

*Trabajo de Diploma para
optar por el título
académico de Licenciado
en Ciencias
Farmacéuticas*

Formulación de una crema antiacné a partir de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.



Autora: Margarita Elena Coba Sánchez

Tutores: Dra. C. Mirtha Mayra González Bedia

Msc. Miguel Ángel Alba de Armas

*Institución: Universidad Central "Marta Abreu"
de Las Villas*

2017

Pensamiento



No es el resultado de la investigación científica que ennoblece a los seres humanos y enriquece su naturaleza, sino la lucha por entender mientras realiza un trabajo intelectual, creativo y de mente abierta.

Albert Einstein

Dedicatoria



A mis padres, por brindarme todo su apoyo y amor incondicional, por caminar a mi lado y lograr que me sintiera segura de mis pasos por la vida.

A mi hermana por llegar a mí como un rayo de luz y formar parte de mis alegrías.

A mis abuelitos porque los quiero con todo mi corazón y les debo también lo que soy.

A mis tías que quiero muchísimo y siempre sé que puedo contar con ellas.

A mis primos Ani, Eli y Joaqui porque los considero mis hermanos.

A mis tíos Lupita e Israel, maravillosas personas, dispuestas a dedicarme su confianza y cariño.

A abuela Nery y Jose por ocupar un lugar especial en mi corazón y estar a mi lado en momentos difíciles.

A mis amigos, por compartir consejos y buenos recuerdos.

Agradecimientos



*A Dios por permanecer a mi lado e iluminar mi camino,
dándome salud y fe para el logro de mis objetivos.*

*A mis padres por darme la vida y hacerme saber que en ella
todo es posible si tienes confianza en ti mismo. Por formarme
con valores y mucho amor y convertirme en la persona que soy.*

Gracias. Los amo.

A mi tías Nana y Elena por sus consejos y apoyo incondicional.

*A mi tutora Mirta Mayra por compartir sus ideas, sus
experiencias y su tiempo durante el desarrollo de esta
investigación.*

*A Yuni, mi compañera de estudio, por su colaboración durante
el trabajo experimental y su amistad en estos cinco años.*

*A las profesoras Milagros y Marlén por su paciencia y
conocimientos que fueron fundamentales para esta tesis.*

*A los profesores Daylis, Xiomara, Venancio y Montenegro por
la ayuda brindada.*

*A la Secretaría de la Facultad por su cooperación con la
realización de este trabajo.*

*Al claustro del Departamento de Farmacia de la Facultad por
contribuir, en gran medida, con mi formación como profesional.*

Resumen

La resistencia de las cepas bacterianas, involucradas en el desarrollo del acné, a los antimicrobianos, y la irritación resultante de algunos medicamentos, constituyen barreras significativas a la adherencia del paciente a la terapia. En el presente trabajo se optó por una alternativa adecuada de tratamiento, mediante la formulación de una crema cosmeceútica a partir de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. recolectadas en Quemado de Güines, Villa Clara. Para ello se obtuvo el extracto hidroalcohólico de la planta y se le realizó la caracterización físico-química y fitoquímica. Mediante un diseño experimental factorial 2^3 , que incluyó factores de formulación y de proceso, se obtuvieron 8 formulaciones. Se les realizaron ensayos de control de la calidad (características organolépticas, tipo de emulsión, extensibilidad, densidad aparente, pH) y de estabilidad física acelerada (centrifugación, ciclos frío-calor y congelación-descongelación). Además se evaluó el efecto de la formulación en la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto, frente a *Staphylococcus aureus*, mediante el método de difusión en pozos. Se detectaron metabolitos secundarios como: saponinas, alcaloides, taninos, flavonoides, triterpenos, coumarinas, azúcares reductores y aminoácidos libres, que justifican sus actividades: antimicrobiana, antioxidante, analgésica, antiinflamatoria, entre otras, reportadas en la literatura. La formulación con mejores resultados es la que contiene 4 mL de extracto, 5% de polawax, empleando 1500 rpm como velocidad de agitación, pues posee buena calidad tecnológica y estabilidad física. Sin embargo el extracto no demostró actividad frente a la bacteria, atribuible a la influencia de factores medioambientales y a la no presencia de quinonas en esta planta.

Palabras clave: Crema cosmeceútica, *Jatropha gossypifolia* L., extracto hidroalcohólico, calidad tecnológica, estabilidad física, actividad antimicrobiana.



Abstract

The resistance of bacterial strains, involved in the development of acne, to antimicrobials, and the resulting irritation of some medications, constitute significant barriers to patient adherence to therapy. In the present work we opted for an adequate treatment alternative, through the formulation of a cosmeceutical cream from the leaves of *Jatropha gossypifolia* L. collected in Quemado de Güines, Villa Clara. For this, the hydroalcoholic extract of the plant was obtained and the physical-chemical and phytochemical characterization was performed. By means of a factorial experimental design 2^3 , which included formulation and process factors, 8 formulations were obtained. Quality control tests (organoleptic characteristics, emulsion type, extensibility, bulk density, pH) and accelerated physical stability (centrifugation, cold-heat cycles and freeze-thaw) were performed. In addition, the effect of the formulation on the in vitro antimicrobial activity of the extract against *Staphylococcus aureus* was evaluated by the diffusion method in wells. Secondary metabolites such as saponins, alkaloids, tannins, flavonoids, triterpenes, coumarins, reducing sugars and free amino acids were detected, which justify their activities: antimicrobial, antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, among others, reported in the literature. The formulation with the best results is the one containing 4 mL of extract, 5% of polawax, using 1500 rpm as stirring speed, because it has good technological quality and physical stability. However, the extract showed no activity against the bacteria, attributable to the influence of environmental factors and the non-presence of quinones in this plant.

Keywords: Cosmeceutical cream, *Jatropha gossypifolia* L., hydroalcoholic extract, technological quality, physical stability, antimicrobial activity.



Índice

<i>Introducción</i>	1
<i>Capítulo 1: Revisión bibliográfica</i>	3
1.1 <i>Acné</i>	4
1.1.1 <i>Características del acné</i>	4
1.1.2 <i>Tratamiento farmacológico del acné</i>	4
1.1.3 <i>Cosméticos para el acné</i>	5
1.1.4 <i>Tratamiento cosmeceútico del acné</i>	7
1.2 <i>Jatropha gossypifolia L.</i>	8
1.2.1 <i>Clasificación taxonómica</i>	8
1.2.2 <i>Descripción botánica</i>	8
1.2.3 <i>Distribución y hábitat</i>	9
1.2.4 <i>Partes de la planta empleadas en etnomedicina</i>	9
1.2.5 <i>Estudios fitoquímicos y actividad farmacológica</i>	11
1.2.6 <i>Estudios toxicológicos</i>	13
1.3 <i>Emulsiones cosméticas semisólidas</i>	15
1.3.1 <i>Cremas</i>	15
1.3.2 <i>Control de la calidad de emulsiones</i>	16
1.3.3 <i>Estabilidad de las emulsiones</i>	16
1.3.3.1 <i>Pruebas de estabilidad</i>	18
1.4 <i>Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro</i>	22
<i>Capítulo 2: Materiales y Métodos</i>	24
2.1 <i>Obtención del material vegetal</i>	25
2.1.1 <i>Recolección e identificación del material vegetal</i>	25

2.2 Estudio y evaluación del material vegetal	25
2.2.1 Equipos, materiales y reactivos empleados	25
2.2.2 Secado y molinado del material vegetal	27
2.2.3 Pruebas de control de la calidad de la droga	27
2.2.3.1 Determinación del contenido de humedad	27
2.2.3.2 Determinación de cenizas totales	28
2.3 Obtención del extracto hidroalcohólico	29
2.4 Caracterización físico-química del extracto	29
2.4.2 Determinación del pH	30
2.4.3 Determinación del índice de refracción	30
2.4.4 Determinación de la densidad relativa	30
2.4.5 Determinación de sólidos totales	30
2.5 Caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico	31
2.6 Formulación de la crema cosmeceútica	35
2.6.1 Diseño de experimentación para la obtención de la emulsión	36
2.6.2 Metodología de elaboración	37
2.6.3 Pruebas de control de la calidad	38
2.7 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	42
Capítulo 3: Resultados y discusión	45
3.1 Obtención, estudio y evaluación del material vegetal	46
3.1.1 Recolección, secado y molinado del material vegetal	46
3.1.2 Pruebas de control de la calidad de la droga	46
3.2 Obtención del extracto hidroalcohólico	48
3.3 Caracterización del extracto	48

3.3.1 Caracterización físico-química del extracto	49
3.4 Selección de la forma cosmeceútica	52
3.4.1 Selección de los componentes de la formulación	54
3.4.2 Selección del método de elaboración de la emulsión	59
3.5 Evaluación de las formulaciones obtenidas mediante diseño factorial 2^3	60
3.5.1 Calidad tecnológica de las emulsiones cosmeceúticas	60
3.5.2 Estabilidad física acelerada	65
3.6 Propuesta de la formulación definitiva	67
3.7 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. en la formulación	68
Conclusiones	71
Recomendaciones	73
Bibliografía	74

Introducción



El acné es una condición cutánea que, según su grado de complejidad, puede ser considerada una enfermedad, pues no siempre es clara la línea que divide un acné juvenil, hormonal o por estrés, del que puede y debe tratarse como una patología (1). Son varias las causas que se le atribuyen a esta afección tópica: la infección por *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnes*, la dieta, componentes genéticos, cambios hormonales, así como factores psicológicos (2).

Los tratamientos fundamentales incluyen agentes como: peróxido de benzoílo, antibióticos, retinoides, entre otros, que representan desde décadas una buena elección (3). Sin embargo, actualmente, es una realidad que la resistencia de las cepas bacterianas involucradas en el desarrollo del acné a los antimicrobianos, y la irritación resultante de algunos medicamentos, constituyen barreras significativas a la adherencia del paciente a la terapia. Se estima que entre un 30-40% de los pacientes que utilizan formulaciones tópicas no cumplen con su régimen prescrito (1, 4). Se hace necesario, entonces, buscar alternativas terapéuticas como el empleo de productos naturales con estos fines, formulados como medicamentos, cosméticos o cosmeceúticos que sean capaces de garantizar la calidad tecnológica, eficacia terapéutica e inocuidad de los mismos (5).

En el Departamento de Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas se vienen realizando estudios farmacológicos, toxicológicos y farmacognósticos del extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta *Jatropha gossypifolia* L., pues en la literatura se reportan actividades farmacológicas como: antiinflamatoria, antioxidante, analgésica, antimicrobiana; que podrían favorecer el tratamiento del acné desde varias aristas.

Además, se dispone de un cosmeceútico en forma de gel con este extracto, pues constituye una forma farmacéutica, cosmética y cosmeceútica tradicionalmente empleada en el tratamiento del acné. Sin embargo, los geles, si no se diseñan adecuadamente, no favorecen la hidratación, ni contribuyen a reestablecer la capacidad barrera de la piel; condiciones muy importantes en este tipo de tratamiento.

Problema científico

No se dispone de una formulación para uso tópico en el tratamiento del acné, a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., que contribuya favorablemente al funcionamiento normal de la piel, y por tanto, propicie un mayor ajuste al tratamiento por parte de los pacientes.

Hipótesis

Si se formula el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. en forma de emulsión semisólida, y se seleccionan adecuadamente los componentes, es posible obtener un cosmecéutico que combine los efectos positivos de la planta y de los excipientes, para el tratamiento tópico del acné, lo que debe conducir a una mayor eficacia y ajuste al tratamiento por parte de los pacientes.

Objetivo general

Obtener una emulsión semisólida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. para el tratamiento tópico del acné, que satisfaga los requerimientos de esta afección cutánea, los tecnológicos y de estabilidad física de esta forma cosmecéutica.

Objetivos específicos

- ✓ Seleccionar los componentes de la emulsión según los requerimientos del tratamiento tópico del acné, los tecnológicos y de estabilidad física de esta forma cosmecéutica.
- ✓ Evaluar la influencia de variables de formulación y de metodologías de preparación en la calidad tecnológica y estabilidad física de las emulsiones.
- ✓ Valorar la influencia del extracto y sus formulaciones en la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Capítulo 1:
Revisión bibliográfica



1.1. Acné

1.1.1 Características del acné

El acné es una enfermedad multifactorial y una de las dermatosis más frecuentes. Hoy en día se considera como una enfermedad crónica con episodios de empeoramiento y remisión. Esta entidad afecta principalmente a la gente joven; tiene una incidencia de 35 a 80% entre los 12 y 24 años (6). Se caracteriza por presentar comedones, pápulas y pústulas, aunque eventualmente puede haber abscesos, quistes y cicatrices. En la patogénesis del acné confluyen fundamentalmente cuatro procesos: incremento en la producción de sebo, hiperqueratinización perifolicular y obstrucción folicular, colonización por *Propionibacterium acnes* y otras bacterias oportunistas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) y liberación de enzimas. Esto produce un cambio en el patrón de la queratina pilosebácea, que se hace más densa, bloquea la salida del sebo formando un tapón que se denomina comedón, el cual se compone de queratina, sebo, restos celulares y bacterias, de las cuales la más importante es *P. acnes*. Esta última, libera lipasas y proteasas capaces de generar ácidos grasos libres irritantes, además de mediadores proinflamatorios que afectan a la unidad pilosebácea, genera una respuesta inflamatoria y de cuerpo extraño, provoca la aparición de las manifestaciones más comunes del acné: la pápula, la pústula y el nódulo (7) (8).

1.1.2 Tratamiento farmacológico del acné

El tratamiento del acné depende de la extensión e intensidad de la enfermedad, de la producción de cicatrices, de factores del paciente como su edad, estado hormonal y características de la piel y, por último, de la historia de la respuesta clínica del paciente a las distintas opciones de tratamiento, así como de las secuelas psicológicas e impacto en su calidad de vida (6).

La bibliografía en torno al tema es muy abundante y la evidencia científica para cada opción, suficiente. En ella deben fundamentarse las decisiones terapéuticas en cualquier proceso. No obstante, hay que tener en cuenta el tipo de lesión

predominante, la gravedad, la tendencia a las cicatrices y las posibles implicaciones etiopatogénicas que se deben corregir; también se necesita la experiencia adquirida (9).

Los tratamientos más comunes se basan en antimicrobianos (clindamicina, eritromicina, nadifloxacino, tetraciclina, etc.), retinoides (tretinoína, isotretinoína, adapaleno, tazaroteno), y otros (ácido azelaico, sulfacetamida sódica, peróxido de benzoílo, ácido salicílico, Alfa hidroxiácidos), útiles en la terapia del acné inflamatorio (noduloso) y no inflamatorio (comedónico) (7) (9).

Tratamiento combinado

Con el objetivo de evitar o limitar la resistencia microbiana, han surgido preparaciones combinadas compuestas por principios activos que actúan por distintos mecanismos. Las asociaciones más frecuentes son peróxido de benzoílo con eritromicina o con clindamicina, que son más efectivas que estos medicamentos por separado. También se utilizan las siguientes combinaciones: tretinoína y eritromicina, tretinoína y clindamicina, eritromicina y sulfato de cinc, ácido azelaico y ácido glicólico, ácido azelaico y peróxido de benzoílo, sulfacetamida sódica y azufre, entre otras (10) (4) .

No obstante, con la disponibilidad de numerosos productos de síntesis para enfrentar el acné, se presentan frecuentemente reacciones adversas (irritaciones y resequedad) a estos tratamientos y resistencia a los antibióticos empleados, obligando a la búsqueda permanente de nuevos agentes terapéuticos. Muchos pacientes, por ejemplo, recurren a terapias alternativas mediante el empleo de productos botánicos y fitoquímicos (7) (11).

1.1.3 Cosméticos para el acné

Los cosméticos juegan un papel importante en el tratamiento del acné. Por una parte, como coadyuvantes, suprimiendo los factores que puedan empeorarlo como el exceso de grasa o el sol, y por la otra, mejorando la autoestima del paciente que encuentra su piel con un mejor aspecto, así como cierto efecto de camuflaje.

Además, los ingredientes de determinados productos de cuidado de la piel (nicotinamida, ácido láctico, extractos de plantas prebióticas) influyen moderadamente en diferentes mecanismos de la patogénesis del acné, y por lo tanto, pueden contribuir a una disminución de las lesiones (9).

Las condiciones que deben cumplir los productos cosméticos destinados al acné son las que enumeramos a continuación.

- ❖ **Libre de grasa (oil free).** Dado que la mayoría de pacientes con acné padecen seborrea, los productos cosméticos deben estar encaminados a impedir su acumulación en la piel, no aportando nuevos elementos grasos. El brillo ocasionado por la excesiva secreción de lípidos oleosos, se soluciona mediante la introducción de sustancias absorbentes del exceso de grasa. Para este fin se utilizan gránulos de polietileno, talco y bentonita. También se comercializan emulsiones aceite/agua (leches limpiadoras) de bajo contenido oleoso para pieles grasas.
- ❖ **No comedogénicos.** Los productos comedogénicos inducen la formación de comedones abiertos y cerrados a las dos semanas de su uso, que es el tiempo necesario para su formación.
- ❖ **No irritantes.** Hay que evitar los vehículos volátiles (alcoholes) y sustancias que producen estimulación cutánea (mentol, alcanfor), incluidos vasodilatadores, así como los solventes que favorezcan la penetración del producto (propilenglicol, etanol y otros).
- ❖ **No fotosensibilizantes.** Las sustancias potencialmente fotosensibilizantes más frecuentemente contenidas en cosméticos son los salicilatos, halogenados, tetracloro salicilanilida (TCSA), tribromo salicilanilida (TBSA), ácido p-aminobenzoico (PABA), hexaclorofeno, bitionol, oxibenzona, cinamatos, avobenzona, musk ambrette, y aceite de bergamota.

Las funciones de los cosméticos en el acné se centran en cuatro objetivos: higiene, hidratación, fotoprotección y camuflaje (9).

1.1.4 Tratamiento cosmeceútico del acné

Los cosméticos se usan desde tiempos inmemorables, sin embargo, este concepto ha cambiado con el transcurrir del tiempo, pues ya no solo ayudan al mantenimiento y protección de la piel, sino que tratan las imperfecciones estéticas adquiridas, la pigmentación, el eritema permanente, el acné e incluso las arrugas superficiales y profundas. Estos productos se definen como cosmeceúticos porque incorporan moléculas bioactivas a su formulación, las cuales son las responsables de los efectos antes mencionados. La cosmeceútica se preocupa por no dejar escapar ningún elemento en la formulación que pudiera producir un daño, a corto o largo plazo y tiende a lograr una mayor especificidad para satisfacer las expectativas de los consumidores (12).

Actualmente se elaboran productos dirigidos a todas las zonas de la piel, grupos de edades, razas y sexos. La tendencia es que no existen cosméticos puros, utilizados con el solo objeto de embellecer la piel, sino que se ubican dentro de la línea dermatológica y cosmiátrica, de protección, revitalización y rejuvenecimiento cutáneo. Así se vinculan productos que proporcionan mayor lozanía y presencia pero que también tienen la necesidad ya no solo de mejorar el aspecto, sino la composición y funcionalidad con respaldo científico (12).

El aprovechamiento de los recursos naturales para la obtención de nuevos productos es una vía de desarrollo para la industria cosmeceútica. En este sentido la Fitoterapia constituye una herramienta terapéutica más dentro de todo el abanico de posibilidades que nos brinda la terapéutica actual (13).

En particular, en el tratamiento del acné se han empleado numerosos ingredientes herbarios, con notables efectos beneficiosos. Dentro de ellos se describen aquellos que poseen una o varias de las siguientes actividades: antimicrobiana, antioxidante y/o antiinflamatoria, tales como los extractos de *Rawvolfia serpentina*, *Curcuma longa*, *Azadiracta indica*, *Myristica fragrance*, *Aloe barbadensis*, *Berberis vulgaris*, *Eucalyptus globulus*, *Hydrastis canadensis*, *Medicago sativa*, *Melaleuca*

alternifolia, *Ocimum basilicum*, *Piper longum*, *Terminalia arjuna*, *Zingiber officinale*, *Withania somnifera* y otros (14-16). Otros estudios realizados muestran que los extractos crudos de *Dorema ammoniacum*, *Sphaeranthus indicus*, *Dracaena cinnabari*, *Mallotus philippinensis*, *Jatropha gossypifolia* L., *Aristolochia indica*, *Lantana camara*, *Nardostachys jatamansi*, *Randia dumetorum* and *Cassia fistula* presentan una significativa actividad antimicrobiana frente a microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*, entre otros (17).

1.2 *Jatropha gossypifolia* L.

1.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*.

Familia: *Euphorbiaceae*.

Género: *Jatropha*

Especie: *Gossypifolia*

Nombre científico: *Jatropha gossypifolia* L. (Linn)

Nombre común: Tuatúa.

Otros nombres comunes: Frailecillo, San Juan del Cobre, higuera cimarrona, sibiriguá, piñón negro, piñón rojo, etc. (18)

1.2.2 Descripción botánica

Especie herbácea de arbusto, a veces leñosa y cuya altura oscila de 1 a 2 m. Presenta hojas pegajosas, de 7 a 15 cm, de color verde oscuro o más frecuente de color rojo violáceo oscuro. Se caracterizan además, por ser alternas, palmeadas y lobuladas (de tres a cinco lóbulos), con un ápice acuminado, base cordada y margen dentado. Se encuentran unidas al tallo por pecíolos pubescentes. Las flores son pequeñas, unisexuales, moradas, de inflorescencia

cimosa con cáliz de cinco pétalos, que en las flores masculinas pueden formar un tubo petaloide. El fruto es pequeño, capsular con 1 cm de diámetro, consta de tres surcos. Es carnosos y de color verde cuando es inmaduro, convirtiéndose en marrón oscuro cuando madura. Contiene de una a tres semillas oscuras con puntos negros y ricas en aceite, por las cuales ocurre la propagación (18-20).



Fig.1 *Jatropha gossypifolia* L.

1.2.3 Distribución y hábitat

Nativa del Nuevo Mundo, probablemente de Sudamérica, aunque ampliamente distribuida en los trópicos. Crece en terrenos yermos, cultivados y calcáreos, de poca o mediana elevación. Se observa en las Antillas Mayores y Menores, así como en Bahamas. En América tropical continental se distribuye en Estados Unidos, México, toda Centroamérica y gran parte de Suramérica. Actualmente se encuentra naturalizada en muchas regiones tropicales del planeta, caso del oeste de la India. Se multiplica por semillas o por tallos (21).

1.2.4 Partes de la planta empleadas en etnomedicina

El género *Jatropha* es un taxón medicinal cuyas hojas, tallos, corteza y látex se han utilizado en la etnomedicina con diferentes fines.

Posee significativa actividad anticancerígena, hepatoprotectora y pesticida. Los usos etnobotánicos de *Jatropha gossypifolia* L. informan, además, su eficacia frente a la diarrea, disentería, enfermedades de la piel (lepra), artritis, úlcera, infecciones de las encías y cicatrización de heridas (18, 22).

Algunas propiedades son atribuidas a partes específicas de la planta, mientras que otros se asignan a diferentes partes. Curiosamente, en algunos casos ciertos usos pueden parecer contradictorios, tales como antidiarreicos y laxantes o su uso como anticoagulante y antihemorrágico (18) (23).

Hojas

En el sur de Nigeria el extracto de las hojas frescas de *Jatropha gossypifolia* L. se aplica por los herboristas y la población local, con hojas trituradas, para detener el sangrado de la piel y la nariz. En Latinoamérica y el Caribe, las hojas se hierven y se utiliza la decocción para el lavado de heridas. El baño de las hojas también se utiliza para los dolores, esguinces, y erupciones cutáneas (18) (24).

En Trinidad y Tobago, los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. se han utilizado para limpiar heridas y en Tanzania para tratar las erupciones cutáneas y la candidiasis oral. En Malasia e Indonesia las hojas se hierven con aceite de coco, se calienta sobre fuego abierto y se aplica sobre el abdomen y ayuda a aliviar el cólico abdominal debido al estreñimiento (18).

Se comprobó además que el extracto acuoso de las hojas de la planta es capaz de inhibir las actividades enzimáticas y biológicas inducidas por el veneno de serpiente (25).

Tallo

La savia del tallo se utiliza para detener el sangrado y el prurito de los cortes y rasguños. El tallo joven se utiliza como cepillo de dientes, así como para limpiar la lengua (20). Los palos madre se utilizan para fortalecer las encías y para curar los furúnculos (18).

Látex

Tanto el látex como el jugo de la hoja se utilizan para tratar úlceras, enfermedades de la piel e infecciones de la encía. El látex, además, contiene alcaloides con

propiedades anticancerígenas. En Nicaragua se ha documentado su uso para sanar y curar quemaduras. Mientras que en Venezuela se emplea en el tratamiento de úlceras epiteliales (18) (21).

Semillas

El aceite de semilla de *Jatropha gossypifolia* L. se utiliza en el reumatismo y las afecciones paralíticas. Para aliviar el estreñimiento, las semillas se queman y se pulverizan, administrándose por vía oral. Se utilizan además, para curar trastornos estomacales y fiebre (18).

Raíces

Se utilizan tradicionalmente en la diarrea y la disentería. Se sabe que las raíces contienen un antídoto contra el veneno de la serpiente. El aceite se utiliza como purgante y se aplica localmente en enfermedades de la piel y artritis. Las raíces también son destinadas a tratar problemas de riñón, enfermedades asociadas a órganos como la vejiga, el hígado, y contra la lepra (18, 26).

1.2.5 Estudios fitoquímicos y actividad farmacológica

Se ha detectado un amplio espectro de componentes químicos en extractos de diferentes partes de *Jatropha gossypifolia* L., constituyendo un importante reservorio de fitoquímicos con potencial terapéutico. Los mayores porcentajes extractivos de las hojas de la planta corresponden con los solventes: agua, éter de petróleo, etanol y metanol, en orden descendente (27). La literatura en general, demuestra la presencia de ácidos grasos, azúcares, alcaloides, aminoácidos, coumarinas, esteroides, flavonoides, lignanos, proteínas, saponinas, taninos y terpenoides (24, 27, 28).

En el extracto alcohólico de las hojas abundan flavonoides C-glicósidos tales como vitexina, apigenina e isovitexina; mientras que en extractos no polares son los lignanos como el jatroideno, jatrofano, gadaína y venkatasina. Este compendio de metabolitos secundarios, sobre todo los presentes en sus hojas, parece ser el

responsable de sus propiedades anticoagulantes, purgativas y febrífugas, así como de su amplio espectro de acción antibiótica frente a ciertos microorganismos relacionados con desórdenes estomacales como *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Aspergillus niger*. De todos ellos, quizá uno de los más interesantes sea un complejo diterpeno macrocíclico conocido como jatrofenona, con gran potencial bactericida, frente a *Staphylococcus aureus* entre otros, que se ha comparado incluso a la penicilina (21).

Del látex se han aislado octapéptidos cíclicos novedosos, como la cicloglossina B, así como otros heptapéptidos (cicloglossina A); en los cuales podrían residir sus propiedades anticoagulantes. En cualquier caso el látex puede resultar venenoso y de hecho es tóxico por contacto (21).

Entre las principales acciones farmacológicas que se han estudiado se hace referencia a su capacidad como antihipertensivo, antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano, cicatrizante, antiinflamatorio y analgésico (18) (20) (27). En algunos estudios no se especifica la parte de la planta y/o el tipo de extracto empleados. Ejemplos de estudios farmacológicos según la parte de la planta y el tipo de extracto se describen en la tabla 1.

Tabla 1: Actividad farmacológica de *Jatropha gossypifolia* L. según la parte de la planta y el tipo de extracto.

Parte de la planta	Tipo de extracto	Actividad demostrada	Cita
Raíces y partes aéreas	Etanólico	Antihipertensiva	(14)
Hojas	Metanólico, etanólico y acuoso	Antiinflamatoria y/o analgésica, anticolinesterasa (para extracto metanólico)	(14) (29)
corteza	Éter de petróleo y metanólico	Antiinflamatoria	(14)
Partes aéreas	Hidroalcohólico	Cicatrizante	(14)
Hojas	Metanólico, etanólico, acetato de etilo y acuoso	Antioxidante	(14) (29)
Hojas	Etanólico, metanólico, clorofórmico	Antimicrobiana	(28-30)
Tallo	Etanólico y acuoso		(31)
Raíces			
	Etanólico	Antiacné (Inhibe la producción de lípidos neutros)	
Hojas	Etanólico	Anticancerígeno	(14) (29)

Otras actividades farmacológicas demostradas experimentalmente fueron: anticonceptiva, tocolítica, antidiarreica, inmunomoduladora, hepatoprotectora y antiartrítica (18, 27, 29).

1.2.6 Estudios toxicológicos

Las especies de *Jatropha* son notablemente conocidas por su potencial tóxico. Esta toxicidad se relaciona principalmente con el látex y las semillas. El látex se libera de las partes aéreas de la planta por lesión mecánica y es extremadamente cáustico e irritante para la piel y las membranas mucosas. Las semillas son ricas en toxoalbúminas que causan aglutinación y hemólisis de los eritrocitos, así como el daño a otros tipos de células y contienen un complejo de resina lipóide que puede causar dermatitis. Los casos de envenenamiento en los seres humanos usualmente ocurren comiendo fruta y semillas por su similitud con las castañas

comestibles. La sintomatología consiste, en general, en trastornos gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea). Además, el curso clínico puede provocar complicaciones cardiovasculares, neurológicas y renales (18, 23)

En el caso particular de *Jatropha gossypifolia* L. los resultados de estudios de toxicidad son contradictorios y en algunos de ellos no se describe la parte de la planta y/o del extracto empleados. Por ejemplo en un ensayo de toxicidad se reveló que los extractos etanólico y metanólico de (órgano vegetal no especificado) mostraron baja toxicidad (18, 19). Sin embargo, en una evaluación toxicológica preclínica el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta mostró toxicidad oral aguda relativamente baja (23). Sin embargo, su toxicidad crónica oral en ratas fue significativa, siendo los signos tóxicos principales: reducción de la actividad en el sistema nervioso central y trastornos digestivos (18).

Por otra parte, otro estudio preclínico que evaluó la toxicidad aguda del extracto acuoso de las hojas, no mostró ningún signo de toxicidad, lo que permitió a los autores concluir que este extracto podría ser considerado seguro (18). Estudios realizados en ratas con el extracto etanólico de la raíz por vía oral mostraron que fue tóxico para el riñón y causó aumento de la retención de urea en la sangre (18). Se demostró además el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del látex de la planta (32).

Es importante tener en cuenta que el uso medicinal de la planta es raramente *in natura*, pues se realizan diferentes preparaciones como infusiones o decocciones de partes de la planta que pueden ser sometidas a procesos tales como el secado, trituración y maceración. Esto podría cambiar la composición química original de la planta y pudiera permitir la inactivación de los posibles componentes tóxicos, obteniendo un producto menos perjudicial o incluso relativamente inocuo. Sin embargo la toxicidad de extractos de las hojas no puede ser descartada (19).

1.3 Emulsiones cosméticas semisólidas

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Los diámetros de las gotas líquidas que se encuentran dispersas se encuentran en el rango de 0.1 y 20 μm . Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en estables desde el punto de vista cinético gracias a la presencia de agentes tensoactivos que presentan la capacidad de absorción en las superficies de las gotas. En la mayoría de las emulsiones una de las fases es acuosa y la otra un aceite polar. Las emulsiones con el aceite como fase dispersa se conocen como emulsiones de aceite en agua (oil-in-water, o/w) y las emulsiones con agua como fase dispersa se conocen como emulsiones de agua en aceite (water-in-oil, w/o). El tipo de emulsión que se tiende a formar depende del balance entre las propiedades hidrófilas e hidrófobas del agente emulsionante (33).

Las emulsiones más habituales son las que presentan la forma cosmética: crema o leche/loción. En general, se diferencian, en que las cremas son más espesas y viscosas, con mayor contenido en grasas, lo que las hace menos adecuadas para pieles con exceso de secreción sebácea. Mientras que las leches son más líquidas, por un mayor contenido en agua, siendo mejor toleradas por pieles grasas. Al llevar a la vez agua y grasas permite la incorporación de principios activos liposolubles e hidrosolubles (34).

1.3.1 Cremas

Las cremas son formas farmacéuticas semisólidas que pueden elaborarse con base emulsionada O/W o W/O (35). Las de base emulsionada de tipo lipófilo (W/O), están destinadas a evitar la pérdida de agua, facilitando la permeabilidad de los principios activos lipófilos e hidrófilos, actuando directamente sobre las células vivas de la piel y estimulando al desarrollo de colágeno y elastina (36). Mientras que, las de tipo hidrófobas (O/W), logran mayor penetración, sin embargo, permiten la evaporación del agua por lo que disminuye la hidratación (37).

1.3.2 Control de la calidad de emulsiones

Todo producto cosmético recién elaborado debe cumplir con las especificaciones establecidas en relación con sus características físicas, químicas, microbiológicas y toxicológicas. En productos tópicos como cremas deben examinarse los siguientes parámetros: características organolépticas (aspecto, color, olor, sensación al tacto) y aquellos incluidos en la evaluación físico-química, siendo importantes para estudiar alteraciones en la estructura de la formulación que no son comúnmente perceptibles a simple vista. Los análisis físico-químicos sugeridos son: valor del pH, área de extensibilidad, viscosidad aparente, densidad aparente, tipo de emulsión, entre otros. Estos estudios pueden indicar problemas de estabilidad entre los ingredientes o resultado del proceso de fabricación (38) (39) (40).

1.3.3 Estabilidad de las emulsiones

Los estudios de estabilidad de un producto final indican su grado de seguridad en las diferentes condiciones a las que puede estar expuesto desde su fabricación hasta su expiración. Los resultados de cada uno de los ensayos establecidos permiten confirmar o establecer el período de validez y las condiciones de almacenamiento. La estabilidad temporaria y prolongación de la vida de las emulsiones están garantizadas por la preservación de los sistemas emulsionantes y de las características físico-químicas del producto.

Cuando ocurre la desestabilización de las emulsiones, sus características químicas y físicas pueden variar. Existen varios factores que provocan dicho proceso, como la temperatura elevada de almacenaje, las contaminaciones microbiológicas y las reacciones químicas indeseadas. Mientras que las temperaturas bajas lo retardan (41).

Las principales alteraciones que pueden sufrir las emulsiones están relacionadas a sus características físicas, tales como:

- Cremado: Se conoce también por sedimentación inversa. Las partículas de menor densidad tienden a subir hacia la superficie de la emulsión, formando una fase superior. El resultado es un sistema de dos porciones, una con mayor concentración de la fase interna y otra con mayor concentración de la fase externa. En la práctica, este fenómeno puede ser revertido por medio de agitación sencilla, pues se trata de un problema poco serio de inestabilidad y no hay aglomeración de partículas.

- Sedimentación: Fenómeno semejante al de la cremación, pero, a diferencia de este, se produce la unión de las partículas más pesadas que se depositan en el fondo de la emulsión. Puede ser revertido con agitación.

- Floculación: Ocurre debido al desbalance de la carga eléctrica en las micelas, lo que reduce la fuerza repulsiva entre las mismas. Las gotículas de la fase interna se adhieren superficialmente y con fuerza de baja intensidad sin llegar a perder su identidad. Como el cremado, no representa un problema grave y el fenómeno puede ser revertido, pues los flóculos pueden descomponerse en sus gotitas iniciales (a veces es suficiente una leve agitación manual).

- Coalescencia: Es similar a la floculación pero, a causa de las colisiones, el contenido de las gotas es transferido produciendo gotas mayores que se unen irreversiblemente perdiendo su identidad. Estas gotas mayores sufren con más claridad el mecanismo de la sedimentación, y así se favorece la desestabilización del sistema, y, en un caso extremo, la aparición de las dos fases totalmente separadas.

- Maduración de Ostwald: Es el fenómeno por el que se produce la disolución de gotas pequeñas del medio disperso en el seno de la fase continua; a continuación se desarrolla la difusión de sus componentes a través de dicha fase; estos componentes alcanzan la superficie de gotas grandes y penetran y se unen a dichas gotas perdiendo su identidad. La maduración de Ostwald es la mayor causa de inestabilidad en emulsiones que contienen compuestos de bajo peso

molecular (como por ejemplo aceites olorosos), y es el único tipo de mecanismo de desestabilización y colapso de emulsiones que los espesadores o agentes que aumentan la viscosidad no pueden eliminar.

- Inversión de fase: En este fenómeno, la fase interna se convierte en la fase externa y viceversa. La garantía de la estabilidad de una emulsión está en la correcta elección de los ingredientes de la formulación y en la adecuación del proceso de fabricación. Es posible predecir cuál será la vida útil de una emulsión cosmética valiéndose de los diversos métodos de evaluación de la estabilidad que son utilizados por la industria (41-43).

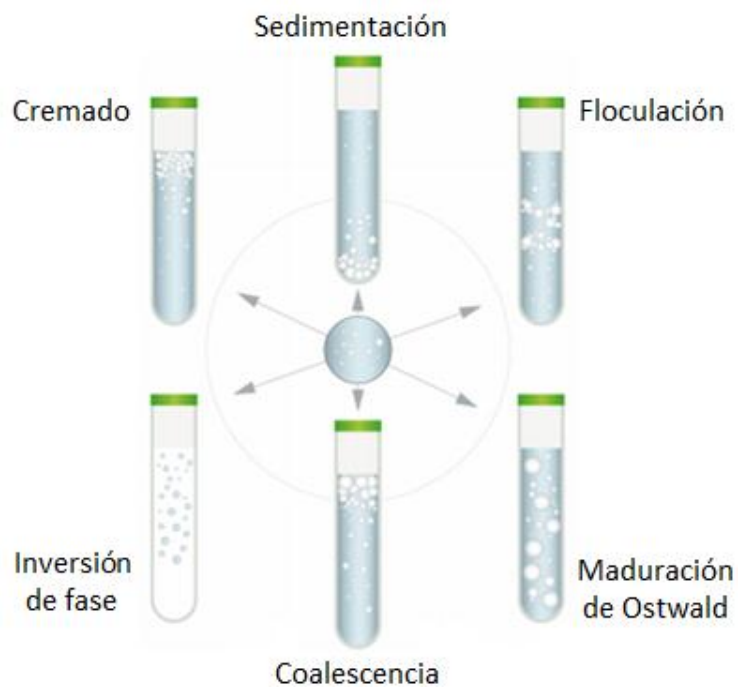


Fig. 2 Representación esquemática de los diversos procesos de degradación en emulsiones.

1.3.3.1 Pruebas de estabilidad

Dado que las emulsiones son sistemas bifásicos, son inherentemente inestables de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, y el grado y la velocidad de la

desestabilización varían de un sistema a otro. Por lo tanto, es importante llevar a cabo estudios sobre la estabilidad de los sistemas desarrollados.

El propósito de las pruebas de estabilidad es proporcionar información sobre cómo la calidad del producto varía con el tiempo bajo la influencia de algunos factores ambientales como las vibraciones, la temperatura, la humedad y la luz; así como determinar la vida útil de productos farmacéuticos y cosméticos (44, 45).

En los ensayos de estabilidad, las muestras se revisan periódicamente para detectar cambios y características importantes. Debido a la gran variedad de productos cosméticos y su complejidad inherente, no se pueden prescribir pruebas de estabilidad "estándar". Los fabricantes, que tienen un conocimiento de sus productos, requieren flexibilidad para modificar los protocolos y las pruebas y construir una base científica sólida para evaluar la estabilidad del producto (44).

Las condiciones de prueba aceleradas se reconocen internacionalmente, en muchas industrias, como una predicción adecuada de estabilidad de un producto. Los términos apropiados, por ejemplo con respecto a la temperatura y / o duración, deben ser elegidos de acuerdo con la categoría del preparado y deben estar basados en juicios científicos sólidos. Según los datos obtenidos mediante diversas técnicas pueden utilizarse temperaturas y duraciones, posiblemente junto con el uso de modelos matemáticos, para predecir la estabilidad. Basándose en los resultados de estabilidad acelerada y en su experiencia científica, puede entonces ser capaz de predecir la estabilidad real para determinadas condiciones de mercado.

Los ciclos de temperatura y / o las pruebas de "congelación-descongelación" pueden revelar algunos tipos de deficiencias más rápidamente que el almacenamiento a una temperatura constante. Como se puede esperar que los productos encuentren temperaturas y presiones extremas durante su transporte y almacenamiento, se deberían considerar las pruebas de estabilidad en estos extremos (46).

Estudio acelerado en condiciones de estrés:

En este tipo de estudio los ensayos que se efectúan están bajo ciertas condiciones que causan estrés al producto y ocasionan manifestaciones de problemas de inestabilidad que estaban latentes en éste. Por lo general, se emplean para evaluar la estabilidad física del producto. Algunas de las condiciones más empleadas para causar estrés son: iluminación a longitudes de onda químicamente activas (espectro UV), ciclos de calentamiento y enfriamiento, centrifugación, extrusión, presión etc. Los resultados de estos ensayos son muy útiles y suelen ser la base de los estudios de compatibilidad como los llaman algunas empresas, pero no se pueden interpretar confiablemente en términos de equivalencia en tiempo de vida útil. Por lo general, con ellos se busca obtener una prueba del posible deterioro o funcionamiento defectuoso del producto.

Para ayudar durante el desarrollo de una nueva formulación, el investigador puede efectuar algunas pruebas preliminares aceleradas de corto plazo, con el fin de tener una razonable certeza de si va por buen camino y de que eventualmente no desperdiciará tiempo ni dinero. De esta forma, al iniciar las pruebas de estabilidad definitivas de corto plazo, las cuales de por sí son particularmente imprecisas, podrá estar más seguro del juicio que efectuará sobre el desempeño del producto (47).

Las pruebas deben ser conducidas bajo condiciones que permitan proporcionar informaciones sobre la estabilidad del producto en menos tiempo posible. Para lo cual, las muestras deben ser almacenadas en condiciones que aceleren los cambios posibles de ocurrir durante el plazo de validez.

Antes de iniciar los estudios de estabilidad, se recomienda someter al producto a la prueba de centrifugación. Se sugiere centrifugar una muestra a 3.000 rpm durante 30 minutos. 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 (44).

Estabilidad preliminar

Esta prueba también es conocida como Prueba de Selección, Estabilidad Acelerada 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.

Las formulaciones en prueba son sometidas a condiciones de estrés buscando acelerar el surgimiento de posibles señales de inestabilidad. 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: $T = 37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Estufa: $T = 40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Estufa: $T = 45 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Estufa: $T = 50 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Los valores generalmente adoptados para bajas temperaturas pueden ser:

Nevera: $T = 5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

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

Los valores generalmente adoptados para los ciclos son:

Ciclos de 24 horas a 40 ± 2 °C, y 24 horas a 4 ± 2 °C durante cuatro semanas.

Ciclos de 24 horas a 45 ± 2 °C y 24 horas a -5 ± 2 °C durante 12 días (6 ciclos).

Ciclos de 24 horas a 50 ± 2 °C y 24 horas a -5 ± 2 °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. 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.

Los parámetros que generalmente son evaluados deben ser definidos por el formulador y dependen de las características de la formulación en estudio y de los componentes utilizados en esta formulación. De manera general, se evalúan las características organolépticas (aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable) y las características físico-químicas (valor de pH, viscosidad y densidad, u otros).

Se debe tomar una muestra de referencia, también denominada patrón, cuya aceptabilidad sea conocida, u otros productos semejantes, considerados satisfactorios en lo referente a los parámetros evaluados (39).

1.4 Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes antifécciosos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica (48).

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar la susceptibilidad *in vitro* de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, lo que permite que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los

microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Los problemas generales inherentes a los ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores, de allí la importancia de conocer los estándares para estas pruebas de actividad biológica (49).

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo.

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar la actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares.

Métodos de difusión

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos.

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia. Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller-Hinton y agar tripticosa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (49).

Capítulo 2:

Materiales y Métodos



El presente estudio experimental se realizó en los laboratorios del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química – Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en el período comprendido entre febrero y mayo del 2017.

2.1 Obtención del material vegetal

2.1.1 Recolección e identificación del material vegetal

Las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. fueron recolectadas en horas de la tarde en áreas rurales del municipio Quemado de Güines, en la provincia de Villa Clara, durante el mes de febrero de 2017. Se trasladaron en bolsas de nylon hasta la Universidad Central “Marta Abreu”, donde la muestra vegetal fue identificada por el Msc. Omar Cárdenas García, especialista en conservación de flora y fauna del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la institución. Posteriormente las hojas se enviaron al laboratorio para ser procesadas y analizadas. Se desecharon aquellas que estaban marchitas y enfermas.

2.2 Estudio y evaluación del material vegetal

2.2.1 Equipos, materiales y reactivos empleados

Equipos y materiales

- Molino de cuchillas (IKA WERKE MF-10 basic, Alemania)
- Estufa (Binder, Alemania)
- Balanza analítica digital (Sartorius TE-124S, Alemania)
- Balanza técnica digital (Sartorius BS-2202S, Alemania)
- Horno mufla (Nabertherm B-170, Alemania)
- Plancha de calentamiento (Stuart SD 300, Reino Unido)
- Equipo de reflujo (MEDINGEN, Alemania)
- Manta de calentamiento (Electrothermal MX, Reino Unido)
- Rotoevaporador (BÜCHI R-200, Alemania)
- Densitómetro (KEM, DA-130N, Japón)
- pH-metro (HANNA, Rumania)

- Refractómetro de Abbe (ATAGO, Japón)
- Baño de María (MLW, Alemania)
- Agitador eléctrico (IKA, Estados Unidos)
- Centrífuga (YINGTAI TG16, China)
- Refrigerador (LG, China)
- Agitador magnético (Heidolph, Alemania)
- Autoclave (HIRAYAMA, Japón)
- Incubadora (Heraeus, Alemania)
- Flujo laminar (Safefast Top, Italia)
- Cristalería y utensilios de laboratorio

Reactivos y otros productos

- Ácido clorhídrico concentrado (UNI-CHEM)
- Ácido sulfúrico concentrado (UNI-CHEM)
- Agua destilada
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético (UNI-CHEM)
- Benzoato de sodio
- Cinta de magnesio metálica (Analar)
- Cloroformo (MERCK, Alemania)
- Cloruro férrico (Analar)
- Etanol 92 % (UNI-CHEM)
- Extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.
- Fragancia de Almendras dulces
- Glicerina (UNI-CHEM)
- Gentamicina 0,1 % (Quimefa)
- Hidróxido de sodio (UNI-CHEM)
- Petrolato sólido
- Polawax
- Reactivo de Baljet A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo de Dragendorff

- Reactivo de Fehling A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo de Kedde A y B
- Solución de Ninhidrina 2%
- Caldo de Mueller-Hinton (BioCen)
- Agar de Mueller-Hinton (BioCen)

2.2.2 Secado y molinado del material vegetal

Primeramente, las hojas de la planta se lavaron con abundante agua potable y para su secado se esparcieron sobre mallas de plástico a la sombra durante 48 horas, siendo removidas varias veces. A continuación se dispersaron en bandejas metálicas y fueron sometidas al secado artificial en una estufa a 35 °C, siendo también removidas por intervalos de tiempo hasta masa constante. Posteriormente el material se trituró en un molino de cuchillas utilizando un tamiz de 3 mm. El molinado se envasó en bolsas de nylon negro, bien cerradas, dentro de una desecadora hasta su utilización.

2.2.3 Pruebas de control de la calidad de la droga

Los parámetros de calidad se le realizaron a la droga seca y molida, según lo establecido por Miranda y Cuéllar (50). Se determinaron los índices numéricos: contenido de humedad y cenizas totales.

2.2.3.1 Determinación del contenido de humedad

Procedimiento

Se realizó por el método gravimétrico como se describe a continuación:

De la muestra de ensayo se pesaron 2 g con un error máximo de 0,5 mg y se transfirieron a un crisol previamente tarado y se desecó el material en una estufa a 105 °C durante 3 h. El crisol se colocó en una desecadora donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y a continuación fue pesado, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 h. Esta operación se repitió hasta la obtención de masa constante.

Expresión de los resultados

El contenido de humedad (H) de la muestra de ensayo expresada en porciento se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$H = \frac{M_2 - M_1}{M} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde:

H: Contenido de humedad (%)

M₂: Masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M₁: Masa del crisol con la muestra de ensayo desecada (g)

M: Masa de ensayo (g)

2.2.3.2 Determinación de cenizas totales

Procedimiento

En un crisol de porcelana previamente tarado, se pesó 1 g de la muestra de ensayo pulverizada y tamizada, con un error mínimo de 0,5 mg. Se calentó la muestra en una plancha de calentamiento hasta quedar carbonizada y luego se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750 °C durante 2 h. A continuación el crisol se enfrió en una desecadora y se pesó. El proceso se repitió a partir de la incineración, hasta la obtención de masa constante, de forma que dos pesadas consecutivas no difirieran en más de 0,5 mg/g. El tiempo de calentamiento y pesada se realizó a intervalos de 30 min.

Expresión de los resultados

El porcentaje de cenizas totales (C_t) se calculó aplicando las ecuaciones siguientes:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.2} \quad C_t = \frac{C_1 \cdot 100}{100 - H} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde:

C_1 : Cenizas totales en base hidratada (%)

C_t : Cenizas totales (%)

M: Masa del crisol vacío (g)

M_1 : Masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M_2 : Masa del crisol con la ceniza (g)

H: Contenido de humedad (%)

2.3 Obtención del extracto hidroalcohólico

En la balanza técnica se pesaron 20 g de la muestra seca y molinada y seguidamente se humectó con una solución hidroalcohólica al 70 %, previamente preparada con un volumen de 200 ml. A continuación se reflujo durante 2 h los 30 g del material vegetal con los 300 ml de solución a una temperatura de 98 °C. Luego se filtró con papel de filtro y se concentró por rotoevaporación a 40 °C.

2.4 Caracterización físico-química del extracto

Para la descripción y evaluación del extracto obtenido se determinaron como métodos de ensayo: características organolépticas, pH, índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales siguiendo el procedimiento descrito en la NRSP 312 (51).

2.4.1 Características organolépticas

Determinación del olor

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1cm de anchura por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Luego se determinó el olor.

Determinación del color

Una muestra del extracto se vació en un tubo de ensayo limpio y seco ocupando las tres cuartas partes de su capacidad. Se observó el color, la transparencia, la

presencia de partículas y la separación en capas.

2.4.2 Determinación del pH

Para la determinación de este parámetro se utilizó un pH-metro, siendo previamente calibrado con solución reguladora adecuada. Los electrodos se introdujeron en la muestra y se procedió con la lectura del valor de pH.

2.4.3 Determinación del índice de refracción

Utilizando un gotero, se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición del refractómetro, siendo ajustado anteriormente con agua destilada a través del mismo procedimiento y seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual. Para la lectura del valor se manipuló el compensador cromático hasta colocar la línea límite de los campos claro y oscuro sobre la intersección de las retículas (figura 3).



Fig. 3 Calibración de la zona iluminada en el cruce de las retículas.

2.4.4 Determinación de la densidad relativa

A aproximadamente 10 mL de la muestra se le realizó la lectura de la densidad relativa empleando un densitómetro digital que fue previamente calibrado con agua destilada.

2.4.5 Determinación de sólidos totales

A una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada se transfirieron 5 mL de la muestra de ensayo previamente homogenizada. Para este ensayo se realizaron tres réplicas. Las cápsulas se colocaron en un baño de agua hasta la evaporación del contenido y la sequedad aparente del residuo; posteriormente se

pasaron a una estufa a una temperatura de 105°C durante 3h. Al retirarse de la estufa se colocaron en una desecadora alcanzando temperatura ambiente para un subsecuente pesaje. El proceso se repitió hasta obtener masa constante para cada cápsula.

Expresión de los resultados

Para el cálculo del porcentaje de los sólidos totales (S_t) se utilizó la siguiente expresión:

$$S_t = \frac{P_r - P}{V} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde:

S_t : Sólidos totales (%)

P_r : Masa de la cápsula más el residuo (g)

P : Masa de la cápsula vacía (g)

V : Volumen de la porción de ensayo (g)

2.5 Caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico

Para la realización del tamizaje fitoquímico se siguió la técnica descrita por Miranda y Cuéllar. A través de la aplicación de ensayos simples, rápidos y selectivos, se determinaron de forma cualitativa, los posibles metabolitos secundarios del extracto obtenido de la muestra vegetal. Al ser una sustancia de naturaleza hidroalcohólica se realizaron los ensayos establecidos tanto para el extracto etanólico como para el acuoso.

Ensayo de Dragendorff:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de alcaloides.

Reactivos: reactivo de Dragendorff

Procedimiento: El solvente de la alícuota se evaporó en baño de agua y el residuo se disolvió en 1mL de HCl (1%). Posteriormente se añadieron 3 gotas del

reactivo de Dragendorff.

Evidencia: Se producen complejos insolubles, de tal manera que, si hay opalescencia el ensayo se considera positivo (+), si turbidez definida (++) y si precipitado (+++).

Ensayo de Baljet:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Reactivos: A) solución de Acido pícrico B) solución de Hidróxido de sodio

Procedimiento: A la alícuota se le adicionó 1mL de reactivo.

Evidencia: la aparición de una coloración se considera (+) y de un precipitado (++).

Ensayo de Borntrager:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de quinonas.

Reactivos: NaOH al 5% en agua

Procedimiento: El solvente de la alícuota se evaporó en baño de agua y el residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo. Luego se adicionó 1 mL del reactivo. Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su ulterior separación.

Evidencia: El ensayo se considera positivo si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo, puede dar un criterio semicuantitativo si la coloración es rosada entonces se considera (++) , y si es roja entonces es (+++).

Ensayo de Liebermann-Burchard:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides.

Reactivos: anhídrido acético, ácido sulfúrico

Procedimiento: El solvente de la alícuota se evaporó en baño de agua y el residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de anhídrido acético

y se mezcló bien. Por la pared del tubo se dejaron correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitación.

Observación: Para la realización de este ensayo no podía haber agua en el medio de reacción, pues esta con el ácido sulfúrico pudo haber reaccionado de forma violenta.

Evidencia: Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:

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

Ensayo de Resinas:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de Resinas

Procedimiento: A 2 mL de la solución alcohólica del extracto se le adicionó 10 mL de agua destilada. Se agitó y dejó reposar.

Evidencia: La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo

Ensayo de Fehling:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de azúcares reductores.

Reactivos: Soluciones A y B mezcladas en iguales cantidades y justo en el momento de realizar el ensayo

Procedimiento: A la alícuota se le adicionaron 2 mL del reactivo (A+ B recién preparado) y se calentó en baño de agua de 5-10 min.

Evidencia: El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.

Ensayo de Espuma:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de **saponinas**, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas

Procedimiento: La alícuota se diluyó en 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10min

Evidencia: El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de 2 min.

Ensayo de Cloruro Férrico:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de **compuestos fenólicos y/o taninos**.

Reactivos: solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica

Procedimiento: A la alícuota del extracto se le adicionaron 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica.

Evidencia: Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

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

Ensayo de Shinoda:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de **flavonoides**.

Reactivos: ácido clorhídrico concentrado, cinta de magnesio metálico.

Procedimiento: A 1mL del extracto disuelto en etanol, se le adicionó un pedacito de cinta de magnesio metálica. Se añadieron 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado gota a gota. Después de la reacción se esperaron 5 min hasta la aparición del color.

Se añadió 1 mL de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó en reposo hasta que las mismas se separaran.

Evidencia: El ensayo se considera positivo cuando aparece una coloración o el alcohol amílico se colorea de diferentes colores, intensos en todos los casos. Los colores están relacionados con la estructura del flavonoide.

Flavonas	amarillo, naranja a rojo
Flavonoles y Flavononoles	amarillo - carmín
Flavononas	carmín a magenta

Ensayo de Ninhidrina:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de **aminoácidos libres** o de **aminas** en general

Reactivos: solución de ninhidrina al 2%

Procedimiento: La alícuota del extracto se mezcló con 2 mL de la solución de ninhidrina al 2%. La mezcla se calentó durante 10 min en baño de agua.

Evidencia: El ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.

Ensayo de Kedde:

Fundamento: Permite reconocer la presencia de **glicósidos cardiotónicos**.

Reactivos: Kedde A y Kedde B a partes iguales

Procedimiento: Una alícuota del extracto se mezcló con 1 mL del reactivo y se dejó reposar durante 5-10 min. Se observaron los cambios de coloración.

Evidencia: El ensayo se considera positivo si se desarrolla una coloración violácea persistente durante 1-2 horas

Ensayo de Mucílagos:

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de estas estructuras tipo **polisacárido**, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae.

Procedimiento: Una alícuota del extracto en agua se enfrió a 0-5 °C durante 15 min.

Evidencia: El ensayo es positivo si la solución toma una consistencia gelatinosa.

2.6 Formulación de la crema cosmeceútica

Sobre la base de las formulaciones realizadas en tesis anteriores y considerando las características del extracto de la planta en estudio, así como su posible efecto sobre el acné; la formulación de partida se integró por siete componentes (Tabla 2).

Tabla 2 Componentes de la formulación cosmecéutica, cantidad y funciones.

No.	Componentes	Cantidad (%)	Función en la formulación
1	Polawax	3 ó 5	emulsionante, endurecedor, fase oleosa
2	Glicerina	10	humectante
3	Benzoato de sodio	0,2	preservo
4	Petrolato sólido	5	hidratante, fase oleosa
5	Extracto de <i>J. gossypifolia</i>	2 ó 4	IFA
6	Aceite esencial de almendra dulce	0,14	aromatizante
7	Agua destilada c.s.p	100	fase acuosa

2.6.1 Diseño de experimentación para la obtención de la emulsión

Se elaboró un diseño experimental factorial 2^3 y se realizó la evaluación estadística mediante un ANOVA multifactorial. Para los análisis se utilizó el paquete de programas estadísticos Statgraphics Centurion XV versión 15.2.14 del 2007.

Los factores independientes fueron: cantidad de extracto, cantidad de Polawax y velocidad de agitación, según muestra la tabla 3, para un total de ocho formulaciones (Tabla 4) con dos réplicas cada una.

Tabla 3 Factores independientes empleadas en el diseño factorial 2^3 .

Factores	Nivel bajo	Nivel alto
Cantidad de extracto	-1 = 2%	+1 = 4%
Cantidad de Polawax	-1 = 3%	+1 = 5%
Velocidad de agitación	-1 = 500 rpm	+1 = 1500 rpm

Tabla 4 Factores independientes distribuidos en las formulaciones obtenidas.

Formulación	Cantidad de extracto (%)	Cantidad de Polawax (%)	Velocidad de agitación (rpm)
1	4	5	1500
2	2	3	500
3	4	3	1500
4	2	3	1500
5	4	5	500
6	2	5	500
7	2	5	1500
8	4	3	500

2.6.2 Metodología de elaboración

Preparación de la fase oleosa:

Se pesaron el petrolato y el polawax para cada formulación.

Se transfirieron a un beaker y se calentó a 75°C en baño de María hasta fusión.

Se agitó manualmente hasta homogenización de la mezcla.

Preparación de la fase acuosa:

Se pesó el benzoato de sodio.

Se disolvió en agua destilada y se calentó hasta alcanzar la temperatura de 75°C.

Se agitó manualmente hasta lograr disolución.

Preparación de la emulsión:

Se verificó que tanto la fase acuosa como la oleosa estuvieran a igual temperatura (75 °C).

Se adicionó la fase acuosa a la oleosa agitando continuamente en agitador

eléctrico a la velocidad definida hasta disminución de temperatura a 40 °C.

Se incorporó, seguidamente, la fragancia y el extracto de la planta que fue previamente mezclado con glicerina.

Se agitó a 500 rpm o 1500 rpm, según la formulación.

Se dejó en reposo la emulsión hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Se envasó cada formulación en frascos de brocal ancho bien cerrados.

Las emulsiones se mantuvieron durante 48 horas a temperatura ambiente para ser sometidas a las pruebas de control de la calidad y estabilidad física tecnológicas.

2.6.3 Pruebas de control de la calidad

Características organolépticas

Para la determinación de este parámetro de calidad se tuvo en cuenta el color, olor, apariencia, brillo, homogeneidad y presencia de grumos.

Tipo de emulsión

Para determinar si las emulsiones formuladas eran directas o inversas se realizaron dos ensayos: la prueba de dilución y la de lavado.

Prueba de dilución: Para esta prueba se dispersaron 0,5 g de la emulsión en 50 mL de agua destilada. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

- Si tras la dilución la preparación toma aspecto lechoso es una emulsión directa, aceite/agua (O / W).
- Si no permite dilución (el agua se separa como una capa sobre la emulsión) es una emulsión inversa, agua/aceite (W / O).

Prueba de lavado: En este caso se colocó aproximadamente 1 g de emulsión sobre la superficie seca de la mano. Seguidamente se aplicó sobre la misma, agua corriente y se trató de lavar esta porción de emulsión con ayuda del dedo índice. La determinación del tipo de emulsión se realizó siguiendo los siguientes criterios:

- Si se puede lavar completamente es una emulsión directa.
- Si no se puede lavar completamente es una emulsión inversa.

Extensibilidad

Procedimiento: Sobre el centro de una placa de vidrio de 20 x 20 cm se colocaron 2 g exactamente pesados de la emulsión, de manera que coincidiera con el centro de 8 radios trazados en un papel milimetrado y que fue colocado previamente en la parte inferior de la placa. Sobre los 2 g de muestra, se colocó otra placa de igual dimensión y a los 5 minutos se midió la distancia desde el punto de aplicación a los bordes en las 8 direcciones. Se determinó el área de la circunferencia formada por la emulsión, empleando la siguiente ecuación:

$$E=A= \pi [(r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5 + r_6 + r_7 + r_8)/8]^2 \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde:

E: Extensibilidad del producto (cm²)

A: Área de la circunferencia formada (cm²)

π = Constante (3,1416)

$r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6, r_7$ y r_8 : Radios de la circunferencia formada por la emulsión (cm).

Densidad aparente

Procedimiento: Con la muestra en estudio se completó un volumen de 10 mL de una probeta. Para ello la emulsión se añadió lentamente y de forma constante dejándola correr por las paredes de la misma para evitar que quedara aire ocluido. La probeta se golpeó repetidas veces y suavemente sobre una toalla doblada para eliminar la posible incorporación de aire. La densidad aparente se calculó según la ecuación siguiente:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{P_1 - P_0}{V} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde:

P_0 : Peso de la probeta vacía (g)

P_1 : Peso de la probeta con la muestra de ensayo (g)

V: Volumen de la probeta ocupado por la muestra de ensayo (mL)

Determinación del pH

El pH de las emulsiones en estudio se determinó según lo establecido en la Norma Cubana 836: 2011 para cosméticos. Para ello se dispersó aproximadamente 1 g de la formulación en 10 mL de agua destilada y se midió el pH empleando un pHmetro a 28 °C.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS para Windows versión 22 del 2013. Primeramente se realizó un estudio descriptivo de los datos para conocer su naturaleza y sus tendencias básicas. Para ello se calcularon las principales medidas de tendencia central y de dispersión de los grupos de formulación teniendo en cuenta las variables pH, extensibilidad y densidad. También se realizó un análisis sobre la distribución de los datos utilizando el test de Shapiro-Wilks.

Se usaron las técnicas no paramétricas en la comparación de las medias entre los diferentes grupos. Luego se compararon las medias entre los grupos de formulación para todas las variables antes mencionadas. Para ello se empleó el test no paramétrico de Kruskal Wallis para el análisis de varianzas de los diferentes grupos y luego el test no paramétrico de Mann Whitney para localizar las diferencias entre las parejas de grupos.

2.6.4 Pruebas de estabilidad física acelerada

Para la evaluación de la estabilidad física, todas las formulaciones obtenidas con el diseño experimental fueron sometidas a tres métodos acelerados: la prueba de

centrifugación, el ensayo de ciclos frío/calor y el de los ciclos congelación /descongelación.

Prueba de centrifugación

A un tubo de centrífuga graduado se transfirieron 10 mL de la formulación. Seguidamente se colocó el tubo en una centrífuga manteniéndose a 3000 rpm, a temperatura ambiente y durante 30 min. Posteriormente se observó si había evidencia de cualquier signo de inestabilidad física (cremado, coalescencia, separación de fases). Si al finalizar el ensayo no se detecta ninguno de los signos de inestabilidad mencionados, se considera que la emulsión debe poseer una estabilidad física satisfactoria.

Ciclos frío/calor

En un tubo de ensayo se colocó, aproximadamente, 2 mL de la emulsión y se mantuvo en un refrigerador a 3,5 °C durante 24 h. Cumplido el tiempo, la misma muestra se sometió a una temperatura de 40 °C en una estufa durante otras 24 h. El ciclo se repitió 2 veces y una vez finalizados se observó si había evidencia de cualquier signo de inestabilidad física (cremado, coalescencia, separación de fases). Si al finalizar el ensayo no se detecta ninguno de los signos de inestabilidad mencionados, se considera que la emulsión debe poseer una estabilidad física satisfactoria.

Ciclos congelación/descongelación

En un tubo de ensayo se colocó, aproximadamente, 2 mL de la emulsión y se mantuvo en un refrigerador a -0,5 °C durante 24 h. Cumplido el tiempo, la misma muestra se sometió a una temperatura de 40 °C en una estufa durante otras 24 h. Este ciclo se repitió 2 veces. Finalizados los dos ciclos se observó si había evidencia de cualquier signo de inestabilidad física (cremado, coalescencia, separación de fases). Si al finalizar el ensayo no se detecta ninguno de los signos de inestabilidad mencionados, se considera que la emulsión debe poseer una estabilidad física satisfactoria.

2.7 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. y de formulaciones que lo contenían en diferentes concentraciones, frente a los microorganismos de ensayo mediante el método de difusión en pozo, descrito por Álvarez y colaboradores en el 2005 (52).

Sustancias de ensayo

- Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. que se obtuvo según se describe en el acápite 2.3 del presente trabajo.

A partir del extracto (sólidos totales de 72,03 mg/mL) se realizaron tres diluciones con agua destilada de concentraciones finales de 2,8813 mg/mL, 4,3222 mg/mL y 12,9659 mg/mL, denominadas en lo sucesivo como E₁, E₂ y E₃, respectivamente.

- Formulación con diferentes concentraciones del extracto

Se prepararon tres formulaciones (C₁, C₂ y C₃) con composición similar a la formulación 1, descrita en el acápite 2.6.1, con el empleo de cantidades diferentes de extracto (2 mL, 3 mL y 9 mL) que aportaron concentraciones finales de 2,8813 mg/mL, 4,3222 mg/mL y 12,9659 mg/mL, respectivamente.

Sustancia de referencia

La sustancia de referencia fue la crema de Gentamicina al 0,1 %, comercializada por la Empresa Laboratorio Farmacéutico Roberto Escudero Díaz de Cuba.

Otras sustancias

Formulación de igual composición a la formulación 1 (acápites 2.6) sin extracto.

Microorganismos de ensayo

El estudio se realizó con dos cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de lesiones en piel, procedentes del Laboratorio Provincial de Microbiología de Santa Clara, Villa Clara. Las cepas fueron identificadas y caracterizadas por los métodos

internacionalmente aceptados y establecidos en los laboratorios de microbiología clínica del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP). Además se utilizó una cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (53).

Preparación del inóculo

Inicialmente las cepas se sembraron por agotamiento en placas con agar Mueller-Hinton, las placas fueron incubadas de 18 a 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron de tres a cinco colonias de las cepas y se suspendieron en tubos que contenían 5 mL de solución salina fisiológica estéril, los cuales se homogenizaron vigorosamente. Finalmente se comparó la turbidez con el patrón 0,5 de la escala de McFarland para lograr la estandarización del inóculo aproximadamente entre $4 \text{ y } 5 \times 10^8$ UFC/mL.

Medios de cultivo

Se emplearon para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, caldo y agar Mueller-Hinton.

➤ **Caldo Mueller-Hinton**

Se pesaron 2,1 g del caldo en balanza analítica y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Posteriormente se filtró la disolución, se midió el pH, ajustándolo hasta $7,3 \pm 0,2$ con papel indicador de pH y el caldo se distribuyó en tubos de ensayos. Luego los tubos se colocaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se pasaron las cepas al medio bajo flujo laminar y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

➤ **Agar Mueller-Hinton**

Se pesaron 22,8 g del agar en balanza analítica y se suspendieron en 600 mL de agua destilada. El preparado se disolvió con ayuda de un agitador magnético, sin calor. Se midió el pH, ajustándolo hasta 7.3 ± 0.2 con papel indicador de pH. Se distribuyó en un erlenmeyer que fue colocado en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Luego se vertió 20 mL del medio recién preparado y enfriado a temperatura ambiente en 24 placas Petri de vidrio con fondo plano, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada.

Procedimientos y técnicas

La secuencia de las operaciones, a través del método de difusión en pozos, fue la siguiente:

1. Las placas con Agar Mueller-Hinton se inocularon con las suspensiones de los microorganismos, con un total de seis placas por cada uno: cepas clínicas (1, 2) y cepa control (ATCC 25923). Los inóculos se realizaron de forma que se pudiera lograr un desarrollo uniforme de los mismos sobre la superficie de las placas.
2. Posteriormente, con la ayuda de un sacabocado se realizaron tres perforaciones de 6 mm de diámetro en cada placa.
3. Todas las sustancias (de ensayo, de referencia y otras), en sus diferentes concentraciones, se evaluaron frente a las tres cepas. Se empleó una placa con tres pozos, por cada muestra en estudio, para un total de tres réplicas por sustancia. En cada pozo se adicionaron 40 μ L de sustancia en estudio.
4. Todas las placas se incubaron a 37 °C y se procedió con la lectura a las 24h, 48h y 72h.

En un segundo experimento se procedió a evaluar el extracto hidroalcohólico a las concentraciones de (72,03; 7,20; 3,6; 1,8; 0,90 mg/mL), según la metodología descrita anteriormente, con la diferencia de que las placas se prepararon con mayor cantidad de medio de cultivo, y en cada pozo se adicionaron 100 μ L del extracto y sus diluciones. Las placas se incubaron a 37 °C y se procedió con la lectura a las 24h, 48h y 72h.

Capítulo 3:

Resultados y discusión



3.1 Obtención, estudio y evaluación del material vegetal

3.1.1 Recolección, secado y molinado del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó de forma manual. Solo se tomaron las partes sanas de interés y se eliminaron las materias extrañas para evitar posibles interferencias en los resultados.

Durante el proceso de secado, las hojas se colocaron al aire libre a la sombra, se removieron con frecuencia para lograr la uniformidad en la operación y evitar el enmohecimiento, así como otros tipos de infestación por microorganismos (54). Se empleó además el secado con calor artificial que permitió un control de la temperatura, de la humedad ambiental y del tiempo que duró dicho proceso (55). Una vez que el material se molinó, se almacenó en bolsas de nylon negro dentro de una desecadora para proteger a los metabolitos de las alteraciones químicas provocadas por la acción de la luz y la contaminación microbiana.

3.1.2 Pruebas de control de la calidad de la droga

La calidad para los medicamentos a base de plantas medicinales es un requisito básico, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia. Considerando la creciente participación de las plantas medicinales y de los medicamentos de origen vegetal en el arsenal terapéutico, se hace más necesario efectuar el control de calidad a través de eficientes técnicas modernas. Las plantas medicinales que constituyen la materia prima para la elaboración de productos fitoterapéuticos poseen variaciones en el contenido de sus principios activos y pueden sufrir deterioro y contaminaciones. Por esta razón, el control de calidad de las materias primas vegetales es de particular importancia (55) (56).

Se realizaron ensayos cuantitativos a las hojas secas y molinadas, como parte del análisis farmacognóstico de materias primas vegetales. Dichos ensayos se basaron en la determinación de los índices numéricos: contenido de humedad y cenizas totales.

Las drogas vegetales contienen todos los requerimientos esenciales para el crecimiento de hongos y bacterias, siendo el exceso de agua el principal responsable de estas implicaciones; lo que puede causar también la hidrólisis de los constituyentes de la droga. Las monografías de las farmacopeas limitan el contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en aquellas en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Una vez que toma lugar la infestación el deterioro puede ser muy rápido, por lo que la determinación del contenido de humedad es de suma importancia (55).

El valor de humedad para la droga en estudio fue de 7,59 % (Tabla 5), por lo tanto cumple con los límites permisibles (8-14%) y establecidos por Miranda y Cuéllar (50), lo que indica que las condiciones de secado fueron las adecuadas. Además dicho valor es cercano a los obtenidos por otros autores para esta planta cultivada en la zona central de Cuba (57, 58). A pesar de que el contenido de humedad determinado es ligeramente superior al descrito por Khyade y Vaikos (2011) para una planta de la India, se mantiene el requerimiento establecido para limitar el crecimiento de microorganismos en el material.

Tabla 5 Índices numéricos para la droga seca de *Jatropha gossypifolia* L. (media aritmética \pm desviación estándar, n= 3).

Índices numéricos	Valores ($\bar{x} \pm S$), n=3	Especificación USP
Humedad (%)	7,59 \pm 0,05	\leq 14 %
Cenizas totales (%)	10,73 \pm 0,54	\leq 12%

Otro de los parámetros de calidad que se evaluó para la droga seca fue la determinación de cenizas totales. La ceniza resultante de la incineración del material vegetal puede ser fisiológica y no fisiológica, por lo que el proceso de determinación de cenizas totales engloba el análisis de ambos tipos de cenizas. Se denomina ceniza fisiológica a aquella derivada de los componentes minerales de la propia planta. La que se deriva de materia extraña, principalmente suelo y arena, que se adhieren a la superficie de la droga se denomina ceniza no

fisiológica. El proceso consiste en determinar la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la droga. Las cenizas totales usualmente consisten en carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice. Este ensayo es de extrema importancia e indica el extenso cuidado tomado durante la preparación de la droga (55).

El valor de cenizas totales de la droga en estudio fue de 10,73 %, como se evidencia en la tabla 3.1; y cumple con lo establecido por la USP # 28, cuyo límite es de 12 % (59).

3.2 Obtención del extracto hidroalcohólico

Para la obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. se siguió la metodología que en nuestro grupo de investigación se estableció desde un inicio (60), y consistió, esencialmente, en humectar la droga seca y pulverizada con la solución hidroalcohólica y someterla a reflujo durante 2 h a 98°C. Posteriormente se rotoevaporó a una temperatura de 40°C. Esta mezcla de disolventes propicia la extracción de un elevado número de metabolitos de interés (61, 62). Además, son más baratos que otros de uso frecuente, y por no ser tóxicos son más seguros para su empleo en formulaciones y para el medio ambiente. Por otra parte, la mezcla hidroalcohólica al 70% conduce a extractos que mostraron actividades antimicrobiana, antiinflamatoria (60), antioxidante (58) y analgésica, así como resultados favorables desde el punto de vista toxicológico (57). También se consideró que los extractos hidroalcohólicos se emplean comúnmente por otros autores en la extracción de metabolitos a partir de diferentes plantas (63-65).

3.3 Caracterización del extracto

En el presente trabajo se incluyó la caracterización del extracto obtenido desde diferentes puntos de vista, a pesar de que se emplean condiciones similares para su obtención a las empleadas por Rivero y colaboradores en el 2014 y Pérez y colaboradores en el 2016, con el propósito de valorar si el extracto, obtenido a partir de la planta recolectada en el municipio Quemado de Güines, posee un

comportamiento similar al que ya se ha trabajado por el grupo de investigación. Esta caracterización incluyó aspectos físico-químicos y fitoquímicos.

3.3.1 Caracterización físico-química del extracto

Las propiedades físico-químicas del extracto que se consideraron en el presente trabajo incluyeron: las características organolépticas (color, olor, apariencia), densidad relativa, pH, índice de refracción y sólidos totales.

En cuanto a las características organolépticas el extracto presentó color verde intenso debido a la significativa extracción de pigmentos clorofílicos, típico de los extractos vegetales; olor penetrante, con partículas suspendidas y sedimentadas. La aparición de estas partículas pudiera atribuirse a la disminución de la solubilidad de metabolitos al evaporarse gran parte del etanol durante la rotoevaporación (Tabla 6).

Tabla 6 Características físico-químicas del extracto.

Características organolépticas			
Olor	Color	Aspecto	
Penetrante	Verde intenso	Líquido con partículas suspendidas y sedimentadas	
Densidad relativa (g/cm³)	pH	Índice de refracción	Sólidos totales (%)
1,059	5,58	1,359	7,203 ± 0,144

Con relación a la densidad relativa se obtienen valores de alrededor de la unidad (g/cm³). El extracto posee un valor de pH de 5,58, ligeramente ácido que se puede atribuir a la presencia de metabolitos secundarios con características ácidas, tales como: flavonoides, saponinas, taninos y fenoles detectados en el tamizaje

fitoquímico (66) (5). Este valor de pH es favorable para el tipo de formulación que se desea preparar y para el tratamiento del acné.

El índice de refracción es una determinación muy útil como medio de identificación y comprobación de la pureza de una sustancia. También se emplea comúnmente como uno de los ensayos en la caracterización de los extractos de plantas medicinales. Su valor fue de 1,359; que al compararlo con el del agua se comprueba que es ligeramente superior (1,333) lo que indica que el disolvente mayoritario tras la rotoevaporación es agua y que se extrajeron compuestos químicos, que tienen la propiedad de refractar la luz en correspondencia con su estructura química.

Los sólidos totales permiten tener elementos de la cantidad de metabolitos que el sistema de solventes empleado fue capaz de extraer del material vegetal. En este caso poseen un valor de 7,203 % que corresponde a 72,03 mg/mL; similar al obtenido por Rivero y colaboradores (2014) a partir de plantas recolectadas en el poblado de San Fernando de camarones municipio Palmira, provincia de Cienfuegos, que fue de 78,90 mg/mL. Sin embargo difiere del valor obtenido por Pérez y colaboradores (2016) a partir del material vegetal de esta planta obtenido en el municipio Fomento en la provincia de Sancti Spíritus, que fue muy superior (470,00 mg/mL). En este último caso, el contenido de sólidos totales difiere marcadamente del resto, lo que pudiera atribuirse al tipo de suelo y otros factores característicos del sitio y momento de recolección.

3.3.2 Caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico

El tamizaje o screening fitoquímico es una de las etapas intermedias de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. En la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir la concentración de los mismos, la solubilidad en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes. Con el screening fitoquímico se obtienen

datos preliminares sobre los componentes químicos de la planta y constituye únicamente una orientación que debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (55, 67).

Debido a que el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. será utilizado en la elaboración de una crema cosmecéutica para el tratamiento del acné, es conveniente conocer la naturaleza química de sus componentes. Esta información puede guiarnos sobre las posibles acciones farmacológicas que logre ejercer y los posibles metabolitos responsables de las mismas. En correspondencia con los criterios mencionados anteriormente se realizó la evaluación fitoquímica del extracto en cuestión.

De acuerdo a los resultados expresados en la tabla 7 sobre el estudio fitoquímico, se determinó la presencia de ciertos metabolitos secundarios en el extracto de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., tales como: saponinas, alcaloides, taninos, flavonoides, triterpenos, coumarinas, azúcares reductores y aminoácidos libres. Sin embargo, a diferencia de otros estudios realizados a extractos hidroalcohólicos de *Jatropha gossypifolia* L. de plantas obtenidas en otras zonas de la región central de nuestro país cita de (58, 60), el ensayo para la determinación de quinonas fue negativo. La ausencia de este grupo de metabolitos pudiera influir negativamente en los resultados de las actividades farmacológicas descritas para la planta.

Dada la presencia de estos fitocomponentes en el extracto hidroalcohólico en estudio, se asocian al mismo propiedades farmacológicas según lo reportado en las fuentes bibliográficas consultadas. Por ejemplo, la presencia de taninos y otros componentes fenólicos como los flavonoides le otorgan a la planta propiedades antiséptica, antiinflamatoria y antioxidante, siendo esta última la actividad mejor descrita para los flavonoides, que es muy potente y permite proteger al organismo humano de la acción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno. A estos compuestos se les asocia además efecto antimicrobiano, antialérgico así como antitumoral, entre otros. Por otra parte, los alcaloides incluyen, dentro de una

amplia gama de actividades farmacológicas, aquellas de tipo antihipertensiva, antiarrítmica, antimalarial y anticancerígena. Las saponinas, se asocian con propiedades inmunoestimulantes, hipocolesterolémicas, anticarcinogénicas y antioxidantes. Mientras que para los terpenos se reporta acción anticarcinogénica, antimalarial, diurética, antiulcerosa y antimicrobiana (68) (69).

Tabla 7 Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Extracto	Metabolito	Ensayo	Evidencia
Hidroalcohólico	Resinas	Resinas	-
	Saponinas	Espuma	+
	Alcaloides	Dragendorff	+
	Glicósidos cardiotónicos	Kedde	-
	Fenoles y/o Taninos	Cloruro férrico	+
	Flavonoides	Shinoda	+
	Triterpenos y/o Esteroides	Liebermann-Burchard	+
	Quinonas	Borntrager	-
	Coumarinas	Baljet	++
	Azúcares reductores	Fehling	+
	Aminoácidos libres	Ninhidrina	+
	Mucílagos	Mucílagos	-

Legenda: (++) positivo, (+) ligeramente positivo, (-) negativo

3.4 Selección de la forma cosmeceútica

Las terapias que se utilizan comúnmente para el tratamiento del acné incluyen agentes como el peróxido de benzoílo, antibióticos y retinoides que se mantienen

como una buena elección para la administración tópica y sistémica. Sin embargo estos medicamentos producen el desarrollo de resistencia en el caso de los antibióticos usados frecuentemente (3), y potenciales efectos secundarios como resequedad e irritaciones, principalmente con los retinoides (1); lo que sumado al efecto irritante que causan los ácidos grasos que se generan a partir de las lipasas y las proteasas liberadas por *P. acnes* (7) (8), conlleva a que en muchos casos los pacientes abandonen el tratamiento (70, 71). Por otra parte, las formulaciones cosmeceúticas en el mercado no son completamente efectivas y muchas de ellas tratan los síntomas y no las causas. Por estas razones es necesario encontrar nuevas fuentes alternativas para el tratamiento tópico o sistémico de esta afección cutánea.

Para el diseño de la formulación, además del ingrediente activo, es importante considerar elementos como la selección de un vehículo adecuado, que desempeñe su papel en la formulación en una forma activa y estable, no comedogénico ni irritante para la piel y que sea capaz de reparar y mejorar la función barrera de dicho órgano, además de ser estéticamente agradable logrando conformidad en los pacientes (71).

Debido a que muchos de los componentes que pueden formar parte de la fase oleosa de las emulsiones, así como los agentes emulsionantes empleados, tienden a ser comedogénicos y/o irritantes, la mayoría de los productos farmacéuticos, cosméticos y cosmeceúticos que están actualmente en el mercado para el acné se comercializan en forma de gel. Sin embargo muchos de estos geles no contribuyen a la hidratación, a la correcta función barrera de la piel, por lo que no favorecen positivamente, en este sentido, la terapia integral del acné. Por estas razones, actualmente, se insiste en la importancia del vehículo en el tratamiento del acné. En el caso de los geles, en la actualidad se incorporan como hidratantes oclusivos de la piel siliconas, tales como dimeticona y ciclometicona, porque son agentes no grasosos, hipoalergénicos, no comedogénicos y libres de fragancias (70).

Otra alternativa de forma cosmecéutica serían las emulsiones semisólidas, siempre y cuando se realice una minuciosa selección de los componentes que la forman. En nuestro estudio se decidió optar por esta variante porque permite incluir hidratantes oclusivos y humectantes, que contribuyen muy favorablemente al buen funcionamiento de la piel, y por tanto al tratamiento integral del acné.

3.4.1 Selección de los componentes de la formulación

La selección adecuada de la forma cosmecéutica no es suficiente para satisfacer los requerimientos del acné en cuanto al desarrollo tecnológico. Otro elemento importante es la adecuada selección de sus componentes. En este sentido la emulsión en forma de crema debe presentar componentes no comedogénicos ni irritantes, así como aportar hidratación y humectación a la piel. De este modo el producto final tendrá una elevada aceptación por parte de los pacientes, lo que podría coadyuvar al cumplimiento de la terapia. Sobre este fundamento se seleccionaron los ingredientes de la formulación.

Composición cualitativa

➤ Emulsionante

Uno de los componentes críticos a seleccionar es el emulsionante. En nuestro caso se seleccionó el polawax, cera no iónica, muy usada en la industria cosmética y farmacéutica porque posee muchas propiedades beneficiosas para formulaciones antiacné en forma de emulsión. Estas incluyen su color blanco o blanquecino y su apariencia, al fundirse, de líquido transparente, casi incoloro, y olor neutro; que influyen positivamente en las características organolépticas del producto final. Por otra parte es un producto estable que se considera como material no tóxico, no irritante y no comedogénico, lo que contribuye a la estabilidad de la emulsión y a la eficacia y seguridad del tratamiento (72, 73).

Se utiliza como agente emulsionante en la producción de emulsiones de aceite en agua que no se afectan por concentraciones moderadas de electrolitos y son

estables en un amplio intervalo de pH, no necesitan de coemulsionantes o estabilizantes. Produce en la emulsión, cristales líquidos y estructuras laminares, promoviendo así la hidratación a largo plazo y la liberación progresiva del principio activo. La concentración de polawax influye en la consistencia del producto. A concentraciones más bajas (2-3%) se forman fácilmente emulsiones fluidas y pueden ser un suplemento de emulsionantes no iónicos, aniónicos o catiónicos para mejorar la estabilidad. A concentraciones más altas (5-10%) produce sistemas más viscosos que muestran una buena estabilidad física a largo plazo (74).

➤ **Humectante e hidratante**

Las terapias tópicas como el peróxido de benzoílo, retinoides, antibióticos y ácido salicílico con preparaciones con base de alcohol, pueden causar irritación y sequedad en la piel lo que resulta en la disminución de la adherencia de los pacientes al tratamiento. Esta sequedad e irritación de la piel puede causar una pérdida de la capacidad barrera del estrato córneo, lo que conduce a un incremento de la pérdida de agua transepidérmica y en la aparición de inflamación. Debido a esto algunos médicos recomiendan a sus pacientes el uso de hidratantes como coadyuvantes en el tratamiento del acné. Además algunas evidencias muestran que los hidratantes pueden contribuir, por sí solos, a minimizar los signos y síntomas negativos del acné.

Los hidratantes pueden actuar de diferentes formas: formando una barrera oclusiva (petrolato, lanolina, aceite mineral, escualeno y derivados de silicona); como humectantes, al atraer agua desde la dermis hacia la epidermis (glicerina, lactato de sodio, ácido hialurónico, sorbitol, urea y α -hidroxiácidos); y como emolientes, los cuales suavizan la piel debido a que ocupan los espacios entre las escamas de la piel con gotas de aceite (aceite de castor, propilenglicol, dimeticona) (71, 72).

Por estas razones se seleccionaron la glicerina y el petrolato como hidratantes; además son baratos, no tóxicos, no irritantes ni comedogénicos (73). La glicerina

también se considera un buen disolvente de sustancias orgánicas y minerales, es miscible con agua y etanol al 96%, y las mezclas que forma con agua, etanol (95%) y propilenglicol son químicamente estables, lo que contribuye muy favorablemente al desarrollo tecnológico de la formulación. Además se le confiere función emoliente, hidratante, osmótica, con propiedades higroscópicas y lubricantes contribuyendo a la protección y textura de la piel.

Se utiliza en todo tipo de formas tópicas para casos de piel seca, asperezas cutáneas, ictiosis, eczemas no rezumantes, etc. Por otra parte, evita la evaporación de la fase acuosa en las emulsiones y sistemas gelificados, mejorando además sus propiedades plásticas. Actúa como disolvente y vehículo de muchos principios activos para su posterior incorporación a las formas farmacéuticas tópicas. No suele asociarse con ningún efecto adverso y se considera generalmente como un material no tóxico y no irritante (74).

Por su parte, es importante incluir al petrolato en la formulación, no solo para favorecer la hidratación de la piel, sino también porque formaría parte de la fase oleosa. Además, es un material inerte con pocas incompatibilidades, e inherentemente estable debido a su naturaleza química, de hidrocarburos, no reactiva. Constituye un excipiente hidrófobo para la preparación de formulaciones de uso tópico, ya sea como vehículo del principio activo o simplemente por sus propiedades emolientes, protectoras y oclusivas.

Es mal absorbido por la piel y no se presta a la absorción de los principios activos en ella incorporados. Por tanto se puede utilizar como excipiente único cuando interesa que el principio activo permanezca sobre la epidermis; en caso contrario se debe añadir otro excipiente que sí sea absorbido, como la lanolina. Para cremas tópicas emolientes se emplea con una concentración de 10-30% y para emulsiones tópicas de 4-25% (74).

➤ **Preservo**

Como estabilizante microbiológico se seleccionó al benzoato de sodio por ser muy

efectivo y seguro como preservo; de ahí su amplia utilización como conservante antimicrobiano en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos. La utilidad del benzoato de sodio como conservante está limitada por su eficacia en un intervalo de pH estrecho, inactivándose a valores de pH > 5. Se emplea comúnmente a concentraciones entre 0,1-0,5% en productos cosméticos (74).

➤ **Ingrediente activo**

Como ingrediente activo de la formulación se empleó el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. debido a las propiedades farmacológicas atribuidas al mismo (antimicrobiano, antiinflamatorio, analgésico, antioxidante) demostradas en acápite anteriores que son necesarias para lograr un tratamiento tópico adecuado del acné.

➤ **pH**

Uno de los factores determinantes en el desarrollo del acné es el pH de la piel, siendo considerado como uno de los aspectos a definir en el diseño de la crema. El pH de la piel varía según la parte del cuerpo. En la piel del rostro, por ejemplo, se pueden registrar valores de 4,0 a 4,9, en la frente, de 4,5 a 5,6, y en el antebrazo, de 4,2 a 5,4 (75). El pH óptimo de crecimiento de las bacterias *P. acnes* y *S. aureus* es de 6,0 a 7,0 y de 5,5 a 7,0, respectivamente (76, 77); por esta razón, se considera que el pH de la crema debe tomar valores entre 4 a 5 con el fin de disminuir el crecimiento de las bacterias y restablecer el pH normal de la piel afectada (1). Además se debe tomar en consideración la influencia del pH en la estabilidad de componentes como el benzoato de sodio. Se incluirán reguladores de pH si fuera necesario.

➤ **Otros componentes**

Como vehículo de la fase acuosa se utilizó el agua destilada, que representa el mayor porcentaje dentro de la formulación, por lo que se hace necesario la incorporación del preservo.

Finalmente, como todo producto cosmético y/o cosmeceútico, requiere de un olor agradable se incluyó el aceite esencial de almendras dulces como fragancia. Se

podieran valorar otras opciones que se ajusten mejor a las preferencias de diferentes grupos de consumidores.

Se plantea entonces que el preparado final satisface las exigencias de las regulaciones actuales en cuanto a la no inclusión de componentes prohibidos en productos cosméticos. Por otra parte, los constituyentes del producto se caracterizan por ser no comedogénicos ni irritantes, condiciones indispensables para el tratamiento tópico para el acné.

Composición cuantitativa

La composición cuantitativa de la formulación (Tabla 8) incluye componentes básicos de una emulsión: una fase acuosa, una fase oleosa, un preservo y un emulsionante. Para el polawax se valoraron dos concentraciones (3 y 5 %) en busca de la consistencia adecuada de la crema. El ingrediente cosmeceútico activo se incluyó en dos concentraciones (2 y 4 %) con el propósito de valorar la influencia de la cantidad de extracto en la calidad y estabilidad de la formulación. Las proporciones del resto de los componentes se ajustaron de acuerdo a las establecidas (74).

Tabla 8 Componentes de la formulación cosmeceútica, cantidad y funciones.

No.	Componentes	Cantidad (%)	Función en la formulación
1	Polawax	3 ó 5	emulsionante, endurecedor, fase oleosa
2	Glicerina	10	humectante
3	Benzoato de sodio	0,2	preservo
4	Petrolato sólido	5	hidratante, fase oleosa
5	Extracto de <i>J. gossypifolia</i>	2 ó 4	IFA
6	Aceite esencial de almendra dulce	0,14	aromatizante
7	Agua destilada c.s.p	100	fase acuosa

3.4.2 Selección del método de elaboración de la emulsión

Uno de los aspectos que influye en la calidad tecnológica y estabilidad de las emulsiones cosmeceúticas es la tecnología de elaboración. Se conoce que para lograr una adecuada formación de la emulsión, además de la selección conveniente del emulsionante (tipo y proporción en la formulación), el orden de adición de los componentes, la velocidad de agitación, la temperatura a la que se elaboran, entre otros factores, cumplen un rol importante.

En principio, la técnica de elaboración es sencilla. Se comienza por preparar la fase acuosa, benzoato de sodio en agua, dada la elevada solubilidad de este preservo en dicho solvente y se calienta a 75 °C. Posteriormente se mezclan los componentes de la fase oleosa (polawax y petrolato) y a continuación se calientan a una temperatura superior a las de fusión de ambos componentes: 75 °C. La fase acuosa se vertió sobre la oleosa una vez que ambas alcanzaron el valor de 75 °C. La unión de las fases acuosa y oleosa a igual temperatura es un requisito imprescindible para lograr una adecuada calidad de la emulsión. La velocidad de agitación también puede afectar el grado de dispersión de la fase interna, la viscosidad, entre otras propiedades de la formulación. Por estas razones se emplearon dos variantes (500 o 1500 rpm). La fragancia y el extracto de la planta, que se mezcló previamente con glicerina, se adicionaron cuando la temperatura disminuyó a 40 °C para evitar alteraciones químicas. La presencia de partículas en el extracto hizo que fuera necesario incorporarlo, previamente disuelto en glicerina, para garantizar su solubilidad y evitar la presencia de estas partículas en la crema.

Por último, las formulaciones recién elaboradas permanecieron en reposo por 48 h hasta la evaluación de su calidad tecnológica para eliminar el aire entrampado durante la agitación mecánica y favorecer la estructuración del producto final. Luego se llevó a cabo su acondicionamiento en el envase definitivo (frascos plásticos de polietileno de alta densidad, de color blanco con opacidad apreciable), bien cerrados para proteger los componentes susceptibles a degradación por la luz. El producto se conservó a temperatura ambiente en un lugar fresco.

La metodología de elaboración que se empleó es simple, pues consta de pocos pasos, con una secuencia evidente de los mismos. Además el tiempo que consume es breve.

3.5 Evaluación de las formulaciones obtenidas mediante diseño factorial 2³

El desarrollo de formulaciones cosméticas, cosmeceúticas y farmacéuticas suponen la evaluación de un gran número de variables de formulación y proceso. La alternativa de “un factor a la vez” generalmente se emplea durante el desarrollo y validación de la formulación. Esta alternativa se basa en el método de prueba y error, que solo aporta información sobre el efecto de los factores individuales, no revela las posibles interacciones entre los factores y requiere de una enorme cantidad de experimentos, debido a que se incluye un solo factor cada vez para investigar su efecto en el comportamiento general.

Desde que se aprobó la ICH Q8 (de sus siglas en inglés: International Conference of Harmonization) para medicamentos, la alternativa de optimización de la calidad mediante el diseño (Quality by Design, en inglés) que se basa en la metodología del diseño de experimentos, se ha convertido en parte integral del desarrollo de la formulación. Esta metodología permite detectar los factores críticos, sus interacciones, y sugiere las mejores combinaciones de factores con un menor número de experimentos (78).

En nuestro caso, para el diseño de la formulación se empleó un diseño de experimentos factorial 2³, que incluyó factores de formulación (concentraciones del emulsionante, del extracto de la planta) y de proceso (velocidad de agitación), con un mínimo de 8 formulaciones.

3.5.1 Calidad tecnológica de las emulsiones cosmeceúticas

Para evaluar la influencia de los niveles de las variables independientes en las formulaciones obtenidas mediante el diseño factorial, se realizó su control de la calidad tecnológica a través de los ensayos cualitativos y cuantitativos, empleados comúnmente en este tipo de sistema disperso. El mismo incluyó la evaluación de las características organolépticas y tipo de emulsión, además de los ensayos que

se consideraron como factores respuesta en el diseño: pH, área de extensibilidad y densidad aparente.

Características organolépticas

Las formulaciones muestran un color crema, característico del extracto de *Jatropha gossypifolia* L., que varía ligeramente en la intensidad en función de la cantidad de extracto empleada. El olor en todas es característico de la fragancia empleada. Presentan poco brillo, aspecto homogéneo, untuosidad al tacto y no se manifiesta formación de grumos. El poco brillo pudiera atribuirse al extracto empleado, debido a que la formulación sin extracto lo presenta. A simple vista las formulaciones con 5 % del emulsionante son más viscosas, como era de esperarse debido al efecto endurecedor del polawax.

Tipo de emulsión

Todas las formulaciones mostraron aspecto lechoso en el ensayo de dilución y se eliminaron fácilmente de la piel tras aplicar el lavado con agua del grifo; comportamiento característico de las emulsiones directas (O / W). Estos resultados indican que las variaciones en las variables independientes no influyeron en el tipo de emulsión formada.

Resultados de las variables respuesta del diseño factorial 2³

Los resultados de las variables respuesta permitieron definir cómo influyeron los factores analizados. Para todas las variables respuesta se determinaron las diferencias significativas entre formulaciones, mediante el análisis de varianzas de los diferentes grupos por tests no paramétricos (Tabla 9).

Densidad aparente

Este método de ensayo se basa en el cálculo de la densidad de una muestra relacionando su volumen y su peso. Se emplea frecuentemente dentro de las especificaciones de calidad de productos cosméticos y farmacéuticos semisólidos. Los resultados para este parámetro en las formulaciones evaluadas pueden estar condicionados a los cambios en masa del polawax y del extracto de la planta en estudio, además por la inclusión de aire durante el proceso de elaboración. Como

puede observarse, en la tabla 9 y figura 4, existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre varias de las formulaciones, lo que muestra que las variaciones en el contenido de extracto y de polawax, así como en la velocidad de agitación, influyen significativamente en la densidad aparente de las formulaciones. A pesar de estas diferencias, los valores de densidad aparente, en todas las formulaciones, satisfacen los requerimientos de una crema cosmeceútica para el acné.

Tabla 9 Densidad aparente, extensibilidad y pH de las formulaciones obtenidas en el diseño factorial 2^3 .

Formulación	Factores independ.			Variables respuesta ($\bar{X} \pm DE$)		
	X ₁	X ₂	X ₃	Densidad aparente (g/mL)	Extensibilidad (cm ²)	pH
1	+	+	+	a 1,26 ± 0,10	abc 104,88 ± 39,77	b 4,76 ± 0,10
2	-	-	-	a 1,26 ± 0,01	ab 120,13 ± 37,13	abc 4,04 ± 1,17
3	+	-	+	b 1,14 ± 0,03	a 132,91 ± 40,41	a 5,06 ± 0,12
4	-	-	+	b 1,14 ± 0,00	b 101,60 ± 9,73	a 4,95 ± 0,07
5	+	+	-	d 1,02 ± 0,03	ab 105,33 ± 20,08	b 4,68 ± 0,10
6	-	+	-	ab 1,23 ± 0,12	c 79,82 ± 16,50	c 3,99 ± 0,57
7	-	+	+	c 1,06 ± 0,01	c 83,03 ± 10,20	b 4,58 ± 0,10
8	+	-	-	d 1,00 ± 0,02	a 127,39 ± 24,05	bc 4,30 ± 0,52

X1: Contenido de extracto: - (2 mL), + (4 mL)

X2: Contenido de polawax: - (3 %), + (5 %)

X3: Velocidad de agitación: - (500 rpm), + (1500 rpm)

DE: Desviación estándar

*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig. $p < 0.05$ (Análisis Vertical)

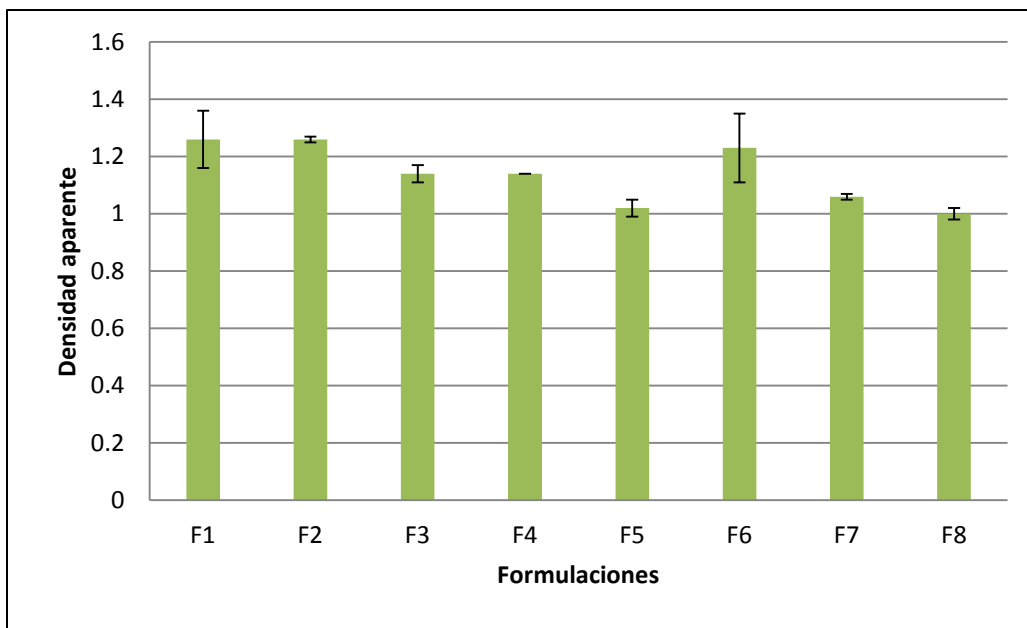


Fig.4 Densidad aparente de las formulaciones cosmeceúticas.

Extensibilidad

Este ensayo de control es de uso frecuente en las cremas cosméticas, cosmeceúticas y farmacéuticas, debido a que da una medida de la capacidad que tendrá la formulación de extenderse cuando se aplica sobre la piel. Además, se relaciona directamente con la viscosidad y no tiene valores de referencia para establecer una comparación. Constituye una propiedad importante de los semisólidos para la aplicación tópica, y es de gran valor para la aceptación por parte de los consumidores influyendo en su ajuste al tratamiento. La tabla 9 y figura 5 muestran los resultados obtenidos para este parámetro.

En este caso se observa un comportamiento similar al obtenido para la densidad aparente, caracterizado por la existencia de diferencias significativas entre varias formulaciones, lo que demuestra que las variaciones en el contenido de polawax, de extracto hidroalcohólico y en la velocidad de agitación influyen marcadamente en este parámetro. Cabe destacar las desviaciones estándares relativamente elevadas que pudieran atribuirse a las características del método, que es totalmente artesanal. Las 8 formulaciones presentan valores elevados de

extensibilidad, que son satisfactorios y que deben satisfacer las expectativas de los consumidores.

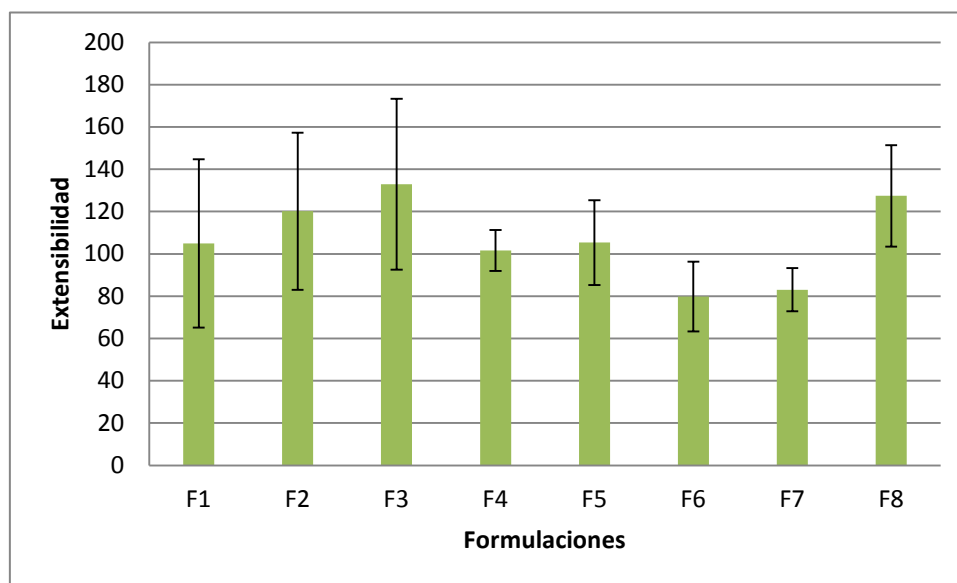


Fig. 5 Extensibilidad de las formulaciones cosmeceúticas.

pH

El pH del producto tóxico tiene que acercarse al pH de la piel que se encuentra entre 4 a 6,5. Cuando éste se encuentra fuera del rango, puede provocar alteraciones no favorables a la piel, es por ello, que la formulación tenga un pH dentro de este intervalo es de suma importancia al momento de formular las emulsiones (34) (79). El análisis estadístico de los resultados del pH para las formulaciones en estudio muestra que existen diferencias significativas entre varias formulaciones, lo que demuestra la influencia de los factores evaluados y sus combinaciones en esta propiedad (Tabla 9, Fig. 6) No obstante, en todas las formulaciones se obtienen valores dentro del intervalo: 4 y 5, que satisface los criterios fisiológicos, terapéuticos y tecnológicos.

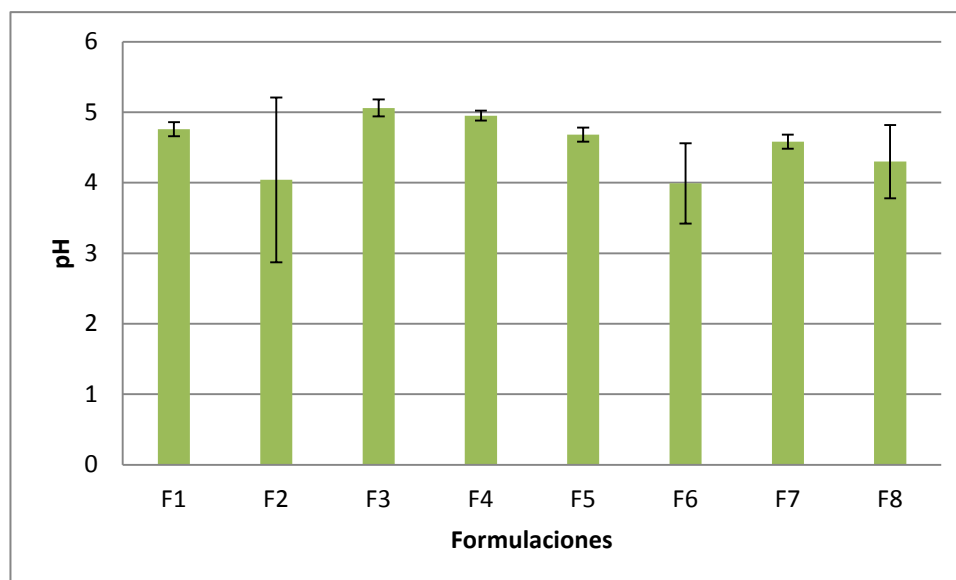


Fig. 6 Valores de pH de las formulaciones cosmecéuticas.

3.5.2 Estabilidad física acelerada

La estabilidad es uno de los criterios básicos que se debe tener en cuenta para definir la calidad de una emulsión cosmética, cosmecéutica y farmacéutica. Diseñar y realizar estos estudios permite obtener una información segura ya que nos demuestra cómo varía su calidad en un envase determinado, bajo la influencia de las condiciones de almacenamiento a la que es sometido. Esto permitirá proponer el período de validez durante el cual pueda utilizarse con absoluta seguridad y eficacia (66).

Como principio de las pruebas de estabilidad estas deben conducirse bajo condiciones que permitan proporcionar información sobre la estabilidad del producto en el menor tiempo posible, considerando que las muestras deben ser almacenadas en condiciones que aceleren los cambios posibles de ocurrir durante el plazo de validez (80).

En el presente trabajo se realizaron tres ensayos para evaluar la estabilidad física de las emulsiones: centrifugación, ciclos frío-calor y ciclos congelación-descongelación, que son ensayos acelerados. Tras la prueba de centrifugación se observa que la mayoría de las formulaciones presentan signos de inestabilidad,

caracterizados por la separación de una fase transparente en el fondo del tubo, por lo que deben tener una estabilidad limitada en condiciones reales de almacenamiento (Fig. 7).

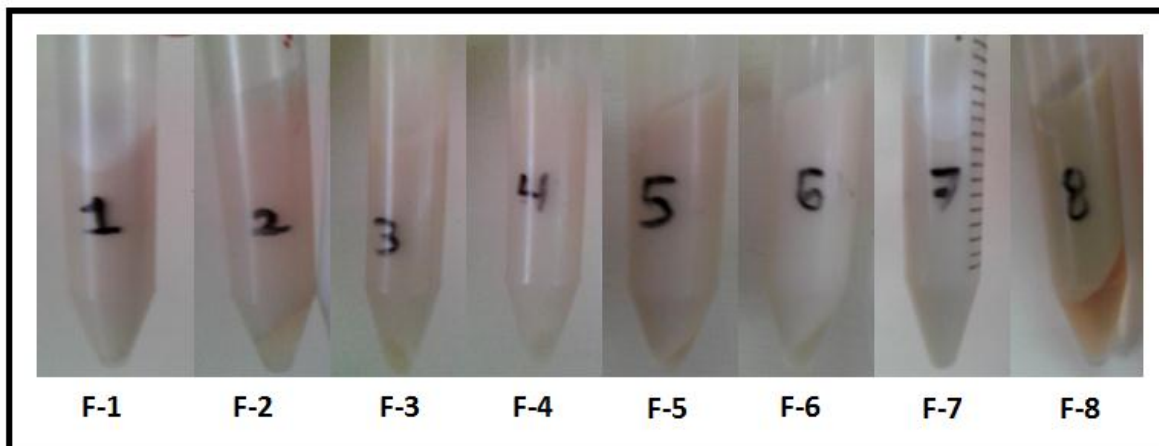


Fig. 7 Formulaciones después del ensayo de centrifugación.

Solo las formulaciones 1 y 7 mantuvieron inalteradas sus características físicas tras observación visual, lo que sugiere que deben tener un período de vida útil satisfactorio en cuanto a estabilidad física. Ambas difieren solo en la cantidad de extracto, pues contienen 5 % de emulsionante y velocidad de agitación de 1500 rpm.

Mientras que en los ciclos de frío-calor y congelación-descongelación todas las formulaciones presentaron una buena estabilidad y no manifestaron ningún cambio físico a simple vista (Fig.8 y Fig.9), con excepción de F8, que en el último caso, aunque no ocurre una separación evidente de la fase transparente en el fondo del tubo de ensayo, sí se observa tendencia a la ruptura de la emulsión. Estos resultados pueden explicarse por los bajos niveles de polawax, elevados niveles de extracto y baja velocidad de agitación.

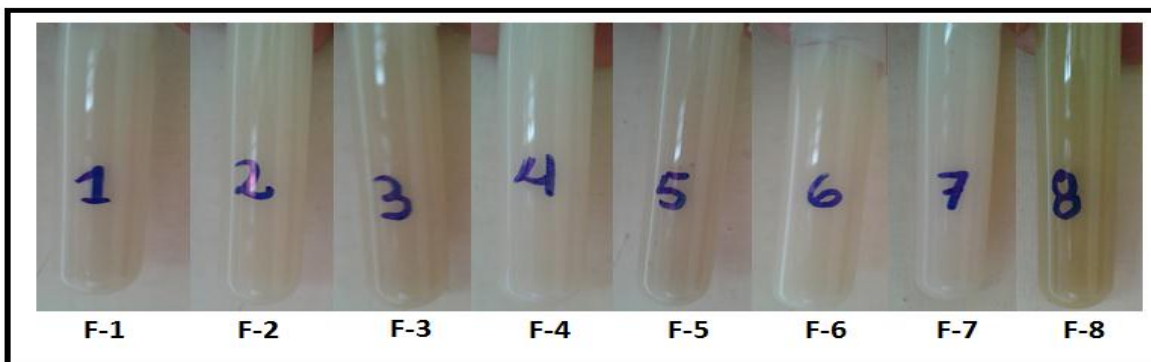


Fig. 8 Formulaciones después del ciclo Frío-Calor.

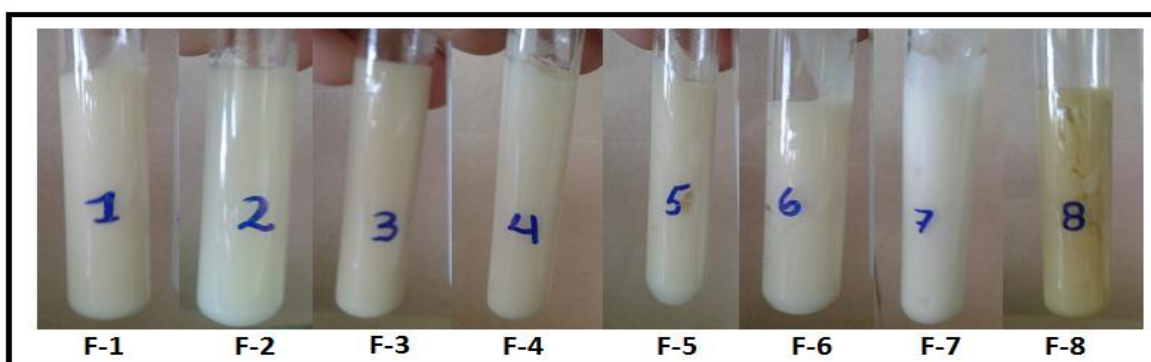


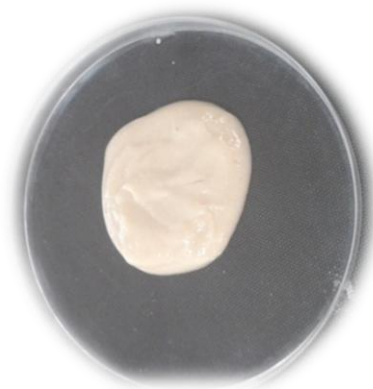
Fig. 9 Formulaciones después del ciclo Congelación-Descongelación.

3.6 Propuesta de la formulación definitiva

Una vez que se tienen elementos de las 8 formulaciones en cuanto a su calidad tecnológica y su estabilidad física mediante métodos acelerados, se determinó que la formulación que mejores resultados presenta es la F1 (5% de emulsionante, 4mL de extracto y 1500 rpm como velocidad de agitación). Se escogió esta formulación porque, de las evaluadas, es la que presenta mayor cantidad de extracto, y no se conoce la concentración de metabolitos en la formulación que manifestará la actividad antibacteriana. Sería conveniente evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de esta formulación con diferentes cantidades de extracto.

Tabla 10 Componentes de la formulación 1

No.	Componentes	Cantidad (%)	Función en la formulación
1	Polawax	5	emulsionante, endurecedor, fase oleosa
2	Glicerina	10	humectante
3	Benzoato de sodio	0,2	preservo
4	Petrolato sólido	5	hidratante, fase oleosa
5	Extracto de <i>J. gossypifolia</i>	4	IFA
6	Aceite esencial de almendra dulce	0,14	aromatizante
7	Agua destilada c.s.p	100	fase acuosa

**Fig. 10** Fotografía de la formulación definitiva.

3.7 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. en la formulación

Otro aspecto importante en el desarrollo de esta formulación es valorar si se mantiene la actividad antibacteriana del extracto que contiene, pues pudieran existir incompatibilidades entre los componentes de la formulación y los metabolitos activos de la planta, la cantidad del extracto pudiera ser insuficiente, entre otros; situaciones que podrían conducir a una formulación ineficaz.

Dentro de los métodos usados para evaluar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante diferentes agentes o extractos, se destaca el método de difusión en pozo, ya que presenta la ventaja de ser altamente reproducible y sensible (49), por esto se seleccionó para el presente estudio.

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de la formulación seleccionada (F1) con el empleo de tres concentraciones de extracto (2,8813 mg/mL, 4,3222 mg/mL y 12,9659 mg/mL), cercanas y superiores a la concentración mínima inhibitoria (2 mg/mL) determinada por Rivero en el 2014 (60). Además se incluyó como control positivo una crema de Gentamicina, una de las que es efectiva frente a *S. aureus*, de las que se comercializa en nuestro país. Se decidió incluir el vehículo de la formulación para descartar cualquier falso positivo. Por otra parte se ensayaron diferentes concentraciones del extracto de la planta, con valores cercanos y superiores al descrito como concentración mínima inhibitoria (2 mg/mL) por Rivero en el 2014 (60); para confirmar la actividad antimicrobiana del mismo pues procedía de plantas cultivadas en otra zona de la región central del país.

Al transcurrir el tiempo para la lectura de las placas, luego del primer procedimiento, se observó que aquellas en las que se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico no se formaron los halos de inhibición. Entonces se decidió proceder con una segunda metodología para el extracto, que consistió en ensayar 100 µL de cada dilución del mismo, con valores inferiores y muy superiores al descrito como concentración mínima inhibitoria (2 mg/mL) por Rivero en el 2014 (60). Al cabo de las 24 horas se realizó la lectura y se evidenció que la muestra vegetal no mostró la actividad frente al *Staphylococcus aureus* (Anexo 1). Sin embargo, el control positivo (crema de Gentamicina) inhibió el crecimiento de la bacteria en todas las cepas excepto en la 2 clínica, lo que confirma que el resultado negativo del extracto no se debió a la metodología empleada.

Este resultado difiere del obtenido por Rivero y colaboradores (2014) donde se demostró la actividad antibacteriana de dicho extracto a las 72 horas de la

incubación. Estas diferencias pueden deberse a que el presente extracto no dio positivo en el ensayo de quinonas. Se conoce que quinonas que existen naturalmente en las plantas como naftoquinonas poseen efectos antibacterianos sobre muchas especies de microorganismos aerobios y anaerobios. Por ejemplo, la alkanina, chikonina (naftoquinonas) y sus derivados, son activos frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (81). Por otra parte, también se le puede atribuir dicho efecto a las condiciones climáticas de este año, que fueron diferentes a las de la investigación anterior, específicamente, cuando se recolectó el segundo lote de droga en el área de recolección había muy bajo régimen de lluvias. Según Smid y Gorris en 1999, los componentes activos de las sustancias vegetales pueden variar en su composición, ya que éstos pueden verse afectados por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (82).

Nuestros resultados, además, pudieron estar bajo la influencia de otros factores, tanto externos como internos, entre los cuales se encuentran: el clima, el cual siempre incluye la temperatura, régimen de lluvias, luz, humedad, latitud, altitud, el suelo, entre otros; también la humedad, que depende de la altitud y del régimen de precipitaciones, puede producir pérdidas de sustancias solubles de hojas y raíces, que influyen en conjunto en la composición química de la especie vegetal. También influye el estadio de crecimiento de la planta, entre otros factores (50).

Por su parte, en las formulaciones y el vehículo se observó un pequeño halo de inhibición de igual magnitud, que pudiera atribuirse a efectos de algún componente del vehículo (preservo y/o sustancia superficialmente activa). Estos resultados indican que se deben realizar investigaciones futuras que permitan determinar los tipos de metabolitos responsables de la actividad antibacteriana.

Conclusiones



- ✓ Los componentes seleccionados para la emulsión se caracterizan por ser no comedogénicos, no irritantes y favorecen el funcionamiento de la piel, por tanto cumplen con los requerimientos de un tratamiento adecuado para el acné.
- ✓ Las variables de formulación y método de preparación: contenido de extracto hidroalcohólico, de polawax, velocidad de agitación y sus combinaciones influyeron significativamente en la calidad tecnológica y estabilidad física de las formulaciones; siendo las peores combinaciones las que emplean niveles bajos de polawax y velocidad de agitación.
- ✓ El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. obtenido de plantas recolectadas en Quemado de Güines no mostró actividad antimicrobiana *in vitro* frente al *Staphylococcus aureus* posiblemente atribuido a la no presencia de quinonas y a factores medioambientales.
- ✓ Es posible obtener formulaciones con calidad tecnológica y físicamente estables empleando 2 mL, 4 mL y posiblemente cantidades superiores de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. si emplea el polawax al 5 % y una velocidad de agitación de 1500 rpm.

Recomendaciones

- Correlacionar los resultados del tamizaje fitoquímico y la actividad antimicrobiana de extractos de las hojas de la planta procedentes de diferentes localidades de la región central y en diferentes épocas del año.
- Definir la cantidad de extracto que debe contener la formulación para que sea efectiva frente a *Staphylococcus aureus*.

Bibliografía



1. Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación in vivo de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. *Biomédica*. 2012;32:125-33.
2. Nasri H, Bahmani M, Shahinfard N. Medicinal Plants for the Treatment of Acne Vulgaris: A Review of Recent Evidences. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(11).
3. Kapoor S, Saraf S. Topical Herbal Therapies an Alternative and Complementary Choice to Combat Acne. *Research Journal of Medicinal Plant*. 2011;5(6):650-69.
4. Dušan Sajić M, Skotnicki S. Advances in Topical Acne Therapy: New Molecules, Vehicles and Delivery Mechanisms. *Skin Therapy Letter*. 2012;8.
5. Ochoa Pacheco A, Marin Moran J, Rivero Breff D, Aguilera Saborít EM. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2013;44(1):52-9.
6. Gómez Flores G, Molina Morice W. Tratamiento del acné. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXIX* 2012:91-7.
7. Matiz Melo GE, León Méndez G, Osorio Fortich MdR. Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. *Revista Cubana de Farmacia*. 2015;49.
8. Draelos ZD, Thaman LA. *Cosmetic Science and Technology*. In: Draelos ZD, Thaman LA, editors. *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. 30. United States of America Taylor & Francis Group; 2006. p. 273-92.
9. Guerra Tapia A, Laguna RdL, Moreno Giménez JC. Consenso en el tratamiento tópico del acné. *Medicina cutánea*. 2015;43:104-21.
10. Dra. Gómez Herra C. *El acné y su tratamiento*. 2003.
11. Torrenegra Alarcón ME, Matiz Melo GE, Gil González J, León Méndez G. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Revista Cubana de Farmacia*. 2015;49.
12. Pavón Pérez J, Valdés Comas L, Pérez Ramos P. Diseño y desarrollo de dos mascarillas faciales para el acné con quitina como sustancia bioactiva . *Revista Cubana de Farmacia* 2011;45.
13. Lozoya X, Cañigueral S. Sobre la Fitoterapia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2006;5:67.
14. Rasheed A, Reddy GAK, Mohanalakshmi S, Kumarb CKA. Formulation and comparative evaluation of poly herbal anti-acne face wash gels. *Pharmaceutical Biology* 2011;49.
15. Patel S, Shah D, Shah D. A Review on Herbal Drugs Acting Against Acne Vulgaris. . *Journal of pharmaceutical science and bioscientific research (JPSBR)* 2015;5:165-71.
16. Yamini K, Onesimus T. Preparation and evaluation of herbal anti-acne gel. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013;4:956-60.
17. Prashanth Kumar V, Chauhan NS, Padh H. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;107(2):182-8.

18. Félix-Silva J, Brandt Giordani R, da Silva-Jr AA. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014.
19. Mariz SR, Borges ACR, Melo-Diniz MFF, MEDEIROS IA. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. *Rev Bras PI Med*. 2010;12:346-57.
20. Aboaba SA, Adebayo MA, Ogunwande IA, Olayiwola TO. Volatile constituents of *Jatropha gossypifolia* L. grown in Nigeria. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 2015;2:8-11.
21. López Sáez JA, Pérez Soto J. Potencial etnomedicinal de dos especies tropicales del género *Jatropha* L. *Medicina Naturista*. 2011;5:8-12.
22. Singh H, Sharma SK. Evaluation of wound healing potential of *Jatropha gossypifolia* Linn. root extracts in normal and diabetic rats. *International Journal of Phytomedicine*. 2013;5(3):308-13.
23. Mariz SR, Cerqueira GS, Araújo WC. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16:372-8.
24. Rasheed S, Mridula Gutti V, Karthikeyan R. Development and Comparative Antibacterial Evaluation of Tincture of *Jatropha gossypifolia* L. Leaves. *Research in Pharmacy*. 2013;3:21-4.
25. Félix Silva J, Souza T, Menezes YAS. Aqueous Leaf Extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) Inhibits Enzymatic and Biological Actions of Bothrops jararaca Snake Venom. *Plos One*. 2014;9(8).
26. Nandagoapalan V, Marimuthu C, Doss A. Diversity of traditional medicinal plants used by rural community in Tiruchirappalli District, Tamilnadu, South India *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015;4(12):767-76.
27. Seth R, Sarin R. Analysis of the Phytochemical Content and Antimicrobial Activity of *Jatropha gossypifolia* L. . *Scholars Research Library*. 2010;2(5):285-91.
28. Bapat UC, Mhapsekar DR. Study of antimicrobial activity and phytochemical evaluation of *Jatropha gossypifolia*, *Sapium sebiferum*, *Kirganelia reticulata*, *Phyllanthus fraternus* and *Pedilanthus tithymaloides*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2014;5(11).
29. Bharathy V B, Sumathy M, Uthayakumari F. Determination of phytocomponents by GC–MS in leaves of *Jatropha gossypifolia* L. *Science Research Reporter* 2012;2(3):286-90.
30. Ogundare AO. Antimicrobial effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* leaf extracts. *Trends in Applied Sciences Research*. 2007;2(2):145-50.
31. Sharma V, Kumawat TK, Seth R, Sharma A. Bioefficacy of Crude Extracts from *Jatropha Gossypifolia* against Human Pathogens *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. 2013;4(4):401-6
32. de Almeida PM, de Sousa Araújo S, Marin Morales MA. Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia* L.). *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(1):93-100.

33. Aranberri I, Binks BP, Clint JH, P.D.; F. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2006;7:211-31.
34. Martínez Fraga J. *Los Cosméticos: Características Generales*. *Cosmetología* 2012.
35. Yambay P. Elaboración y control de calidad de una crema de base de los extractos hidroalcohólicos de Berro (*Nasturtium officinale*) y LLantén (*Plantago major*) y comprobación de su actividad cicatrizante en heridas inducidas en Ratonés. 2013:66-71.
36. Muñoz A, Fernández O, Núñez L. Influencia de los parámetros químico físicos en el diseño de formulación de cremas de Budesonida al 0.025%. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2005;36:25-30.
37. Betageri GP, S. . *Semisolid Preparations*. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition* ed 2013. p. 3257–74.
38. Fernández E. Control de Calidad. *Fórmulas Dermatológicas*. . *Farmacia Profesional* 2016;17:70-5.
39. ANVISA. *Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos*. Serie Calidad en Cosméticos. 2005;1.
40. Popescu V, Soceanu A, Dobrinás S. The quality control of some dermo-cosmetic products. 2014;25(2):85-90.
41. dos Santos H. *Emulsiones Cosméticas*. *Cosméticos & Tecnología Latinoamérica*. 2010;1.
42. Fernández Arteaga A. *Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W*. [Tesis Doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2006.
43. Tadros TF. *Emulsion Formation, Stability, and Rheology*. In: Tadros TF, editor. *Emulsion Formation and Stability*. First Edition ed. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.; 2013.
44. Estanqueiro M, Conceição J, Amaral MH. Characterization and stability studies of emulsion systems containing pumice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;50.
45. Pichot R. *Stability and Characterisation of Emulsions in the presence of Colloidal Particles and Surfactants*.: University of Birmingham; 2010.
46. (Colipa= TECTaPA. *Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products*. COLIPA GUIDELINES. 2014.
47. Ponce D'Leon LF. *Estudios de Estabilidad de Productos Cosméticos*. *Revista de Cosméticos & Tecnología en Español*. 2002;1(2).
48. Rios Macedo MA, Flores Hernandez JK. "Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; por el método de macrodilución y difusión en agar" Iquitos, Perú: Universidad Nacional de La Amazonia Peruana; 2016.
49. Ramirez LS, Marin Castaño D. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. . *Scientia et Technica*. 2009(42):263-8.
50. Miranda Martínez M, Cuéllar Cuéllar A. *Farmacognosia y productos naturales*. 2da edición ed. La Habana: Editorial Félix Varela; 2012.

51. MINSAP. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) Extractos fluidos y Tinturas. Métodos de ensayos. . La Habana,Cuba1992.
52. Álvarez ME, Isaza G, Echeverry HM. Efecto Antibacteriano in vitro de *Austroepatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna) / In vitro antibacterial effect of *Austroepatorium inulaefolium* H.B.K. (salvia amarga) and *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (clavo de laguna) *Biosalud*. 2005;4:46-55.
53. García Bernal M, Medina Marrero R, Toraño Peraza G, Gutiérrez Ferrás LM. Comparación del Efecto Postantibiótico del G-1 y la Gentamicina frente a Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Acta Farm Bonaerense*. 2000;19(3):225-30.
54. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales., (2003).
55. Osorio Durango EJ. Aspectos Básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia, Farmacéutica FdQ; 2009 Septiembre 2009. Report No.
56. Kumari R. A review on the Standardization of herbal medicines *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. 2016;7(2).
57. Mendoza Muñoz M. Evaluación farmacológica de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2016.
58. Pérez Blanco DB. Formulación de un gel cosmecéutico a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.". Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas 2016.
59. Convention USP. United States Pharmacopeia (USP 30). United States of America2007.
60. Rivero González BD. Evaluación toxicológica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
61. Oyedeji KO, Akinbiyi P, Abayomi O. Effect of Ethanol Extract of *Jatropha gossypifolia* (POHL) on Reproductive Parameters in Male Wistar Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2015;35(2):46-51.
62. Pereira Filho AA, Costa França CR, da Silva Oliveira Ds. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2014;56(6):505-10.
63. Lotfi N, Khazaei M, Shariatzadeh SMA. The Effect of Cannabis sativa Hydroalcoholic Extract on Sperm Parameters and Testis Histology in Rats. *International Journal of Morphology*. 2013;31(1):82-6.
64. Mohammad Mousavi S, Bagheri G, Saeidi S. Antibacterial Activities of the Hydroalcoholic Extract of *Portulaca oleracea* Leaves and Seeds in Sistan Region, Southeastern Iran. *International Journal of Infection*. 2015;2(2).
65. Vikas Thakur, Manjusha Choudhary, Ankur Garg, Choudhary N. Evaluation of a Hydroalcoholic Extract of the Leaves from the Endangered Medicinal Plant *gloriosa superba* linn. (colchicaceae) for its Potential Anti-diabetic Effect. *iMedPub Journals*. 2015;7(6).

66. Fernández Fernández D, Oliva Corujo L, Benitez Ramos I, Lescay Cabrera R. Evaluación Preliminar de la estabilidad de una tintura de Eucalipto citriodora Hook Infármate. 2009;5(25).
67. Orozco Guanoluisa MA. "Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de Molle (*Schinus molle*), Cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), Linaza (*Linum usitatissimum* L.) en ratones (*Mus musculus*)" Riobamba. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2013.
68. Khyade M, Vaikos N. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaf of *Jatropha gossypifolia* L. IJRAP. 2011;2(1).
69. Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of Medicinal Plants Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2013;1(6):168-80.
70. Del Rosso JQ, editor Managing acne vulgaris: Tricks of the trade. The Winter Clinical Dermatology Conference; 2006; Maui, Hawaii: Joe Morris.
71. Tanghetti EA. Emerging Insights and New Therapeutic Opportunities: Acne and Atopic Dermatitis. In: ELSEVIER, editor. Skin Disease Education Foundation's 30th Annual Hawaii Dermatology Seminar; February 13, 2006; Hawaii: International Medical News Group.; 2006.
72. Chularojanamontri L, Tuchinda P, Kulthanan K, Pongparit K. Moisturizers for Acne. What are their Constituents? Journal of Clinical Aesthetic Dermatology. 2014;7(5).
73. Fulton JE. Comedogenicity and irritancy of commonly used ingredients in skin care products. . Journal of the Society of Cosmetic Chemists 1989;40:321-33.
74. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition ed. Great Britain: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.; 2009.
75. Korting HC, Braun-Falco O. The Effect of Detergents on Skin pH and Its Consequences. Clinics in Dermatology. 1996;14:23-7.
76. Wollenberg MS, Claesen J, Escapa IF. Propionibacterium-Produced Coproporphyrin III Induces Staphylococcus aureus Aggregation and Biofilm Formation. mBio. 2014;5(4).
77. Korting HC, Lukacs A. Influence of the pH-value on the growth of Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus and Propionibacterium acnes in continuous culture. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1992;193(1):78-90.
78. Sheikh KA, Saringat B, Bukhari NI. Investigation of factors affecting physicochemical properties of palm-olein creams using optimisation technique-quality by design. Journal of Applied Pharmacy. 2011;3(3):301-19
79. Yaringaño Moreano JM. Formulación de una crema dermocosmética a base de *Mauritia flexuosa* L. f. y *Copaifera reticulata* var. *peruviana* con efecto regenerador de la piel lesionada en ratones *Mus musculus* Balb c. Lima. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
80. Especificaciones físicoquímicas, organolépticas y microbiológicas para los productos cosméticos de bajo riesgo. , Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria de Ecuador.(2017).

81. Riffel A, Medina LF, Stefani V. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002(35):811-8.
82. Smid E, Gorris L. Natural Antimicrobials for Food Preservation. In: Shafiur Rahman M, editor. *Handbook of Food Preservation*. New York: Marcel Dekker.Inc.; 1999.

Anexos

Anexo 1



Fig. 11 Efecto antimicrobiano de la **crema de Gentamicina** frente a *Staphylococcus aureus* (**ATCC**, cepa clínica 1 y cepa clínica 2).



Fig. 12 Efecto antimicrobiano del extracto 1 (2,8813 mg/mL) frente a *Staphylococcus aureus* (**ATCC**, cepa clínica 1 y cepa clínica 2).



Fig. 13 Efecto antimicrobiano del extracto 2 (4,3222 mg/mL) frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC, cepa clínica 1 y cepa clínica 2).



Fig. 14 Efecto antimicrobiano del extracto 3 (12,9659 mg/mL) frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC, cepa clínica 1 y cepa clínica 2).



Fig. 15 Efecto antimicrobiano del vehículo frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC, cepa clínica 1 y cepa clínica 2).

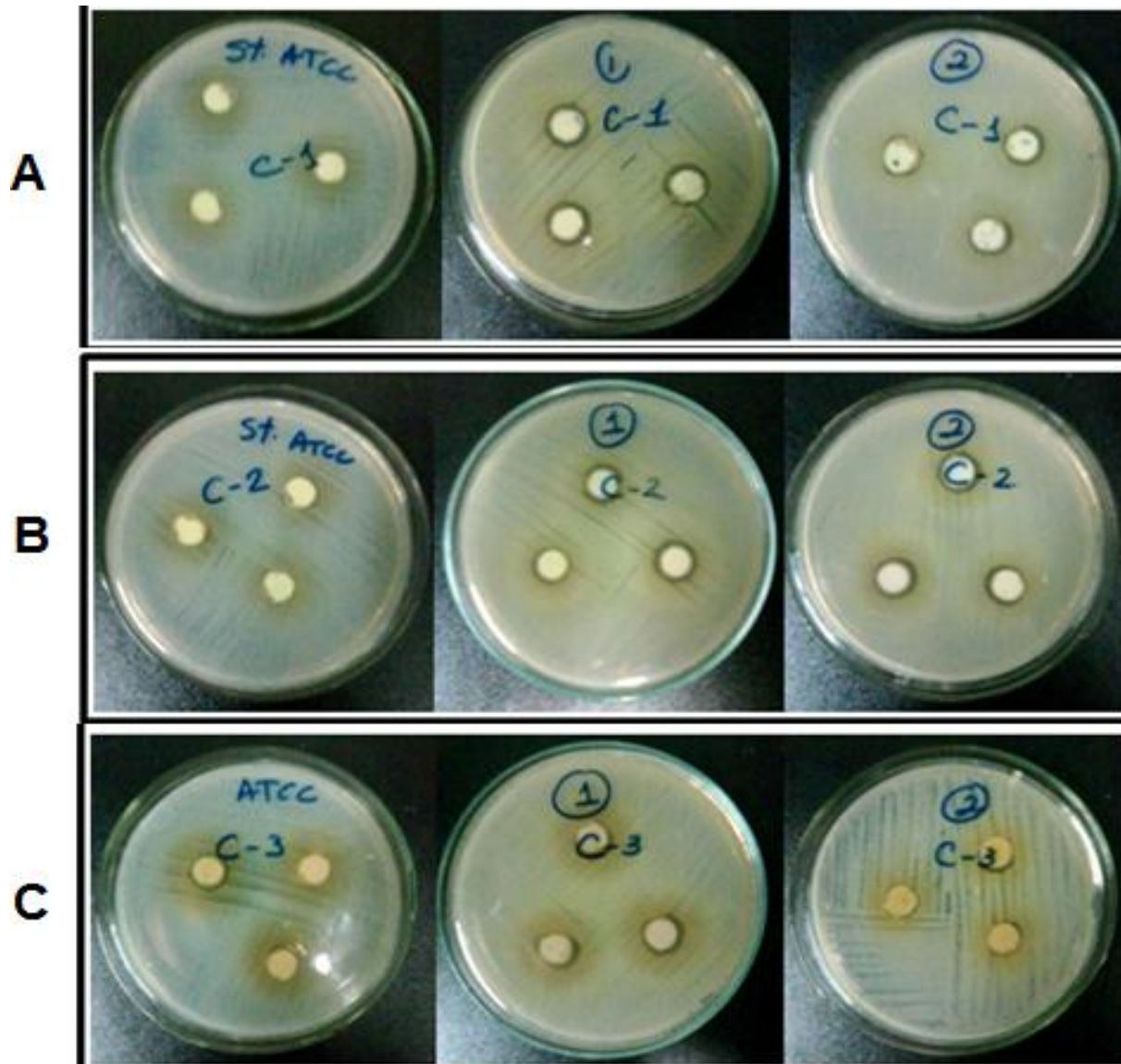


Fig. 16 Efecto antimicrobiano de F1 (**A**: formulación con 2,8813 mg/mL de extracto, **B**: formulación con 4,3222 mg/mL de extracto, **C**: formulación con 12,9659 mg/mL de extracto) frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC, cepa clínica 1 y cepa clínica 2).