) trees on native vegetation in Galápagos*. *Biol Conservation* 140: 297 – 307
- Jaramillo, T., Cornejo X. and Pitman. N. (2004). *Cinchona rugosa*. En: *IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2012.2. www.iucnredlist.or* Agosto 2014
- Jimenez M. (1847). *Farmacopea Francesa*.- Codex, 2da edición
- Jørgensen, P., Ulloa U, C., Madsen, J., Valencia R., Churchill, S., Balslev, H., & Luteyn, J. L. (1995). *A floristic analysis of the high Andes of Ecuador*. In *Biodiversity and conservation of Neotropical montane forests. Proceedings of a symposium, New York Botanical Garden, 21-26 June 1993* (pp. 221-237). New York Botanical Garden.
- Jørgensen P. & León-Yáñez S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 75: i–viii, 1–1182.

Jungmin O, Heonjoo J, Reum Cho A, Sung-Jin K, Jaejoon H (2013). Food Control vol. 31. p. 403-409

Jun, X., Shuo, Z., Bingbing, L., Rui, Z., Ye, L., Deji, S., & Guofeng, Z. (2010). Separation of major catechins from green tea by ultrahigh pressure extraction. International journal of pharmaceutics, 386(1), 229-231

Juvé J. (2007) *Emulsiones en Dermofarmacia*. Unidad de Tecnología Farmacéutica, Facultad de farmacia, Universidad de Barcelona, Aula de Farmacia, pag 58

Lamba, S. S., Buch, K. Y., Lewis, H. and Lamba, J. 2000. *Phytochemicals as potential hypoglycemic agents*. Studies in Natural Products Chemistry 21(2):457-496.

Lee FY, Lee SD & Tsai TT (1991). *A randomized controlled trial of quinidine in the treatment of cirrhotic patients with muscle cramps*. J Hepatol, 12:236-240.

Leete E. (1969). *Biosynthesis of Quinine and Related Alkaloids*. Acc Chem Res 2: 59 – 64

León, S. G. (2010). ¿ Qué eficacia real tienen las cremas antiarrugas?

Lewin G, (1994). *"Photochemiluminescent detection of antiradical activity III: a simple assay of ascorbate in blood plasma"*, J Biochem Biophys Methods, 28, 277

Lorea, F., & Riba, R. (1990). *Guía para la recolección y preparación de ejemplares para herbario de pteridofitas*. Consejo Nacional de la Flora de México, AC.

Llorens Molina, J. A. (2012). *Cromatografía en capa fina*

Loayza, K., De Oliveira, B. H., Córdor, E., & Reyna, V. (2010). *Estudio Químico de los Tallos de Cinchona Pubescens Vahl. Chemical Study of cinchona Pubescens Stems*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú. *ECIPERU*, 19

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2004). *100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo*. Una selección del Global Invasive Species Database, IGrupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI), Auckland, Nueva Zelanda.

Lozada, S. M., & Rueda, R. (2010). *Envejecimiento cutáneo*. Reglamento de publicaciones, 10. Asociación Colombiana de Dermatología

McCalley D. (2002). *Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques*. *J Chromatograph A* 967: 1 - 19.

Madsen, J. E. (2002). *Historia cultural de la cascarilla de Loja*. Z. Aguirre M., JE Madsen, E. Cotton y H. Balslev (eds.), *Botánica Austroecuatorial—Estudios sobre los Recursos Vegetales en las Provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe*. Ediciones Abya Yala, Quito, 385-399.

Martinez S., Flórez, J., González J., Culebras J. & Tuñón M. (2002). *Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278 ISSN 0212-1611 CODEN NUHOEQS.V.R. 318

Martinez S., Gonzalez J., Culebras J. y Tuñón M. (2002). *Los flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes*, Revista Nutrición Hospitalaria, Vol. XVII (6), pág. 271- 278

Mendoza H, Ramírez B, Jiménez LC., (2004). *Rubiaceae de Colombia. Guía ilustrada de géneros*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia

Mesa, A., Gavira C., Cardona F., Sáenz J., Blair S., y Rojano B. (2010). “*Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género Calophyllum*”. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 15(2), 13-26

Mesa, A., Quinto-Quinto A., & Blair, S. (2013). *Cuantificación de quinina en extractos de Cinchona Pubescens Vahl y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12(6).

Miranda M. (1995). *Estandarización de Plantas Medicinales y preparación de fitofármacos*. Facultad Farmacia- Alimentos. Universidad de la Habana

Murray J., Burch, J., Streilein, R., Iannacchione, M., Hall R. & Pinnell, S. (2008). *A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation.* Journal of the American Academy of Dermatology, 59(3), 418-425.

Nakagawa, T., & Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. Food and Chemical Toxicology, 40(12), 1745-1750.

Naranjo, M., Vélez, L. T., & Rojano, B. A. (2011). *Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades.* Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16(2), 164-173.

Norris S. (2011). *Surgeons Were "Highly Skilled," Study Finds.* National Geographic News, May 12, 2008

Oh, J., Jo, H., Cho, A. R., Kim, S. J., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. Food Control, 31(2), 403-409.

Ohman, H., & Vahlquist, A. (1994). In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. Acta dermato-venereologica, 74(5), 375-379.

Padilla F, Rincón A. & Bou-Rached L. (2008). *Contenido de olifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces.* Archivos Latinoamericanos de nutrición, 14-15

Paredes F., Roca J. (2002). *Influencia de los Radicales Libres en el Envejecimiento Celular* Offarm: Farmacia y Sociedad, 21(7), 96-100.

Pareja, B. (1996). *El envejecimiento y los radicales libres*. Folia Dermatológica Peruana (sitio en Internet), 7(2)

Philip S., Christina A. Bailey (1998). *Química Orgánica: Conceptos y Aplicaciones*. Pearson Educación

Pérez G. (2003). *Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 22(1), 0-0.

Pollito, P. A. Z., & Tomazello Filho, M. (2006). *Cinchona amazonica Standl:(Rubiaceae) no estado do Acre, Brasil*. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais, 1(1), 9-18.

Popov L. & Lewin G. (1996). "Photochemiluminescent detection of antiradical activity: testing of lipid-soluble antioxidants", J Biochem Biophys Methods, 31, 1-8

Popov L. & Lewin G. (1999). "Oxidants and Antioxidants Part B - Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique", Methods in Enzymology, 300, 437-456

Popov L & Lewin G. (1987). Baehr, R. "*Photochemiluminescent detection of antiradical activity. Assay of superoxide dismutase*", Biomed Biochim Acta 46, 775-779

Puigbo J., (2012). *La fragu de la Medicina y de la Cardiología*, Segunda Edición, Ateproca, Caracas Venezuela

Pukrittayakamee, S., Wanwimolruk, S., Stepniewska, K., et al.2003. *Quinine pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in uncomplicated falciparum malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(11):3458-3463.

Rea R., Pellegrinia N., Proteggentea A., Pannalaa A., Yanga M, Rice-Evans C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* Elsevier

Raffauf, R. F., Le Quesne, P. W., & Ghosh, P. C. (1977). *Antitumor Plants. V. Constituents of Cinchona Pubescens.* Lloydia, 41(5), 432-434.

Ravishankara, M, Shrivastava, N., Padh, H., & Rajani, M. (2001). *HPTLC method for the estimation of alkaloids of Cinchona officinalis stem bark and its marketed formulations.* Planta medica, 67(3), 294-296.

Ravishankara, M. N., Shrivastava, N., Padh, H., & Rajani, M. (2002). *Evaluation of antioxidant properties of root bark of Hemidesmus indicus R. Br (Anantmul).* Phytomedicine, 9 (2), 153-160

- Reyes A. & Carrillo M. (2011). *Antioxidantes: La magia de lo natural*. Tlatemoani, (8).
- Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Benoit-Vical F, Meunier B. (2002). *Recent Advances in Malaria Chemotherapy*. J Chin Chem Soc 49: 301 – 310
- Sánchez-Saldaña, L. (2008). Medicamentos antiguos y vigentes en Dermatología. *Dermatol Perú*, 18, 249-287.
- San Gregorio M., (2013). *Farmacopea Española*. Primary Source Edition Imprenta Nacional (Madrid) Biblio Bazaar
- Robertson, N., Hale, W., Mackler, L. and Poddar, S. (2005). *Clinical inquiries. Does quinine reduce leg cramps for young athletes?* The Journal of Family Practice 54(1):76-78.
- Secretaría General de la Comunidad Andina, (2012). *Gaceta Oficial del Acuerdo de Cartagena, Resolución 1482*, Año XXIX, Número 2068
- Shite J, Qin F, Mao W, Kawai H. & Stevens SY (2001). *Antioxidant vitamins attenuate oxidative stress and cardiac dysfunction in tachycardia – induced cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 38(6), 1734-1740.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T., Settle, F. A., Rubinson, K. A., Rubinson, J. F., & Chasteen, T. G. (2002). *Principios de análisis instrumental. México 2008*.

Sokolow, M. (1951). *The present status of therapy of the cardiac arrhythmias with quinidine*. American Heart Journal 42(5):771-797

Sotelo D., Casas F., Camelo M. (2010). Borojó (Borojoa patinoi): *Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana*. Vitae, 17(3), 329-336.

Stell, R. (1982). *Flores para el Rey*, Ed del Serbal, Barcelona

Tyler V. (2013). *Natural products and medicine: an overview*. Medicinal resources of the tropical forest, Columbia University Press, New York, 1-10.

Universidad Degli Studi di Ferrara- Italia (2014). Ambrosia Lab srl Via Mortara 44121 Ferrara e' una iniziativa dell' Università degli Studi di Ferrara
alabcustomer@ambrosialab.com

Uribe R. (2013). *Cromatografía*. Universidad de Antioquía. Toxicología Clínica

Vargas, F., Rivas, C., Cortez, M., Zoltan, T., Izzo, C., López, V. & Cárdenas, Y. M. (2007). *Protectores solares ¿fotoestables o fototóxicos?*. Dermatología Venezolana, 45(3).

Villanueva-Tiburcio, J. E., Condezo-Hoyos, L. A., & Asquieri, E. R. (2010). *Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (Myrciaria dubia (HBK) McVaugh). Food Science and Technology (Campinas), 30, 151-160*

Vanegas A., Quinto A., Blair S., (2013). *Cuantificación de Quinina en Extractos de Cinchona pubescens y Evaluación de la Actividad Antiplasmodial y Citotóxica*, Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia, 12(6): 592 – 602

Verpoorte, R. et al., (1988). “*Cinchona Alkaloids*”, in: Brossi, A. (Ed), the Alkaloids. Chemistry and Pharmacology, Ac. Press, Inc., Vol 34: 331-334; 358-369.

Verpoorte, R. et al., (1982). *The effects of plant growth regulators and culture conditions on the growth and the alkaloid content of callus cultures of Cinchona Pubescens*. Planta Médica 46: 15-18

Verpoorte, R. et al., (1984). *Identification of alkaloids and anthraquinones in Cinchona pubescens Callus cultures; the effect on plant growth regulators and light on the alkaloid content*. Planta Médica, 50: 17-20.

Villamañán, E., Armada, E., & Ruano, M. (2014). *Prolongación del intervalo QT inducido por fármacos ¿conocemos sus riesgos?* Medicina Clínica.

Vipan K, Mahajan A, Chibale K., (2009). *Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products*. Bioorg Med Chem 17: 2236 – 2275

Vivanco J. (2010). *Desarrollo y aplicación del procedimiento para el cambio de tubería en el poliducto Esmeraldas-Quito (tramo Santo Domingo Beaterio) por deterioro de la misma en el año 2009*. Tesis de tecnología, Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de ciencias de Ingeniería. Quito.Ecuador

WHO (World Health Organization), (2011). *World Malaria Report 2011*. Ginebra, Suiza

Wijnsma R., J.T.K.A. Go, Harkesa P, Verpoorte R.,Baerheim A., (1986). *Anthraquinones in callus cultures of Cinchona pubescens*, volume 25, Issue 5, Pages 1123

Wink M. (1999). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*; Annual Plant Reviews, volumen 2. ed. Sheffield academic Press.

Wolf, R., Baroni, A., Greco, R., et al. 2003. Quinine sulfate and HSV replication. *Dermatology Online Journal* 9(3):3.

Zevallos, Percy (1989). *Taxonomía, Distribución Geográfica y Status del Género Cinchona en el Perú*. Lima CDC-UNALM.

Ziosi P., Manfredini S. & Vertuani S. (2010). *Evaluating essential oils in cosmetics: antioxidant capacity and functionality*; *Cosmetics and toiletries* 2010, 125 (6)

Zorrilla G (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Bioméd* [online]. 2002, vol.21, n.3,pp. 178-185

Abrutyn E. (2011). *Antioxidantes en la Prevención de Arrugas*. *Cosméticos & Tecnología Latinoamérica*. Estados Unidos 2 (09-10). En: www.cosmeticsonline.la , noviembre 2014.

ALEGSA, 2014. Diccionario de ALEGSA, Santa Fe, Argentina. En: <http://www.definiciones-de.com>, marzo 2014

European Commission Health and Consumers CosIng, En: <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>. Enero 2014

Google Maps. (2014). *Ubicación Estación de bombeo de Petrocomercial “El Corazón”* En: <https://www.google.com.ec/maps/>

Gotlib N, Perez S & Muhafra D, 2015. “Dermato Estética “, Exfoliación- Enfoque Químico- Suscrito por la Dra. María Cristina Uezen. En www.uezenpharma.com/notapeelings.pdf, marzo 2015

Nadinic J, 2009 Fitocosméticos. Más productos con atributos naturales parte 1. Revista Safybi (2009) 124:56-57. En: <http://www.profitocoop.com.ar/articulos/fitocosmetica%20para%20profitocoop.pdf>

Neitze K. (2011). “*Global Invasive Species Database 2011*”. En: <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=63>>. Fecha de consulta: 10 April 2014

Rigano L. (2010). Distanti ISPE - Institute of Skin and Product Evaluation, Milan, Italia. En: http://www.cosmeticsonline.la/artigos_te.../ART_ctladi12_2.pdf

Ruiz S. (2012). Nutrientrena. En: http://nutrientrena.blogspot.com/2012_11_01_archive.html, Diciembre 2014

Estación de bombeo de Petrocomercial “El Corazón” Transporte de Derivados a través de poliductos En: http://www.eppetroecuador.ec/idc/groups/public/documents/peh_otros/000579.pdf

García M. (2014). *Fitoquímicos: Nutrientes del Futuro*. En: <http://www.casapia.com/informaciones/Fitoquimicos-Nutrientes-Futuro/Fenoles.htm>, Enero 2014

DECISIÓN 516 de 2002. Armonización de Legislaciones en materia de Productos Cosméticos. COMISIÓN DE LA COMUNIDAD ANDINA.

ANEXOS

Anexo 1.-Recolección y Preparacion de muestras para Herbario

Fuente. José María Cardiel. Universidad Autónoma de Madrid

**INSTRUCCIONES PARA LA RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE
MUESTRAS DE HERBARIO (PLANTAS VASCULARES) – v. 2.1**

"Las colecciones de especímenes vegetales son esenciales para la investigación taxonómica. Éstas circunscriben a las especies y documentan su variabilidad, constituyen las fuentes primarias para los estudios florísticos, y sirven como testigo de referencia para las investigaciones experimentales. Los materiales vegetales deben ser preparados y preservados con mucho cuidado, ya que los especímenes de herbario se convierten en un registro permanente, el cual examinarán más tarde los investigadores" (S.B. Jones, Sistemática vegetal, McGraw-Hill. 1988)

A. Material para la recolección

Para obtener un óptimo rendimiento en las excursiones botánicas, el colector debe disponer de los siguientes elementos:

- o Cuaderno de campo (es recomendable hacer las anotaciones a lápiz o con tinta indeleble).
- o Lupa tipo cuentahilos.
- o Azadilla, navaja y/o tijeras de podar.
- o Bolsas de plástico de diversos tamaños.
- o Prensa de campo con pliegos de papel de periódico (en el caso que las muestras se preparen *in situ*).
- o Guías de campo y mapas topográficos, geológicos, etc. de los lugares que se van a visitar.

B. Procedimiento de recolección

Se deben coleccionar ejemplares lo más completos posible:

- Los pteridófitos deben tener, al menos, una fronde completa y con esporangios, y un fragmento de rizoma (bien limpio de tierra).
- Las gimnospermas deben tener, al menos, una rama con estructuras reproductoras (conos masculinos, femeninos o pseudofrutos).
- Las angiospermas anuales o de pequeño porte se recogerán completas (con raíces, rizomas, bulbos etc.).
- Los hemipterófitos (plantas con roseta basal de hojas) deben tener, al menos, una hoja de la roseta basal, además de varias hojas caulinares.
- De árboles y arbustos se recogerá una rama representativa con flores y/o frutos.

Las muestras se guardan en bolsas de plástico se cierran, y deben ir acompañadas de un número de referencia. Las plantas vasculares de pequeño porte o especialmente delicadas es muy aconsejable colocarlas en pliegos de papel y transportarlas en una prensa de campo. Es muy importante que el material se preñe el mismo día que se ha recolectado para evitar su deterioro.

C. Anotaciones del cuaderno de campo

De forma paralela a la recolección, en el cuaderno de campo se debe anotar la siguiente información para cada ejemplar colectado:

- Número de referencia. Es aconsejable una numeración consecutiva
- Fecha.
- Localidad exacta e inequívoca -muy importante- y, si es posible, altitud y coordenadas geográficas.
- Ecología: datos sobre topografía, exposición, substrato, tipo de suelo, influencia antropozoógena, etc.
- Nombre científico del taxón (al nivel que se conozca).
- Tipo de vegetación, distribución, abundancia en el entorno, plantas acompañantes, etc.

- Caracteres morfológicos **no reflejados en las muestras** (altura o dimensiones en el caso de plantas leñosas), o que puedan perderse durante la preparación (morfoloía floral, coloraciones, olor, etc.).
- Cualquier otra información que consideremos de interés sobre el ejemplar (por ejemplo usos locales) o sobre el área de colección (por ejemplo estado de conservación).

El colector o colectores son los responsables de la información que acompaña cada ejemplar, por ello su nombre ha de figurar siempre asociado a estos datos.

D. Secado de las muestras

Cada ejemplar se incluye en un pliego de papel secante (el papel de periódico no satinado es ideal), que se apilan intercalando pliegos vacíos similares. Cada pliego debe llevar siempre el número de referencia que lo asocia a los datos de campo. Las pilas de pliegos se someterán a prensado el tiempo necesario hasta el completo secado de los ejemplares.

Las prensas pueden ser de tornillos, o bien prensas de mano formadas por dos planchas de madera o metal atadas mediante correas. También puede servir la colocación de objetos pesados sobre los pliegos.

Los pliegos húmedos se cambiarán periódicamente (cada dos o tres días) por otros secos. El primer cambio se aprovechará para extender adecuadamente el material mejorando su presentación definitiva y procurando que conserven, en la medida de lo posible, su aspecto primitivo. La duración del prensado depende del clima y la cantidad de agua que posean las muestras. Puede variar entre una y tres semanas.

Los frutos carnosos, bulbos, etc. es conveniente seccionarlos para facilitar el secado, o incluso separarlos de la planta. Las muestras cuyo tamaño exceda las medidas del pliego se acoplarán doblándolas o cortándolas en piezas más pequeñas. No es recomendable sobrecargar los pliegos, pues se alarga el secado y aumenta el riesgo de enmohecimiento. Antes de secar una muestra debe estar perfectamente limpia de tierra u otros restos adheridos. Las plantas con raíces, rizomas o bulbos, éstos se lavarán cuidadosamente para eliminar por completo la tierra adherida.

Se ha de procurar que las estructuras reproductoras queden bien visibles. Las hojas deben poder observarse por el haz y envés.

E. Preparación y montaje de las muestras

Una vez perfectamente secas, las plantas se montarán en pliegos de cartulina blanca de tamaño **28 x 42** cm, fijándolas al mismo mediante tiras de papel adhesivo o esparadrapo de papel. No se debe usar "celo". Las tiras se situarán preferentemente sobre las ramas, evitando ocultar estructuras reproductoras. Se procurará dejar un espacio libre en la esquina inferior-derecha para el colocar la etiqueta.

Para evitar su deterioro se recomienda cubrir cada pliego con una hoja de papel fino, pegada por un lateral.

E. Etiquetado definitivo

En la esquina inferior-derecha de los pliegos se adherirá una etiqueta de papel de aproximadamente **8 x 12** cm. Debe contener la siguiente información, en el orden citado:

- Nombre científico (si el ejemplar no está identificado se dejará el espacio en blanco).
- Familia (si no se conoce se dejará también el espacio en blanco).
- Lugar de colección lo más preciso y objetivo posible, de modo que el ejemplar pueda ser localizable. La información de localidad se dará en el siguiente orden: país, provincia, municipio, localidad específica.
- Altitud y coordenadas UTM (si se conocen o puede consultarse).

- Datos ecológicos: tipo de medio, sustrato, etc.
- Observaciones: caracteres no reflejados en las muestras (altura estimada de árboles y arbustos, olor, colores que puedan perderse, etc.). No se debe incluir información que sea evidente al observar el ejemplar prensado.
- Nombre del colector o colectores que legitiman el ejemplar (Leg:), acompañado del número de referencia y fecha de recolección.
- Nombre del identificador (Det:) y fecha de la identificación. Si el ejemplar no está identificado se dejará este espacio en blanco.

Los ejemplares que no tengan, al menos, la información indicada con: ●, carecen de valor.

Modelo de etiqueta

<p><i>Juniperus communis</i> L.</p> <p>Fam.: Cupressaceae</p> <p>ESPAÑA: Provincia de Segovia, Sierra de Guadarrama, municipio de el Pausal, Puerto de Cotos, 1.860 m. En bosque de <i>Pinus sylvestris</i>, en ladera orientada al norte. Sustrato ácido.</p> <p>Arbusto rastrero de c. 30 cm de altura. Pseudofrutos azul-negruzcos</p> <p>Leg.: José Cuatrecasas nº: 3520, 20-X-1958. Det.: Salvador Talavera, 15-IX-1998.</p>

G. Determinación

La determinación de las colecciones puede hacerse indistintamente con el material fresco o seco. En este último caso para la observación de ciertos caracteres puede ser necesaria la rehidratación de algunos órganos, lo que se consigue fácilmente humedeciéndolos unos minutos o hirviéndolos muy ligeramente en agua jabonosa.

ÉTICA DEL COLECTOR

En ocasiones se ha criticado la realización de herbarios por su incidencia en la conservación de algunas especies vegetales. Existen especies que se han extinguido en algunas zonas debido a una recolección inconsciente. Estos impactos pueden, en gran medida, minimizarse si el colector se atiene a un adecuado código de conducta.

Es esencial que los colectores sean conservacionistas conscientes y tengan buen juicio para no coleccionar plantas raras o poco comunes, así como para causar el mínimo daño posible al suelo y la vegetación. No se coleccionará en parajes protegidos donde esta actividad esté prohibida. En general nunca se debe desenraizar la única planta de una especie que se observe en una localidad.

Anexo 2. Recolección de *Cinchona Pubescens* Vahl

Fuente: Recolección realizada por el Biólogo Augusto Sola- Universidad Católica del Ecuador



Anexo 3. Identificación *Cinchona Pubescens* Vahl Herbario Universidad Católica del Ecuador

Fuente. Botánico Alvaro. J. Perez. Universidad Católica del Ecuador

Quito, 21 de Octubre de 2014

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

***Cinchona pubescens* Vahl**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl
- Familia: Rubiaceae Juss.
- Tribu: Cinchoneae DC:
- Género: *Cinchona* L.
- Especie: *pubescens* Vahl.
- Nombre común: cascarilla


Álvaro J. Pérez *

Curador de Angiospermas Herbario QCA

Anexo 4. *Cinchona Pubescens* Vahl y *Camellia Sinensis* pulverizado y seco



Anexo 5. Obtención del Extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl por Percolación





Anexo 6. Eliminación del solvente del extracto *Cinchona Pubescens* Vahl por filtración al vacío



Anexo 7. Equipo para eliminación del exceso de solvente. Rotavapor



Anexo 8. Estufa para evaporación de exceso de solvente y obtención de extracto seco



Anexo 9. Balanza para pesaje



Anexo 10. Desecador para almacenaje de extracto seco



Anexo 11. Nebulizador



Anexo 12. Espectrofotómetro marca (Shimadzu UV mini 1240) para análisis del Fenólicos Totales, Flavonoides totales, DPHH y ABTS





Anexo 13. Muestras para Espectrofotómetro marca (Shimadzu UV mini 1240) para análisis del DPHH y ABTS

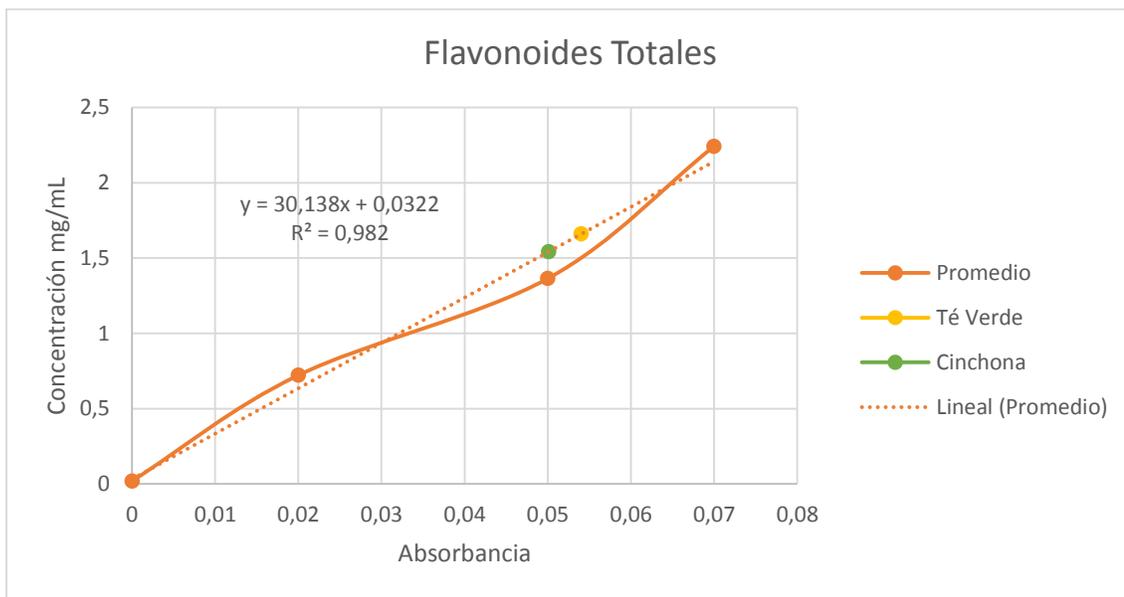


Anexo 14. Curva de Calibración Flavonoides totales

STD Hiperóxido [mg/mL]	Absorbancias					
	A1	A2	A3	Sumatoria ΣA	Apromedio \bar{A}	Desviación \square
0	0,001	0,002	0,002	0,005	0,002	0,001
0,02	0,723	0,725	0,718	2,166	0,722	0,004
0,05	1,37	1,363	1,36	4,093	1,364	0,005
0,07	2,247	2,241	2,239	6,727	2,242	0,004

x	A1	A2	A3	Sumatoria ΣA	Apromedio \bar{A}	Desviación \square
---	----	----	----	-------------------------	------------------------	-------------------------

<i>Camellia Sinensis</i>	1,667	1,661	1,653	4,981	1,6603	0,0070
<i>Cinchona Pubescens</i> Vahl	1,546	1,541	1,54	4,627	1,5423	0,0032



Anexo 15. Reactivos DPPH y ABTS



Anexo 16. Agitador de Hélice



Anexo 17. Potenciómetro



Anexo 18. Fichas técnicas materias primas (Polawax, Brij S2 y Alcohol cetílico)

Polawax

Nonionic emulsifying waxes

Polawaxes are well-established nonionic emulsifying waxes which have been used successfully in the personal care and pharmaceutical industries for many years. As optimised combinations of vegetable-derived emulsifiers and stabilisers the Polawax proprietary blends offer formulators quick and reliable solutions to a wide variety of emulsification problems.

Due to their versatility Polawaxes can be used in both skin and hair care systems, producing emulsions with excellent texture and stability. In skin care products the formation of liquid crystals within the emulsion promotes 'time release' hydration, and also functions as a slow release delivery mechanism for actives.

Using Polawax as the emulsifying system reduces the development time for new product innovations and minimises raw material inventories, thereby lowering costs overall. Two grades are available¹:

Product	Appearance	Function
Polawax GP200	White powder	General purpose emulsifying wax
Polawax HF	Yellow pastilles	General purpose emulsifying wax conforming to United States National Formulary monograph

¹ Polawax A31, an emulsifying wax developed for use in aerosol quick-breaking foams, is also available. Please refer to the personal care sales department for further details.

Functional benefits

- mild, oil-in-water self-bodying emulsifiers
- liquid crystal formation promotes 'time-release' hydration
- emulsions represent stable vehicles for the delivery of most actives over a wide pH range
- excellent ambient and high temperature stability
- emulsions show good long-term storage stability
- electrolyte tolerant
- no neutralisation required

Applications

Skin care

- moisturising creams and lotions
- sun protection systems
- aftersun products
- sunless tanning creams and lotions
- AHA/BHA creams
- baby creams and lotions
- night creams
- anti-wrinkle creams
- pharmaceutical ointments and bases
- depilatories
- antiperspirants/deodorants

CRODA

Croda Chemicals Europe Personal Care Cowick Hall South Coole East Yorkshire DN14 9AA England
Tel +44 (0)1405 860331 Fax +44 (0)1405 860365 E-mail gc-europe@croda.com www.croda.com/europe/pc

Polowax creams and lotions represent stable formulation bases for a wide range of moisturising skin products, sunscreens, baby care systems and speciality treatment products. As inert bases Polowax emulsions are ideal delivery systems for low and high pH actives, including alpha hydroxy/beta hydroxy acids in facial treatments, aluminium salts in antiperspirants/deodorants and thioglycolates in hair removal products. In the healthcare sector, Polowax NP in particular has a long history of safe use as an emulsion base for the topical delivery of pharmaceutical actives.

Hair care

- hair conditioners
- cream rinses
- hair bleaches
- chemical hair relaxers/straighteners
- hair colorants

Polowax emulsions are equally valuable in the formulation of hair care products. Their stability in low and high pH environments makes them suitable bases for conditioners using cationic conditioning agents, hair bleaches, ethnic hair relaxer systems and hair colorants.

Emulsion stability

Scientific research has shown that emulsion stability is linked to the formation of lamellar phases (liquid crystals) in which the emulsifier is arranged in bilayers incorporating large quantities of water¹. The swollen lamellar liquid crystalline phases form a rheological barrier to coalescence, reducing the van der Waals forces of attraction between the dispersed oil droplets. Figure 1 shows the liquid crystals and lamellar gel phase produced by a typical Polowax NP emulsion.

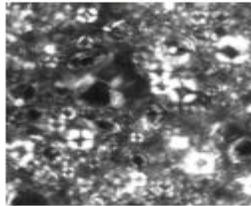


Figure 1 Photomicrograph of Polowax NP emulsion showing liquid crystals. Lamellar gel phase appears as rigid matrices around oil droplets

CRODA

Croda Chemicals Europe Personal Care Cowick Hall South Gole East Yorkshire DN14 5AA, England
Tel +44 (0)1405 860331 Fax +44 (0)1405 860205 E-mail gc-europe@croda.com www.croda.com/europe/p/c

10/01

02/09 2012/07

"Time release" moisturisation and delivery of actives

In addition to their enhanced stability, liquid crystal emulsions are of particular interest for the controlled delivery of moisture and active substances. The entrapped layers of water in the lamellar gel network act as a moisture reservoir, which is less prone to evaporation. This effect may prolong skin hydration for up to several hours. In addition, it is believed that water-soluble active substances eg vitamins, drugs, held within the water pockets, are progressively released to provide a controlled delivery system. The presence of lamellar liquid crystalline multilayers may similarly slow down the release of actives dissolved in the oil droplets by reducing interfacial transport².

Formulating

Polowaxes are self-bodying emulsifying waxes which can be used to produce high or low viscosity emulsions, depending upon the concentration employed. At lower concentrations (2-3%) fluid emulsions are easily produced, and may be supplemented with nonionic, anionic or cationic emulsifiers for enhanced stability. At higher concentrations (5-10%) Polowaxes can produce more viscous systems showing excellent long-term stability, without the inclusion of additional surfactants, fatty alcohols or waxes.

Polowaxes are suitable for the emulsification of most commonly used oils, fats and waxes including vegetable and mineral oils, essers and others; emulsions are stable in both acidic and alkaline media and tolerate high levels of electrolytes.

Polowaxes possess excellent heat stability and are recommended for the preparation of creams and lotions which require autoclaving. Polowaxes exhibit no loss in performance on heating to 150°C for two hours. There is only minor desorption in colour with a 2-3% loss in weight and slight hardening of the product.

Health and safety

Polowax GP200 and Polowax NP are well established cosmetic and pharmaceutical raw materials; they are non-toxic on ingestion and essentially non-irritating to skin and eyes.

INCI names

Polowax GP200 and Polowax NP are proprietary products. Please refer to the personal care sales department for nomenclature for labelling purposes.

References

1. G.F. Eccleston, Multiple-phase oil-in-water emulsions, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 41, 1-22 (January/February 1990)
2. P. Loh, Liquid crystals in cosmetic emulsions, *Cosmetics and Toiletries Manufacturing Worldwide*, 108 - 116 (1994)

Disclaimer

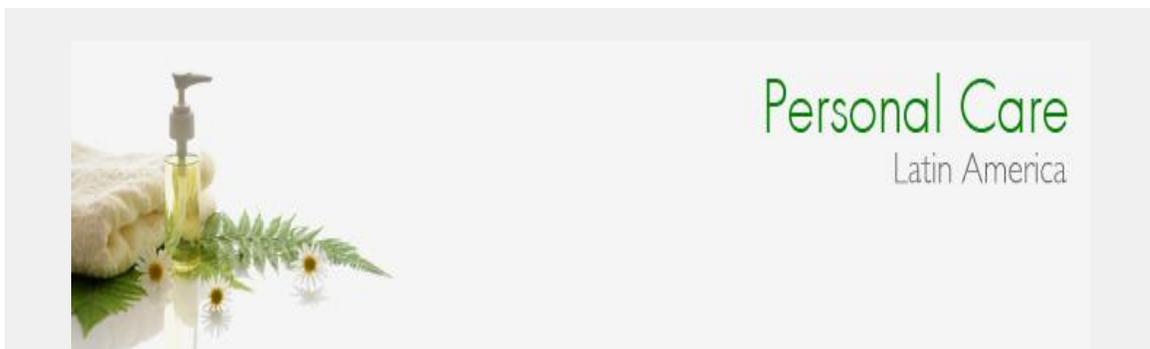
Where necessary, further is given in good faith. Croda Chemicals Europe Ltd and its associated companies cannot assume any liability expressed or implied in the presentation of this data, nor should information furnished herein be received as granting licence or providing any methods of implementation of process involving third or other parties.

CRODA

Croda Chemicals Europe Personal Care Cowick Hall South Gole East Yorkshire DN14 5AA, England
Tel +44 (0)1405 860331 Fax +44 (0)1405 860205 E-mail gc-europe@croda.com www.croda.com/europe/p/c

10/01

02/09 2012/07



Brij™ S2 e Brij S721

Brij S2 y Brij S721 son éteres polioxietileno grasos derivados de alcoholes estearílico diseñada para emulsionar y producir dispersiones estables de materiales cosméticos. Debido a sus diferentes valores de HLB, Brij S2 y Brij S721 funciona bien en combinación unos con otros para producir emulsiones estables de aceite en agua.

Por favor [ingresa](#) a la Extranet de clientes directos de Croda para saber mas acerca de estos productos.

Chemical description

Polyoxyethylene (2) stearyl ether

Old tradename

Brij™ 72

Product description

Brij S2 is a naturally derived alcohol ethoxylate. It can be utilised in emulsifier systems where a low HLB value is required.

Functions

- W/O emulsifier
- Wetting agent

Typical properties

Typical properties

Property		Regulatory	
Surfactant type	Nonionic	REACH status	REACH registration required
HLB	5	EPA status	910, 930
Cloud point	Insoluble		
Physical form at 25°C	Solid		

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

ALCOHOL CETÍLICO

Sinónimos:	1-Hexadecanol. Alcohol palmítico. Cetanol.
INCI:	Cetyl alcohol.
Formula Molecular:	$C_{16}H_{34}O$
Peso Molecular:	242,44
Descripción:	Se trata de una mezcla de alcoholes alifáticos sólidos, cuyo componente principal es el alcohol cetílico. Normalmente se obtiene por saponificación del espermaceti o esperma de ballena (grasa de las cavidades del cráneo de las ballenas), o por hidrogenación catalítica de los triglicéridos del aceite de coco o de grasas animales.
Datos Físico-Químicos:	Polvo, masa untuosa, copos o gránulos, blancos o casi blancos. Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble o bastante soluble en etanol al 90%, fundido es miscible con aceites, parafina líquida o lanolina fundida. Punto de fusión: 45-52°C (49°C si fuera puro).
Propiedades y usos:	<p>Base anhidra que aunque es insoluble en agua es capaz de fijar agua (hidrófila) formando emulsiones W/O, por lo que puede incorporar sustancias solubles en agua. Habitualmente estas emulsiones no son lavables.</p> <p>Una mezcla de 19 partes de vaselina flante y 1 de alcohol cetílico absorbe un 40-50% de su peso en agua (cantidad que aumenta al añadir lanolina 10%).</p> <p>Es un emulgente de HLB bajo, que aumenta la estabilidad de las emulsiones.</p> <p>No es irritante.</p> <p>Tiene acción emoliente por impedir la desecación de la epidermis en su capa córnea al retardar la evaporación del agua de la superficie cutánea, quedando la piel mas blanda y flexible.</p> <p>Se usa como constituyente de cremas y pomadas, especialmente en aquellas en las que se desea incorporar agua o una solución acuosa, teniendo la ventaja sobre la lanolina de no poseer olor desagradable.</p> <p>También se usa para aumentar la viscosidad de las cremas.</p> <p>Y en preparaciones tipo stick, se usa para aumentar el punto de fusión, para polvos como sobreengrasante, en lápices labiales, y como suspensor de pigmentos.</p> <p>Siempre se incorpora a las emulsiones en la fase grasa.</p> <p>Se usa en la preparación de supositorios para aumentar su punto de fusión y también en la preparación de formas sólidas de liberación retardada ya que forma una barrera</p>

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

permeable que las recubre. Mezclando 1 parte de alcohol cetílico con 15 partes de aceite de cacahuete, puede emplearse como una base de supositorios liposolubles. Es estable en presencia de ácidos, bases, luz, y aire; no enrancia.

Dosificación:	Por vía tópica: -Como emulsionante: 2 - 5 % -Como emoliente: 2 - 5 % -Como absorbente de agua: 5 % -Para dar consistencia: 2 - 10 %
Efectos secundarios:	Puede ser demoesensibilizante, ocasionando reacciones de hipersensibilidad generalmente originadas por impurezas que contiene.
Incompatibilidades:	Agentes oxidantes fuertes.
Conservación:	En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.
Ejemplos de formulación:	Base Beeler (BP)

Alcohol cetílico	6,4 %
Alcohol estearílico	5,4 %
Laurilsulfato sódico	1,5 %
Vaselina líquida	21,5 %
Vaselina filante	14,3 %
Agua purificada c.s.p.	100 g

Modus operandi:

En un vaso, fundir el alcohol cetílico y el alcohol estearílico, la vaselina filante y la líquida al baño maría. En otro vaso a la misma temperatura se mezcla el lauril sulfato sódico y el agua purificada. Una vez fundida la fase grasa y caliente la acuosa, ambas a simular temperatura (70 °C), verter la acuosa sobre la oleosa agitando hasta casi enfriamiento.

Pomada cetilica (FE-IX)

Alcohol cetílico	4 %
Lanolina	10 %
Vaselina filante	86 %

Modus operandi:

Fundir los componentes y agitar hasta homogeneización.

Excipiente lavable

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

Laurilsulfato sódico	2 %
Alcohol cetílico	21 %
Vaselina líquida c.s.p.	100 g

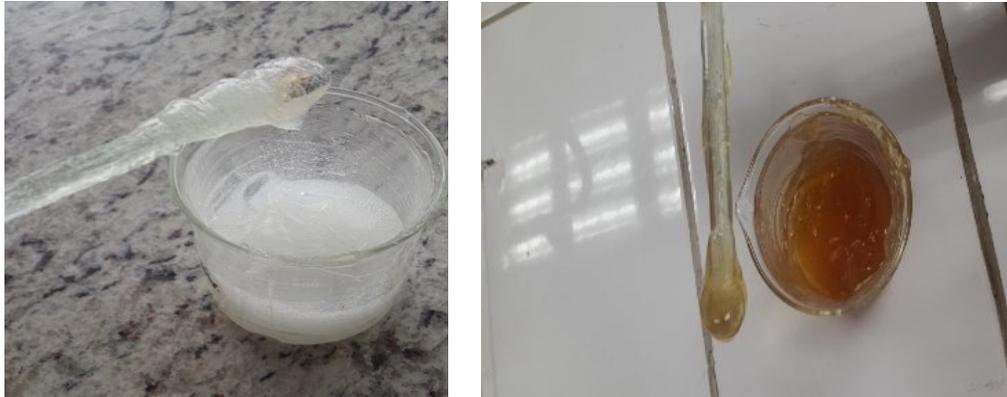
Excipiente emoliente lavable

Tween 80	2,5 %
Alcohol cetílico	15 %
Vaselina filante o Lanolina anhidra	15 %
Agua purificada c.s.p.	100 g

Bibliografía:

- *The Merck Index*, 13ª ed. (2001).
- *Formulación magistral de medicamentos*, COF de Vizcaya, 5ª ed. (2004).
- *Monografías Farmacéuticas*, C.O.F. de Alicante (1996).
- *La Formulación Magistral en la Oficina de Farmacia*, M.ª José Llopis Clavijo y Vicent Baixauli Comes (2007).
- *Formulario Magistral del C.O.F. de Murcia* (1997).
- *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 1986.

Anexo 19. Desarrollo de un gel Base y con Extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl y *Camellia Sinensis*



Anexo 20. Desarrollo de una emulsión Base y con Extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl



Anexo 21. Producto Terminado Crema con *Cinchona Pubescens* Vahl



Anexo 22. Estudio Físicoquímico de la Emulsión elaborada con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%



INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-FQ.17927

SA 19674a

Cliente:	BARUKCIC REVELO ANGELKA MARIA	Lote:	061114
Dirección:	CALDERON	Fecha Elaboración:	11/06/2014
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	06/05/2016
Muestra de:	COSMETICO	Fecha Recepción:	07/11/2014
Descripción:	CREMA ANTIOXIDANTE	Hora Recepción:	11:20
		Fecha Análisis:	10/11/2014
		Fecha Entrega:	11/11/2014
		Código:	----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Solido
Contenido Declarado:	100g
Contenido Encontrado:	----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

RESULTADO FISICO-QUIMICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
pH	----	3.65	MFQ-18	INEN 783



[Handwritten Signature]
Dr. Bladimir Acosta
GERENTE GENERAL

Anexo 23. Estudio Microbiológico de la Emulsión elaborada con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%



INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-MI.17926

SA 19673a

Cliente:	BARUKCIC REVELO ANGELKA MARIA	Lote:	061114
Dirección:	CALDERON	Fecha Elaboracion:	11/06/2014
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	06/05/2016
Muestra de:	COSMETICO	Fecha Recepción:	07/11/2014
Descripción:	CREMA ANTIOXIDANTE	Hora Recepción:	11:20
		Fecha Análisis:	07/11/2014
		Fecha Entrega:	17/11/2014
		Código:	----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	SEMISOLIDO
Contenido Declarado:	100g
Contenido Encontrado:	----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a muestras entregadas al laboratorio por el cliente

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
RECUESTO DE AEROBIOS TOTALES	UFC/g	20	MMI-01	AOAC 990.12
RECUESTO DE COLIFORMES TOTALES	UFC/g	<10	MMI-03	AOAC 991.14
RECUESTO DE MOHOS	UFC/g	<10	MMI-02	AOAC 997.02
RECUESTO DE LEVADURAS	UFC/g	<10	MMI-02	AOAC 997.02

Nota 1: UFC/g= unidades formadoras de colonia por gramo.

Dr. Bladimir Acosta
 GERENTE GENERAL

Anexo 24. Estudio Físicoquímico del Gel elaborado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%



INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-FQ.17928

SA 19674b

Cliente:	BARUKCIC REVELO ANGELKA MARIA	Lote:	061114
Dirección:	CALDERON	Fecha Elaboración:	11/06/2014
		Fecha Vencimiento:	06/05/2016
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Recepción:	07/11/2014
Muestra de:	COSMETICO	Hora Recepción:	11:20
Descripción:	GEL ANTIOXIDANTE	Fecha Análisis:	10/11/2014
		Fecha Entrega:	11/11/2014
		Código:	-----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Sólido
Contenido Declarado:	100g
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

RESULTADO FISICO-QUIMICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
pH	-----	5.2	MFQ-18	INEN 783



 Dr. Bladimir Acosta
 GERENTE GENERAL

Anexo 25. Estudio Microbiológico del Gel elaborado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%



INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-MI.17927

SA 19673b

Cliente:	BARUKCIC REVELO ANGELKA MARIA	Lote:	061114
Dirección:	CALDERON	Fecha Elaboracion:	11/06/2014
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	06/05/2016
Muestra de:	COSMETICO	Fecha Recepción:	07/11/2014
Descripción:	GEL ANTIOXIDANTE	Hora Recepción:	11:20
		Fecha Análisis:	07/11/2014
		Fecha Entrega:	17/11/2014
		Código:	-----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	SEMISOLIDO
Contenido Declarado:	100g
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a muestras entregadas al laboratorio por el cliente

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
RECUENTO DE AEROBIOS TOTALES	UFC/g	30	MMI-01	AOAC 990.12
RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES	UFC/g	<10	MMI-03	AOAC 991.14
RECUENTO DE MOHOS	UFC/g	<10	MMI-02	AOAC 997.02
RECUENTO DE LEVADURAS	UFC/g	<10	MMI-02	AOAC 997.02

Nota 1: UFC/g= unidades formadoras de colonia por gramo.



Dr. Bladimir Acosta
GERENTE GENERAL

Anexo 26. Estudio de Estabilidad Acelerada de la Emulsión elaborada con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%



ESTUDIO DE ESTABILIDAD

CC-FE-3110
SA 19673-19674-20836-20837-21722-21723

Cliente:	BARUKCIC REVELO ANGELKA MARIA		
Dirección:	CALDERON		
Muestra de:	Cosmético		
DESCRIPCION:	Crema elaborado con extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl		
Lote:	061114		
Fecha de Elaboración:	2014-06-11		
Fecha de Vencimiento:	2016-05-06		
Tamaño de la Muestra:	6 unidades de 100 g		
Material de Envase:	Envase plástico de PP y tapa PP		
Muestreado por:	El cliente		
Envejecimiento:	Acelerado	Temperatura:	30 ± 2 °C
		Humedad Relativa:	75 ± 5 %
Tiempo de Estudio:	Dieciocho meses.	Fecha de Inicio:	2014-11-07
		Fecha de Finalización:	2015-02-23

RESULTADOS

PARAMETROS	2014-11-07	2015-01-06	2015-02-23
Recuento de Aerobios Totales	20 UFC/g	40 UFC/g	60 UFC/g
Recuento de Coliformes Totales	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Recuento de Mohos	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Recuento de Levaduras	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
*pH (T: 21,8 °C)	3.65	3.66	3.68

Nota: Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE".

CONCLUSION: De acuerdo a los resultados obtenidos el periodo de vida útil del producto: **Crema elaborado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl** , es de Dieciocho meses acelerado.




Ing. Teresa Ramirez
DIRECTORA DE CALIDAD



Anexo 27. Estudio de Estabilidad Acelerada del Gel elaborado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl al 0,5%



ESTUDIO DE ESTABILIDAD

CC-FE-3111
SA 19673-19674-20836-20837-21722-21723

Cliente:	BARUKCIC REVELO ANGELKA MARIA		
Dirección:	CALDERON		
Muestra de:	Cosmético		
DESCRIPCION:	Gel elaborado con extracto de <i>Cinchona Pubescens</i> Vahl		
Lote:	061114		
Fecha de Elaboración:	2014-06-11		
Fecha de Vencimiento:	2016-05-06		
Tamaño de la Muestra:	6 unidades de 100 g		
Material de Envase:	Envase de PEAD (HDPE) y tapa de PP		
Muestreado por:	El cliente		
Envejecimiento:	Acelerado	Temperatura:	30 ± 2 °C
		Humedad Relativa:	75 ± 5 %
Tiempo de Estudio:	Dieciocho meses.	Fecha de Inicio:	2014-11-07
		Fecha de Finalización:	2015-02-23

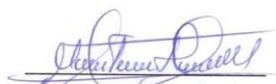
RESULTADOS

PARAMETROS	2014-11-07	2015-01-06	2015-02-23
Recuento de Aerobios Totales	30 UFC/g	50 UFC/g	60 UFC/g
Recuento de Coliformes Totales	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Recuento de Mohos	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Recuento de Levaduras	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
*pH (T: 21.8 °C)	5.2	5.21	5.25

Nota: Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE.

CONCLUSION: De acuerdo a los resultados obtenidos el periodo de vida útil del producto: **Gel elaborado con extracto de *Cinchona Pubescens* Vahl**, es de Dieciocho meses acelerado.




Ing. Teresa Ramirez
DIRECTORA DE CALIDAD

