



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y MEDICAMENTOS
ORGÁNICOS
CÁTEDRA MEDICAMENTOS ORGÁNICOS



**FORMULACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA DE
USO TÓPICO A BASE DE EXTRACTO ALCOHÓLICO
DE *Astronium graveolens* Jacq**

Autora:

Luzbery Suárez

Tutora:

Vanessa Hernández

Mérida, marzo de 2021



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y MEDICAMENTOS
ORGÁNICOS
CÁTEDRA MEDICAMENTOS ORGÁNICOS



**FORMULACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA DE
USO TÓPICO A BASE DE EXTRACTO ALCOHÓLICO
DE *Astronium graveolens* Jacq**

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en
Bioanálisis.

Autora:

Luzbery Suárez

Tutora:

Vanessa Hernández

Mérida, marzo de 2021

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por regalarme la vida, darme fortaleza cada día sobre todo en los momentos que sentía no poder continuar, por darme salud y una familia increíble.

A toda mi familia, especialmente a mi madre Gladys Valecillos por siempre estar allí para mí, por apoyarme incondicionalmente a pesar de todos los inconvenientes y situaciones presentadas, siempre allí constante. Eres mi guerrera.

A Omar Fandiño, mi novio, mi compañero, mi luchador, mi amor incondicional por siempre apoyarme en los buenos y malos momentos desde el inicio de mi carrera.

A mis hermanos Wendy, Jesús, Yeraldin, Ivan, Hugo, Gabriel, Miguel, David, José Gregorio y Daniel Suárez Valecillos, y a mi padre Jesús Suárez, a todos ellos por siempre brindarme el calor de un hogar, por ustedes mis pequeños tengo una razón para seguir adelante.

Al Laboratorio Bioclínico Mérida S.R.L y a su personal de profesionales Lic. Judith Karkour, Lic. Lorena la Rosa, Lic. Josefina Casà y demás personal que allí labora, gracias por permitirme laborar a su lado durante mis años de estudio en la universidad, fueron un apoyo incondicional.

Luzbery Suárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso ya que sin su ayuda nada sería posible, por darme fuerza espiritual y física para seguir adelante en los momentos más difíciles y permitirme culminar esta investigación.

A toda mi familia, gracias por colocar cada quien su granito de arena y hacer la diferencia, por sus palabras de aliento y motivación que me impulsaron a terminar con éxito mis estudios.

A mi novio Omar Fandiño, por apoyarme económicamente y motivarme a culminar mis estudios pese a la situación que se presenta en el país.

A mi tutora, profesora Vanessa Hernández Bastidas, muchas gracias por permitirme ser su tesista, brindarme su tiempo, paciencia y conocimientos en cada momento, y orientarme en cada etapa de la investigación.

A la profesora Clody Rojas, al profesor Atilio Cordero, a la ingeniera Sulay Araque, muchas gracias por su tiempo, sus conocimientos y colaboración en la parte experimental de esta investigación.

A la ilustre Universidad de Los Andes y mi casa de estudios Facultad de Farmacia y Bioanálisis por abrirme las puertas y a cada uno de sus profesores que con mucho esfuerzo, dedicación, conocimiento y amor por lo que hacen me brindaron la formación académica necesaria para formarme profesionalmente.

Al personal de la Biblioteca de Farmacia y Bioanálisis por siempre prestarme su colaboración, paciencia y su tiempo, en cuanto al préstamo de libros, revistas, tesis relacionadas con la investigación.

A mis amigos, compañeros y futuros colegas Yamileth Villarreal, Angy Maldonado, Yorman Hernandez, Moises Hernández por brindarme su confianza, conocimientos y amistad durante mi estadía en la Universidad.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	
EL PROBLEMA.....	3
I.1. Planteamiento del problema.....	3
I.2. Justificación.....	8
I.3. Objetivos de la investigación.....	9
I.3.1. Objetivo general.....	9
I.3.2. Objetivos específicos.....	9
I.4. Alcances de la investigación.....	10
I.5. Limitaciones de la investigación.....	10

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO	11
II.1. Trabajos previos.....	11
II.2. Antecedentes históricos.....	18
II.3. Bases teóricas.....	21
II.3.1. Familia Anacardiaceae.....	21
II.3.2. Descripción botánica.....	21
II.3.3. Distribución geográfica.....	23
II.3.4. Composición química y actividad farmacológica de algunas especies de la familia Anacardiaceae.....	24
II.3.5. Importancia de la actividad biológica de la familia Anacardiaceae...	26
II.4. <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	28
II.4.1. Taxonomía de la especie.....	28
II.4.2. Morfología.....	28
II.4.3. Identificación botánica de la especie.....	29
II.4.4. Distribución.....	31
II.4.5. Usos de la especie.....	31
II.5. Fitomedicamentos.....	31
II.5.1. Formas farmacéuticas.....	32
II.5.2. Forma farmacéutica de acción tópica: crema.....	34
II.6. Componentes esenciales de las cremas de acción tópica.....	35
II.6.1. Principio activo.....	35

II.6.2. Vehículo o excipiente.....	35
II.6.3. Fase acuosa.....	35
II.6.4. Fase oleosa.....	36
II.6.5. Agente surfactante o tensioactivo.....	36
II.6.6. Agente conservador.....	37
II.6.7. Agente viscosante.....	38
II.7. Método de HLB: Balance Hidrofílico-Lipofílico.....	38
II.8. Control de calidad de los productos farmacéuticos: crema.....	39
II.8.1. Prueba de estabilidad.....	40
II.8.2. Prueba de estabilidad preliminar.....	40
II.8.3. Prueba de estabilidad acelerada.....	41
II.8.4. Control de calidad de productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles.....	44
II.9. Importancia de la actividad antibacteriana.....	47
II.9.1 Las bacterias.....	48
II.9.2. Características de las bacterias usadas en la investigación.....	49
II.9.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	49
II.9.4. <i>Escherichia coli</i>	49
II.9.5. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	50
II.9.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
II.9.7. Métodos para determinar la actividad antibacteriana.....	51
II.9.8. Método de difusión en pozos.....	53

II.10. Operacionalización del evento.....	55
---	----

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO.....	57
--------------------------------	-----------

III.1. Tipo de investigación.....	57
-----------------------------------	----

III.2. Diseño de investigación.....	57
-------------------------------------	----

III.3. Población y muestra.....	58
---------------------------------	----

III.3.1. Población.....	58
-------------------------	----

III.3.2. Selección de la muestra.....	59
---------------------------------------	----

III.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	60
---	----

II.5. Metodología de la investigación.....	61
--	----

III.5.1. Recolección de la planta.....	61
--	----

III.5.2. Obtención del extracto alcohólico.....	61
---	----

III.5.3. Eliminación del color natural del extracto.....	62
--	----

III.5.4. Preparación de las cremas.....	62
---	----

III.5.6. Prueba de estabilidad térmica.....	64
---	----

III.5.6. Control de calidad microbiológico.....	65
---	----

III.5.7. Determinación de la actividad antibacteriana.....	68
--	----

III.5.8. Bacterias de ensayo.....	68
-----------------------------------	----

III.5.9. Preparación de los inóculos bacterianos.....	68
---	----

III.5.10. Preparación de las placas de Petri.....	69
---	----

III.5.11. Método de difusión en pozos.....	69
--	----

III.5.12. Lectura de los halos de inhibición.....	70
III.6. Materiales.....	71
III.7. Diseño de análisis.....	74
 CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION.....	75
IV.1. RESULTADOS.....	75
IV.2. Preparación de la forma farmacéutica de uso tópico: crema.....	75
IV.3. Determinación de las propiedades organolépticas.....	75
IV.4. Prueba de la estabilidad térmica.....	76
IV.5. Control de calidad microbiológico.....	75
IV.6. Determinación de la actividad antibacteriana.....	77
IV.7. DISCUSIÓN.....	81
 CAPITULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	82
CONCLUSIONES.....	82
RECOMENDACIONES.....	84
BIBLIOHEMEROGRAFIA.....	85
ANEXOS.....	100

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Características de las flores de la familia Anacardiaceae.....	22
Figura 2: Detalle de frutos de <i>Manguifera indica</i> y <i>Anacardium occidentale</i> , semilla de <i>Schinopsis balansae</i>	23
Figura 3: Distribución de los miembros de la familia Anacardiaceae...	23
Figura 4: Distribución de algunas especies de la familia Anacardiaceae en Venezuela.....	24
Figura 5: Fotografía de <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	29
Figura 6: Flores y partes aéreas de <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	30
Figura 7: Frutos drupáceos de <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	30
Figura 8: Esquema de surfactante.....	37
Figura 9: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Figura 10: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra <i>Escherichia coli</i>	79
Figura 11: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	80
Figura 12: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Valores generalmente adaptados para bajas temperaturas y temperaturas elevadas.....	42
Tabla 2: Límites de aceptabilidad para productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles según especificaciones de la USP.....	46
Tabla 3: Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana....	52
Tabla 4: Operacionalización del evento de estudio: Formulación de la forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base del extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	55
Tabla 5: Operacionalización del evento de estudio: Actividad antibacteriana de la forma farmacéutica tópica a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	56
Tabla 6: Componentes de la crema.....	62
Tabla 7: Bacterias Gram positivas y Gram negativas a ensaya.....	68
Tabla 8: Determinación de las propiedades organolépticas de la forma farmacéutica de uso tópico a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq de concentraciones 1%,2% y 3%.....	75
Tabla 9: Determinación de bacterias aerobias mesófilas de acuerdo a las especificaciones de la USP.....	76
Tabla 10: Determinación de agentes patógenos de acuerdo a las especificaciones de la USP.....	77
Tabla 11: Determinación de hongos y levaduras de acuerdo a las especificaciones de la USP.....	77
Tabla 12: Actividad antibacteriana de la crema de concentraciones 1%, 2% y 3%.....	78

INDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1: Preparación de las cremas en el Laboratorio de Dermocosmética, en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.....	64
Esquema 2: Análisis microbiológico de la formulación farmacéutica de uso tópico en el Laboratorio de Microbiología de Medicamentos, Escuela de Farmacia, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.....	67
Esquema 3: diseño experimental.....	73

www.bdigital.ula.ve



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN DR. JOSÉ RAFAEL LUNA

TRABAJO DE GRADO II

FORMULACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA DE USO TÓPICO A
BASE DE EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Astronium graveolens* Jacq

Trabajo de grado

Autora: Luzbery Suárez

Tutora: Vanessa Hernández

Desde el inicio de la humanidad las personas han utilizado las plantas con muchos propósitos entre ellos para tratar enfermedades, con el avance de la ciencia a través de los años se han estudiado cada una de las partes de las plantas con la finalidad de encontrar componentes que contengan alguna actividad frente a bacterias patógenas para el ser humano y así cuyos compuestos poderlos incluir como parte de una formulación farmacéutica para facilitar el uso de los mismos. El objetivo de la investigación realizada fue formular una forma farmacéutica de uso tópico a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq, determinando la actividad antibacteriana de la misma frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. Para la elaboración de la forma farmacéutica de uso tópico se usó el método de HLB: Balance Hidrofílico-Lipofílico y para evaluar la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en pozo.

La forma farmacéutica de uso tópico obtenida resulto ser una crema a diferentes concentraciones de 1%, 2% y 3% respectivamente, a la cual se le realizaron ensayos para determinar las propiedades organolépticas, estabilidad térmica y control microbiológico. En cuanto a la actividad antibacteriana se ensayaron cada una de las concentraciones de la crema frente a cepas bacterianas ATCC Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, la crema a diferentes concentraciones 1%, 2% y 3% indicaron no tener actividad antibacteriana frente a las cepas bacterianas ensayadas.

Palabras claves: *Astronium graveolens* Jacq, método de HLB: Balance Hidrofílico-Lipofílico, propiedades organolépticas, actividad antibacteriana, cepas bacterianas ATCC.

INTRODUCCIÓN

La farmacognosia ha formado parte de las ciencias y las artes médicas, desde que la humanidad comenzó a tratar las enfermedades, se desarrolló desde las civilizaciones antiguas con la utilización de órganos vegetales y animales para preparar pociones curativas que aliviaban el dolor y el sufrimiento, la búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal ha ocupado el interés de farmacognostas y fitoquímicos por muchas décadas, se han realizados exploraciones para recolectar especies, y realizar análisis químico los cuales se han enfocado en la búsqueda de sustancias de probada actividad farmacológica sobre trastornos cardiacos, digestivos, cáncer, artrosis, psicosis, infecciones, etc.(Albornoz, 1980).

La proliferación de enfermedades causadas por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud pública, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin. Es así como los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas, permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los anti-bacterianos (Butler, 2008).

De esta manera se ha buscado nuevas herramientas usando plantas para producir formas farmacéuticas de uso topico, que tengan una acción farmacológica sobre el microorganismo cuya finalidad sea inhibir su crecimiento o destruirlo.

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado sobre la actividad farmacológica que poseen ciertas plantas se formuló una forma farmacéutica

de uso tópico elaborada a base se extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq obteniendo como resultado una crema a diferentes concentraciones al 1% , 2% y 3% y se determinó su actividad antibacteriana, en cuanto a la formulación de la crema se llevó a cabo en el laboratorio de Dermocosmetica de Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por el método hidrófilo lipófilo (HLB) y lo que respecta a la actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en pozo, donde las formas farmacéuticas tópicas a diferentes concentraciones obtenidas se ensayaron contra la cepas ATTC Gram positiva como *Staphylococcus aureus* y las cepas Gram negativas *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, el cual se llevó a cabo, en el Laboratorio de Vacunas ubicado en la misma facultad.

De tal manera que, este trabajo de investigación fue estructurado en 5 capítulos. El Capítulo I, titulado: El Problema, está subtitulado de la siguiente manera: Planteamiento del problema, justificación e importancia de la investigación, objetivos y limitaciones. El Capítulo II, titulado: Marco teórico, está organizado en varios subtítulos: Trabajos previos, antecedentes históricos o epistemológicos, bases teóricas. El Capítulo III, mencionado como Marco Metodológico, está ordenado con los siguientes subtítulos: enfoque de la Investigación, tipo de investigación, diseño de la investigación, sistema de variables, población y muestra. Mientras que, el Capítulo IV fue denominado: Resultados y Discusión, y el Capítulo V, fue titulado: Conclusiones y Recomendaciones.

El objetivo del trabajo de investigación fue formular una forma farmacéutica de uso tópico elaborada a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq y determinar la actividad antibacteriana de la misma contra las cepas bacterianas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

I.1. Planteamiento del problema

Las formas farmacéuticas se definen como la disposición individualizada a que se adaptan las sustancias medicinales (principios activos) y excipientes para constituir un medicamento, estas también son llamadas formas galénicas (Bisset, 1994). La forma galénica o farmacéutica viene definida por la combinación de la forma en la que el producto farmacéutico es presentado por el fabricante y la vía por la que se administra (Spilva, 1979).

Anacardiaceae es una familia que pertenece al orden de los Sapindales, comprende cerca de 70 géneros y 700 especies (Stevens, 2008). Por otra parte, Ceruks y colaboradores (2007), afirman que esta familia posee alrededor de 600 especies entre árboles y arbustos reconocidos por su gran importancia económica y maderera dentro de esta familia se encuentra el género *Astronium* y una de sus especies existentes en Venezuela conocido por su nombre científico es *Astronium graveolens* Jacq árbol grande caducifolio conocido con nombres comunes como jarillo, ciruelillo entre otros.

Las cremas son preparaciones semisólidas homogéneas o heterogéneas suaves y untuosas que contienen agentes medicinales o cosméticos, consta de una base a la cual se le agregan componentes disueltos o al menos parcialmente solubles en el vehículo, estas preparaciones las más importantes en el área farmacéutica (Helman, 1982).

Desde los inicios del hombre en la tierra ha sido víctima de enfermedades que le han costado la supervivencia de sus antepasados, sin explicarse cómo y porqué de aquella enfermedad, fue hasta los inicios de la microscopia que permitió a algunos de los primeros investigadores como Luis Pasteur y Robert Koch descubrir esos seres diminutos que le causaban daño en muchas ocasiones irreversible a los seres humanos: las bacterias.

Según Murray y cols. (2009), explican que las bacterias, son células muy pequeñas que solo pueden visualizarse con ayuda de un microscopio que varían de forma, tamaño, conformación y que tienen la capacidad de captar el colorante de Gram que las diferencia una de otras de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, de igual forma hay ciertas bacterias que no se colorean con este colorante como son los bacilos ácidos alcohol resistente, por otra parte Barrios (1988), expresa que las bacterias son células procariotas universalmente distribuidas algunas de gran importancia médica o industrial.

Las teorías que sustentan la investigación vienen dadas desde el nacimiento de la microbiología por aportes importantes a esta ciencia como el de Luis Pasteur quien demostró definitivamente que los microorganismos no se generaban espontáneamente mediante un experimento y además formulo la teoría microbiana de la enfermedad donde decía que la enfermedad surge por el ataque de gérmenes procedentes del exterior del organismo (Barrios, 1988).

Robert Koch hizo grandes contribuciones a la microbiología, entre las cuales se encuentran el aislamiento del bacilo tuberculoso que le permitió establecer la forma definitiva de la etiología de las enfermedades infecciosas en relación con ello, enunció sus leyes o postulados que deben cumplirse para considerar un determinado microorganismo como causal de una enfermedad (Barrios, 1988). Por otra parte, en el área de las preparaciones de las diferentes formas farmacéuticas Galeno es considerado el padre de la farmacia por su dedicación a la preparación minuciosa y conservación de medicamento, además enunció la manera de distinguir las drogas entre sí, por la apariencia, el sabor, la fuente geográfica y la potencia de su acción (Albornoz, 1980).

En la actualidad la práctica de preparaciones farmacéuticas ha cambiado sensiblemente, ya que hace pocos años los récipes expedidos por los médicos requerían de continuas manipulaciones por parte del farmacéutico para elaborar jarabes, píldoras, supositorios, papeletas entre otros, ha ido decreciendo y actualmente, los medicamentos se expenden en envases originales elaborados en laboratorios farmacopólicos industriales denominándoles productos o especialidades farmacéuticas (Albornoz, 1980).

Por lo antes expuesto, no quiere decir, que la utilización de productos naturales vegetales haya pasado de moda, lo que ha ocurrido es que anteriormente el farmacéutico enfocaba su estudio e interés por la anatomía, organografía e histología vegetal, hoy lo hace hacia la fitoquímica, tratando de aislar, purificar, determinar la estructura molecular y analizar la actividad farmacológica de las sustancias contenidas en los órganos vegetales (Albornoz, 1980).

Dos tercios de la población mundial utiliza plantas medicinales autóctonas cultivadas o silvestres, lo que el pueblo llama comúnmente hiervas curativas

y los neurópatas denominan material vegetal o droga cruda (Albornoz, 1997), así mismo, Li y colaboradores (2011), reportan que actualmente existen más de 1.5 billones de personas en todo el mundo que utilizan plantas medicinales y explican que su utilización ocurre debido a que no producen efectos colaterales.

En la actualidad existen institutos de investigación de renombre nacional e internacional en los cuales se realizan estudios más sofisticados en el campo de la microbiología (Barrios, 1988), por otra parte a nivel mundial en la actualidad los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia a los antimicrobianos cada vez mayor debido a varios factores originando como resultado un inconveniente en cuanto a la terapia curativa se refiere, provocando que el tratamiento para el afectado sea en algunas ocasiones más largo, más costoso y menos efectivo (Rivas, 2016).

Así mismo Olaechea y colaboradores (2010), documentan que actualmente las infecciones son la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardiovasculares y que el mayor problema añadido a estas enfermedades es la aparición de resistencia a los antibióticos de uso común, esta resistencia es debida principalmente a la abusiva, y en ocasiones a la inadecuada utilización de los antibióticos. La presencia de microorganismos multirresistentes (MMR) tiene importantes repercusiones para los pacientes y el sistema sanitario en aspectos de costes, brotes epidémicos y morbilidad.

Por lo tanto; de lo expuesto anteriormente desde el punto de vista diferente de los autores se presenta el siguiente enunciado holopráxico o pregunta de investigación

¿Cuáles serán las características de una forma farmacéutica tópica desarrollada a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq que permita determinar su actividad antibacteriana en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas?

www.bdigital.ula.ve

I.2. Justificación

Varias fueron las razones que justificaron esta investigación, entre ellas: la frecuencia de enfermedades infecciosas asociadas a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, ya que el extracto de *Astronium graveolens* Jacq incorporado en una forma farmacéutica como principio activo podría llegar hacer una alternativa terapéutica futura y lograr minimizar el nivel de pacientes afectados por bacterias multirresistentes y así colaborar con la solución de un problema de salud pública.

Ya que estudios realizados por diferentes investigadores sobre *Astronium graveolens* Jacq han demostrado que tiene actividad antibacteriana derivada de sus componentes químicos encontrados en extractos y aceites esenciales puros proveniente de sus partes aéreas.

Otra de las razones para llevar a cabo esta investigación es debido a que la literatura no reporta ningún trabajo acerca de una forma farmacéutica elaborada a base de esta planta que tenga un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano patógeno, de igual forma pueda servir como aporte significativo a futuros investigadores que deseen continuar indagando acerca de este tema.

I.3. Objetivos de la Investigación

I.3.1. Objetivo General

Proponer la formulación de una forma farmacéutica de uso tópico a base del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq y determinar su efectividad antibacteriana en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

I.3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Formular por el método hidrófilo lipófilo (HLB) una forma farmacéutica de uso tópico a base del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq.
- ✓ Determinar las propiedades organolépticas de la formulación.
- ✓ Determinar la estabilidad térmica de la formulación.
- ✓ Realizar el control microbiológico de la formulación para bacterias aerobias mesófilas, bacterias patógenas, hongos y levaduras.
- ✓ Determinar la actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico contra cepas bacterianas ATCC Gram negativas y Gram positivas utilizando el método de difusión en pozos.

I.4. Alcance de la investigación

El alcance de una investigación se refiere a la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio, además según Hernández y colaboradores (2010) manifiesta que el alcance de la investigación, establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos.

El alcance o el logro que se obtuvo con esta investigación fue proponer y formular una forma farmacéutica de uso tópico elaborada a base del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq y a su vez, determinar su efectividad antibacteriana contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

www.bdigital.ula.ve

I.5. Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones de esta investigación estuvieron relacionadas con la falta de insumos de laboratorio al momento de llevar a cabo la formulación de la forma farmacéutica de uso tópico y la determinación de su actividad antibacteriana debido al alto costo de los materiales y la carencia de los mismos en el mercado nacional. Sin embargo, durante el proceso de investigación esto no fue impedimento para mantener la vialidad del estudio.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

II.1. Trabajos Previos

Hernández, V., en el 2015 realizó un trabajo de tesis doctoral titulado estudio fitoquímico y evaluación del potencial biológico de plantas de la reserva forestal de Caparo: *Guarea guidonia* L, *Sleumer* (Maliaceae) y *Astronium graveolens* Jacq (Anacardiaceae). El objetivo era estudiar desde el punto de vista fotoquímico las especies *Guarea guidonia*L, *Sleumer* (Maliaceae) y *Astronium graveolens* Jacq (Anacardiaceae) evaluar las actividades antibacterianas, antioxidante, larvicida, anti-inflamatoria y antiangiogenica de los aceites esenciales, extractos o compuestos aislados.

Los resultados indicaron que en el aceite esencial de *Astronium graveolens* Jacq se determinaron e indicaron 24 componentes químicos, los mono terpenos que predominaron en el aceite esencial de *Astronium graveolens* recolectado en la reserva forestal de Caparo, pero el mayor componente, trans- β -ocimeno, parece ser el más abundante y común de toda la especie del género.

Además, el aceite esencial mostro actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas ensayadas y los extractos etanólicos (EtOH) y metanólicos (MeOH) de *Astronium graveolens* Jacq resultaron activos contra bacteria Gram positivas y bacterias Gram negativas con halos de inhibición mayor de 14mm.

En la investigación los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de las hojas frescas de la especie se obtuvieron 24 compuestos volátiles que representan el 99.30 % de la mezcla total y mostro una inhibición del crecimiento bacteriano en concentraciones que oscilan entre 0.25 g/ml y 2 g/ml independientemente de las especies bacterianas o el mecanismo de resistencia. En este artículo se reporta, por primera vez, el radical libre de captación in vitro y propiedades antiangiogénicas de un extracto polar de las hojas de *Astronium graveolens* Jacq y su composición química.

Los autores concluyeron que del extracto hexanoico y butanoico de las hojas de la especie de *Astronium graveolens* Jacq, se logró aislar e identificar por medio de técnicas espectroscópicas uní y bidimensionales un total de dos compuestos conocidos para otras especies vegetales, sin embargo, este es el primer reporte de dicho compuesto para esta especie el ácido clorogénico y el 2,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucopiranososa.

En un artículo extraído del Reglamento Toxicológico y Farmacológico publicado en el 2015 en la revista Research Gate. Perteneciente a los investigadores Resende y colaboradores, titulado Mutagenicidad y actividad quimiopreventiva de las especies de *Astronium* evaluado mediante prueba de Ames, el objetivo que tuvo el estudio fue investigar las actividades mutagénicas y anti-mutagénica de los extractos hidroalcohólicos de *Astronium* spp

Se trabajó con el extracto alcohólico de las hojas y tallos de *Astronium graveolens* y *Astronium urundeuva* y de las hojas y raíz de *Astronium fraxinifolium* donde las alícuotas de cada uno de los extractos hidroalcolicos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia obteniendo compuestos químicos de tipo fenólicos de las especies *Astronium* spp y la mutagenicidad se determinó por el ensayo de Ames en cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 y TA102 y la actividad anti-mutagénica se puso a prueba con la acción directa e indirecta de mutágenos. Los resultados mostraron que ninguno de los extractos indujo ningún aumento en el número de revertientes, lo que demuestra la ausencia de actividad mutagénica.

Por otra parte, los resultados en el potencial anti-mutagénica mostraron un efecto inhibidor moderado contra NPD y un fuerte efecto protector contra B[α]P y AFB1. Este estudio pone de relieve la importancia de la detección de especies de *Astronium* de nuevos compuestos medicinales. Los prometedores resultados obtenidos abren nuevas vías para su estudio y proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos por los que estas especies actúan en la protección del daño del ADN. Sin embargo, nuevas investigaciones farmacológicas y toxicológicas de los extractos crudos de *Astronium* spp. Así como de sus metabolitos secundarios, son necesarios para determinar el mecanismo(s) de acción para garantizar su aplicación más segura y eficaz para la salud humana.

Esta es la primera evaluación del potencial mutagénico de extractos hidroalcohólicos de *Astronium* spp y su influencia en las actividades de los agentes mutagénicos conocidos realizada por el test de Ames. En muchos casos, las personas no se dan cuenta que tratamientos a base de plantas medicinales pueden causar graves riesgos para su salud (Lira y col., 2008). Por lo tanto, dado el consumo generalizado de *Astronium* spp por la

población, es esencial para llevar a cabo ensayos para evaluar su mutagenicidad y otros riesgos para la salud.

Bonifacio y cols., (2015) publicaron un artículo en la revista internacional de nanomedicina que lleva por título sistema lipídico nanoestructurado como estrategia para mejorar la actividad anti-*Cándida albicans* de *Astronium* spp incluyendo las especies como *Astronium flaxinifolium*, *Astronium urundeuva* y *Astronium graveolens* que son poseedoras de actividades anti-inflamatorias, anti-ulcerosas y antimicrobiana, su objetivo consistió en evaluar el sistema de lípidos nanoestructurados que se desarrolló como una estrategia capaz de potenciar la acción de los extractos de plantas, reduciendo la dosis requerida y los efectos secundarios mejorando la actividad antibacteriana.

Obteniendo como resultado que los extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas de *Astronium flaxinifolium*, *Astronium graveolens* y los tallos de *Astronium urundeuva* no mostraron actividad antifúngica, pero el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Astronium urundeuva* mostró actividad contra *Cándida albicans* con un MIC de 125 ug/ml.

Después de la incorporación en el sistema nanoestructurado, los resultados mostraron que *Cándida albicans* proviene de extractos de tallos y hojas de todas las especies de *Astronium* spp se mejoró su actividad: los tallos de las tres especies mostraron MICS de 62,5 ug/ml; las hojas de *Astronium flaxinifolium* y *Astronium graveolens*, respectivamente, mostraron MICS de 250 ug/ml y 125 ug/ml; y las hojas de *Astronium urundeuva* demostraron una actividad aún mayor, presentando un MIC de 15,62 ug/ml.

Los autores llegaron a la conclusión de que el extracto hidroetánico de las hojas de *Astronium urundeuva* tienen actividad antifúngica in vitro e in

vivo, y que la incorporación de esta extensión al sistema nanoestructurado desarrollado potencia esta actividad, además, mencionaron que en un trabajo futuro investigaran la influencia del tipo de lípido utilizado en la actividad antifúngica del sistema lipídico nanoestructurado del extracto hidroetánico de las hojas de *Astronium urundeuva*.

En una investigación publicada en la revista llamada Investigación de Productos y Plantas Medicinales en Diciembre del 2016 por el autor Silva y sus colaboradores, titulada potencial antitumoral y antioxidante del extracto de *Astronium graveolens* Jacq cuyo objetivo era la evaluación de la citotoxicidad del extracto *Astronium graveolens* a través del bioensayo *Artemia salina* y el potencial antioxidante.

La actividad antioxidante se determinó por el método DDPH (Blois, 1958), en la prueba antitumoral arrojando como resultado un porcentaje de inhibición de tumores de los grupos tratados a la concentración de 1%; 0,1% y 0,001% de los extractos no difirió del grupo control, sin embargo, la concentración de 0,01% mostró una disminución significativa en la inhibición de tumores en comparación con el control.

En cuanto a la concentración del ensayo de toxicidad de 0,1; 0,25; 0,5 mg/ml tenía una actividad más alta en las larvas de *Artemia salina* de acuerdo con CL₅₀ presentado en esta investigación; contando el número de muertes después de 24 y 48 horas de la exposición al extracto de la planta que se llevó a cabo, esa cifra se usa para calcular el CL₅₀ mediante el análisis probit, con una confianza del 95%.

La actividad antioxidante fue del 85% para el extracto con una concentración 3 mg/ml⁻¹. Los autores dependiendo de los resultados obtenidos llegaron a la conclusión de que el extracto de *Astronium*

graveolens Jacq tiene actividad antitumoral y antioxidante a través de la prueba evaluada en el estudio. La prueba de *Artemia salina* presento una concentración de 0,1; 0,25; y 0,5 mg/ml con una mayor actividad citotóxica.

Esta investigación fue realizada debido a que recientes estudios muestran diferentes actividades farmacológicas, como el potencial antitumoral del extracto *Astronium graveolens* usando el bioensayo de inhibición de discos inducidos por el tumor de patatas por *Agrobacterium tumefacies* (Silva y col, 2012; Silva y col., 2010).

Hernández y colaboradores, en una investigación realizada y publicada en la Revista de la Facultad de Farmacia en el 2017 titulada Actividad anti-inflamatoria del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq, cuya finalidad fue examinar la actividad antiinflamatoria del extracto de las hojas secas de *Astronium graveolens* Jacq. Utilizando como método la prueba de edema inducido por carragenina intraplantar en ratas albinas.

La actividad anti-inflamatoria del extracto se evaluó mediante el test de edema inducido por carragenina es el más frecuentemente usado como modelo experimental de inflamación aguda para determinar el potencial antiinflamatorio de productos naturales (Monteiro y cols., 2007; Winter y cols., 1962; Rtheesh y Helen, 2007).

Obteniendo como resultado al aplicar el test del edema inducido por carragenina en la parte plantar de las ratas albinas que el extracto etanólico redujo el incremento del volumen plantar 4 horas post-carragenina de una manera significativa ($P < 0,02$). La CI_{50} del extracto fue 5 mg/Kg y el porcentaje de inhibición fue de 57% a la dosis de 100 mg/kg de peso. Por lo que se determina que el extracto etanólico mostró efecto antiinflamatorio en una forma dependiente de la dosis cuando se comparó con el control

Ketoprofeno (10 mg/kg). En conclusión, los investigadores sugieren que *Astronium graveolens* Jacq representa un potencial tratamiento en condiciones asociadas con la inflamación.

www.bdigital.ula.ve

II.2. Antecedentes históricos

El hombre desde el comienzo de su existencia, se ha visto en la necesidad de procurarse alimentos y medicamentos lo que comenzó probablemente, probando una y otra vez o también observando el hábito de los animales salvajes cuando discriminaban las plantas, escogiendo las adecuadas para su nutrición y evitando las venenosas (Roca, 2008). Cuando una especie se comprobaba que tenía acción beneficiosa en un individuo, se le daba a otro y si se le notaba el mismo efecto sobre este, entonces se aceptaba y generalizaba su consumo. El conocimiento de la interrelación hombre, animales y plantas surgió en estos pueblos primitivos (Albornoz, 1980).

La utilización de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades data desde los primeros días de la humanidad. Estudios arqueológicos realizados registran especies de plantas en sepulturas del hombre de Neanderthal (60.000 a.C.), hoy en día aun en muchos sitios se utilizan las plantas medicinales (Nagy, 2012). Algunas de las culturas más desarrolladas de la antigüedad como la cultura china y egipcia son famosas por la utilización de mezclas de hierbas para el tratamiento de enfermedades registradas en el papiro de Ebers (1.550 a.C.), en un registro más antiguo y representativo de este conocimiento, hay un contenido que contiene 800 recetas y más de 700 drogas de origen natural (Nagy, 2012).

Por otra parte Roca (2008), expresa que la medicina egipcia data de alrededor de 2.900 Años A.C., es tan antigua como la medicina tradicional china pero anterior a la India, reconocida entre otros por el famoso Ayurveda del 700 A.C., el estudio de las practicas medicas de los faraones se ha basado en lo encontrado en unos documentos denominados papiros, así

como en la representación artística de la enfermedad en el Valle del Nilo y además en el estudio detenido de restos humanos como el de las momias.

La principal literatura está representada por los llamados libros herméticos del Dios Thoth parte de los cuales se han perdido, los papiros médicos son fragmentos de estos libros y son varios los disponibles en la actualidad en diferentes museos y bibliotecas en que se encuentran uno de los más representativos en cuanto a los medios medicamentosos que se utilizaban en el llamado papiro de Ebers documento de 110 páginas que incluye 877 recetas y menciona unas 700 drogas (Roca, 2008).

Así mismo Albornos (1980), expresa que la utilización de las plantas como remedios para sanar enfermedades viene dada desde hace mucho tiempo atrás desde la época prehistórica pasando por la edad media, la edad moderna, la edad contemporánea que incluye el siglo IX y XX, pero una de las épocas más relevantes fue la época prehistórica ya que allí nació en Grecia, Galeno en Pergamo en el año 130 D.C.

Galeno en Pergamo quien fue un gran preparador de remedios para tratar enfermedades descubriendo minuciosamente la elaboración y conservación de los mismos, este da las bases técnicas para la preparación de las diferentes formas farmacéuticas, fue el creador de la fórmula para la crema fría y los ungüentos, por lo tanto, fue un médico farmacéutico y se puede considerar el padre de la farmacia por su dedicación en la preparación de medicamentos (Albornos, 1980).

De igual manera, otros personajes como Teofrasto (considerado el padre de la botánica) por escribir dos tratados de botánica (la Historia de las plantas y sobre los orígenes de las plantas y sus caracteres) y Dioscórides (considerado el padre de la farmacognosia) (Albornos, 1980). En Venezuela,

Vicente Marcano, fue famoso investigador de las ciencias naturales y de la química orgánica, puede decirse que fue el pionero de la investigación fitoquímica en el campo de la farmacia y de la agronomía venezolana, este personaje fue educado en París donde recibió altas distinciones, en 1984 fundó la primera escuela de estudios farmacéuticos, con carácter universitario que planificó a semejanza de los institutos franceses por él visitados (Albornoz, 1980).

www.bdigital.ula.ve

II.3. Bases Teóricas

II.3.1. Familia Anacardiaceae

II.3.2. Descripción Botánica

La familia Anacardiaceae es una familia botánica representada por 70 géneros y cerca de 600 especies entre árboles y arbustos, conocidas algunas por ser de gran importancia alimenticia en cuanto a sus frutos comestibles y otras por su importante madera (Ceruks y col., 2007), de tal manera que la familia Anacardiaceae pertenece al reino Plantae del subreino Tracheobionta que a la vez alberga a las *Spermatopyta* y *Magnoliophyta*, de clase *Magnoliopsida*, subclase *Rosidae* de orden *Sapindales* (Watson y Dallwitz, 1992).

Familia ubicada en el orden Sapindales junto con Biebersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae, Rutaceae, Sapindaceae y Simaroubaceae (Stevens, 2001). Anacardiaceae está estrechamente relacionada a Burseraceae, ambas familias comparten la presencia de hojas compuestas y folíolos opuestos, son generalmente dioicas, tienen flores pequeñas, cáliz frecuentemente connato, corola ligeramente mayor que el cáliz, disco extra estaminal, frutos en drupas, y producen biflavonoides (Lawrence, 1977)

Los miembros de esta familia se conocen por producir reacciones alérgicas al contacto, debido a la presencia de compuestos fenólicos en la resina (Juddy col., 2002); esta característica es el origen de algunos nombres comunes; otros miembros de la familia son de importancia económica debido

a sus frutos comestibles y, por tanto, prácticamente se cultivan en todo el mundo. Tal es el caso del mango (*Mangifera indica*), el pistache (*Pistacia vera*) y el anacardo o nuez marañón (*Anacardium occidentale*).

Una característica considerada típica de la familia es la presencia de canales resiníferos en la corteza, cuya resina es clara, pero al contacto con el aire se ennegrece (Ding Hou, 1978; Judd y col., 2002).

Las flores son usualmente muy pequeñas (fig.1), actinomorfas pentámeras y unisexuales, por lo común se encuentran en inflorescencias determinadas, complejas o cimosas; tanto los sépalos como los pétalos tienden a estar separados aunque pueden encontrarse ligeramente connados, los estambres suelen ser de 5 a 10 y generalmente están libres, el ovario es súpero y se compone de 3 carpelos connados (en ocasiones 5), típicamente, sólo un carpelo es fértil e incluye un solo óvulo apótropro con placentación apical (Cronquist, 1981; Judd y col., 2002).

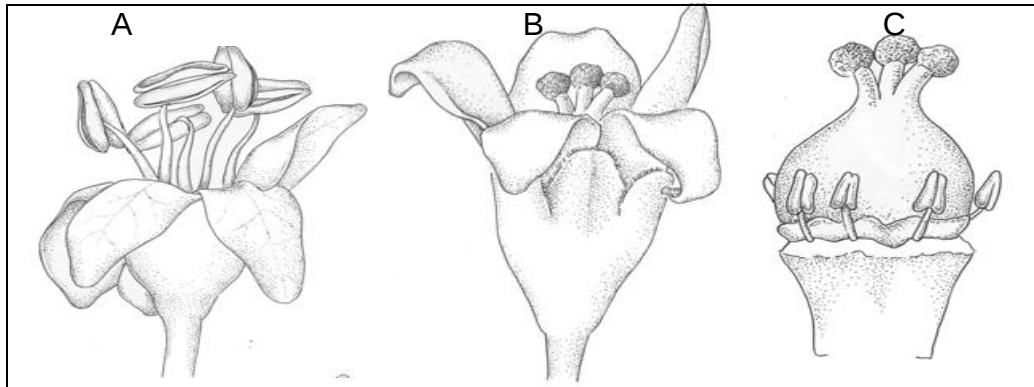


Figura 1: Características de las flores de la familia Anacardiaceae: a. Flor estaminada con estambres, b. Flor pistilada, c. Detalle de la flor pistilada sin perianto, ovario globoso, estigma, estaminodios y disco.

Fuente: tomada y modificada de Guía de Consultas Botánica II. ROSIDAE-Sapindales-Anacardiaceae.

Los frutos se caracterizan por ser drupas o sámaras, generalmente con una semilla (fig.2), las semillas contienen un embrión curvo, endosperma escaso o ausente (Lawrence, 1977).



Figura 2: detalle de frutos de *Manguifera indica* y *Anacardium occidentale*, semilla de *Schinopsis balansae*.

Fuente: tomada y modificada de Judd y col., (1999), Loreenzi (1998).

II.3.3. Distribución geográfica

La distribución de la familia Anacardiaceae a nivel mundial se encuentra con mayor auge en los trópicos de América, Asia, África e Indomalasia. De las 9 familias que conforman el orden Sapindales (Stevens, 2001). Por otra parte, el mismo autor Stevens (2001) indica que la familia Anacardiaceae se encuentra en mayor parte en el territorio brasileño en América del sur y en gran parte del mundo (fig. 3), teniendo así una distribución predominante en las regiones tropicales y subtropicales.



Figura 3: Distribución de los miembros de la familia Anacardiaceae.

Fuente: extraído de Guía de Consultas Botánica II. ROSIDAE-Sapindales-Anacardiaceae, (Stevens, 2001).

En Venezuela desde el punto de vista forestal, Sapindales es un orden de interés en el país ya que incluye especies de alto valor comercial pertenecientes a la familia Anacardiaceae como *Anacardium excelsum*, *Astronium graveolens*, entre otras. Igualmente, desde el punto de vista frutal, hay especies de importancia como *Mangifera indica*, *Spondias mombin* (Muñoz, 1999). En Venezuela existen reportes de diferentes especies de la familia Anacardiaceae: Veillon (1994) menciona siete géneros y 14 especies nativas. Según Huber y col., (1998), en el país existen 12 géneros (fig.4): (*Anacardium*, *Astronium*, *Camposperma*, *Cyrtocarpa*, *Loxopterigium*, *Mangifera*, *Mauria*, *Ochoterena*, *Spondias*, *Tapirira*, *Thyrsodium* y *Toxicodendron*) y 24 especies.



Figura 4: Distribución de algunas especies de la familia anacardiaceae en Venezuela.

Fuente: imagen tomada y modificada de www.venezuelatuya.com.

II.3.4. Composición química y actividad farmacológica de algunas especies de la Familia Anacardiaceae

Estudios sobre la composición química de la familia Anacardiaceae han revelado que contienen flavonoides, incluyendo biflavonoides, terpenos,

xantonas, chalconas, y principalmente, lípidos fenólicos y sus derivados (Correia y col., 2006).

Mangifera indica conocido como mango es uno de los frutos tropicales más finos y apreciados por los consumidores, es originario de India y se cree que comenzó a cultivarse 2.000 años antes de Cristo, tiene como componente químico principal que se encuentra en el extracto de corteza es una xantona glicosilada llamada mangiferina (2-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-9-xantona). También presenta polifenoles, flavonoles, terpenoides, fitoesteroles, azúcares libres, polialcoholes y ácidos grasos, de los cuales más del 60% son poliinsaturados. Además, posee elementos importantes como calcio, selenio, cobre y zinc (Vilchez, 2010).

Astronium urundeuva (Allemão) Engl. (Anacardiaceae), árbol de 5m de alto, desde el punto de vista químico fueron detectados y aislados polifenoles y chalconas de la madera (Napoleon y col., 2011; Morais y col., 1999), y además fueron aisladas chalconas urundeuvinas I, II y III (Botelho y col., 2008; Viana y col., 2003).

Astronium fraxinifolium se trata de una especie arbórea extremadamente densa, compacta y rígida, resistente a la descomposición de su madera por un largo periodo de tiempo esta resistencia se explica por el alto contenido de taninos que poseen (Feitosa y col., 2011), sus hojas y madera está compuesta por una diversidad de metabolitos secundarios desde derivados de ácido cafeoilquínico, flavonoides y derivados de ácido gálico (Serikava, 2009).

II.3.5. Importancia de la actividad biológica de la familia Anacardiaceae

Desde el punto de vista fotoquímica y farmacológico, cerca de 7% de las especies investigadas de los géneros de esta familia, las más estudiadas son: *Mangifera*, *Rhus*, *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* y *Melanorrhoea*.

Dentro de estas destacan: *Schinus terebinthifolius*, que presenta actividad antifúngica (Johann y col., 2010) ya que contiene gran cantidad de α -pineno que le confiere actividad antimetastásica frente a mielomas (Matsou y col., 2011), *Schinus molle*, presentando en sus aceites esenciales actividad insecticida y repelente (Abdel-Sattar y col., 2009) *Mangifera indica*, importante en cuanto a su actividad antiinflamatoria (Knödler y col., 2008); los que tienen participación en el proceso de la cascada inflamatoria e inmunoreguladora

Anacardium occidentale, se ha investigado y encontrado que tiene actividad antiulcerogénica (Konan y Bacchi, 2007) y antibacteriana (Green y col., 2008), *Lannea barteri*, presenta actividad antioxidante, antimicrobiana e inhibitoria de la acetilcolinesterasa (Koné y col., 2011), y especies de *Rhus*, presentando actividades antialérgica, anti-mutagénica, antioxidante, hipoglicemiante entre otras (Rayne y Mazza, 2007).

Sin embargo, de acuerdo a la literatura, la especie *Astronium urundeuva* ha sido la más estudiada del género *Astronium* a la cual se le ha detectado que tiene actividad anti-ulcerogénica (Carlini y col., 2010; Souza y col., 2007; Rao y col., 1987), antiinflamatoria (Souza y col., 2007; Viana y col., 1997) antibacteriana, antifúngica (Sá y col., 2009), neuroprotectora (Nobre-Junior y col., 2007). Las lectinas aisladas de la madera presentan actividad

insecticida (Sá y col., 2008; Napoleão y col., 2011) y larvicida contra *Aedes aegypti* (Sá y col., 2009).

El extracto acuoso de *Astronium urundeuva* presenta cierta citotoxicidad en las células cancerígenas (Mahmoud y col., 2011). La corteza de *Astronium urundeuva* se utiliza principalmente, para las fracturas, traumatismos, cortaduras heridas, procesos inflamatorios, acelera la cicatrización, para tratar úlceras en el estómago en los procesos hemorrágicos en las mujeres con menstruaciones abundantes (Bourdy y col., 2000). También se reporta la actividad antioxidante, (Muñoz y col., 2004; Deharo y col., 2004).

Por otra parte Macedo y Ferreira (2004) en un estudio realizado afirman que las hojas de esta especie son popularmente utilizadas para las diarreas, hemorroides y en baños como antisépticos para tratar las úlceras de la piel, además, Pinto y col., (2010) estudiaron la actividad vitro e in vivo de extractos de metanol tallo, follaje y flores de varias especies, entre ellas *Astronium fraxinifolium* contra hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, el principal agente causal de la antracnosis. Entre los 300 extractos de plantas probados en el ensayo sólo 13 mostraron actividad antifúngica, y entre ellos el *Astronium fraxinifolium* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,45 mg / ml.

Pocos estudios se han realizado acerca de la actividad biológica de *Astronium graveolens*, sin embargo, Hernández y cols., (2013) mediante una investigación realizada a esta especie de *Astronium* sugieren que el aceite esencial de las hojas de *Astronium graveolens* tiene actividad inhibitoria frente a patógenos nosocomiales resistentes.

II.4. *Astronium graveolens* Jacq

II.4.1. Taxonomía de la especie

En cuanto a la taxonomía de la especie se conoce con el nombre científico de *Astronium graveolens* Jacq, perteneciente a la familia Anacardiaceae que incluye más de 82 géneros y 700 especies, distribuidas principalmente en los trópicos (Pell, 2004). De los géneros 32 Anacardiácea se conocen 82 especies que causan dermatitis por contacto debido a la presencia de compuestos fenólicos que son probablemente una defensa contra plagas o insectos y vertebrados (Aguilar y Sosa, 2004).

El género *Astronium* (sinónimo *Myracrodruo*), comprende 23 especies de árboles nativos Brasil, Surinam Colombia y selvas de Venezuela (Viana y cols., 2003) y conocido con el nombre común de ciruelillo (Benítez y Montesino, 1988). Nombres comunes en Honduras y Costa rica es conocido como Ron-Ron, jocote y jabillo, en Nicaragua es conocido como jocotes de fraile, zorro, palohobero y en América del sur es conocido como ciruelo, ciruelillo, melón y jarillo (De trinidad, 1993).

II.4.2. Morfología

Morfológicamente es un árbol grande, con alturas hasta de 30 m diámetros hasta de 1 m; en el bosque húmedo presenta gambas en los primeros dos metros de altura, luego su fuste es limpio y cilíndrico; corteza en placas dejando manchas llamativas. Su compa es envolado redondeada, generalmente abierta, con ramas irregulares y ascendentes (fig. 5), (Benítez y Montesino, 1988). La corteza es de color pardo-gris, generalmente con manchas blancuzcas, áspera, lenticela longitudinalmente en los estados

jóvenes, tornándose escamosa en los árboles adultos, desprendiéndose en piezas delgadas e irregulares (Thirakul y Maldonado, 1998), exuda una sustancia resinosa que es trasparente y pegajosa de olor agridulce agradable (Benítez y Motesino, 1988).



Figura 5: Fotografía de *Astronium graveolens* Jacq

Fuente: Escuela Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2016; Smithsonian Tropical Research Institute, 2013.

II.4.3. Identificación botánica de la especie

Las hojas son alternas imparipinnadas, agrupadas al final de la ramilla, con peciolo y raquis de 15 cm a 22 cm de largo de 4 a 5 pares de hojas subopuestas, más una terminal, el haz verde, el envés verde amarillento o pálidos, glabras ambas superficies: de e 8 a 10 pares de nervios secundarios paralelos (Thirakul y Maldonado, 1998). Las flores son bisexuales pequeñas agrupadas en panículas terminales o axilares que miden cerca de 10 cm a 25 cm de largo, con cinco pétalos de color blancuzco-amarillento (fig. 6), (Benítez y Montesino, 1988).



Figura 6: Flores y partes aereas de *Astronium graveolens* Jacq.

Fuente : tomada y modificada Escuela Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2016; Smithsonian Tropical Research Institute, 2013.

Los frutos son drupas oblongas pequeñas cerca de 1 cm a 1.5 cm de largo (fig. 7), de color azul-negro cuando maduran, con un hueso duro encerrado en la pulpa agrisada y se caracterizan por acumular un líquido resinoso, las semillas son de color café claro, de 1.0 cm de largo, se encuentra una en cada fruto (Gutiérrez, 2000).

En cuanto a la fenología las flores son observadas de Abril–Mayo, mientras que los frutos en este árbol caducifolio se observan de Mayo a junio aproximadamente (Thirakul y Maldonado, 1998).



Figura 7: Frutos drupáceos de *Astronium graveolens* Jacq

Fuente: tomada y modificada de PROECEN. snt. Ciruelillo (*Astronium graveolens* Jacq.). Colección de Maderas Tropicales de Honduras, 1999.

II.4.4. Distribución

Su distribución natural es desde México hasta Brasil, Bolivia y Paraguay. Ha sido plantada en pequeña escala en Costa Rica, Honduras y Brasil (Jiménez, 1999). En Costa Rica es una de las especies que posee mayor protección, pues se encuentra representada en varias Áreas de Conservación. Su madera tiene alto potencial tanto estético como tecnológico, sin embargo, por sus características sobresalientes ha sido sobre explotado en algunas regiones de México (Echenique, 1970), en Venezuela se encuentra distribuida principalmente en los estados Anzoátegui, Bolívar, Cojedes, Amacuro, Falcón, Guárico, Lara, Miranda, Yaracuy y Zulia (FIBV-MARNR, 1998).

II.4.5. Usos de la especie

Este árbol se usa más que todo en ebanistería (muebles finos, gabinetes de lujo, pisos, duelas, parquet prefabricado, entarimados), machimbrados, escaleras, chapas decorativas, acabados internos, objetos torneados, marquetería, cuchillería (Benítez y Montesino, 1988). En estudios realizados por investigadores se tiene que de sus hojas frescas se ha informado de la presencia de trans-ocimeno como principales compuestos volátiles que muestran actividad repelente contra *Acromyrnex lundi* (Chen y Wiemer, 1984).

II.5. Fitomedicamentos

Según la Organización Mundial de la Salud, un fitomedicamento es un nuevo tipo de medicamento cuyo principio activo es un extracto vegetal que contiene varios grupos de compuestos con propiedades farmacológicas

distintas pero complementarias para producir su efecto curativo o preventivo (Hernández, 2016).

Los fitomedicamentos siempre provienen de plantas medicinales de amplio uso en las medicinas populares de diversos países, provienen de una tradición que ha mostrado la eficacia de esas plantas aplicadas en forma de emplastos o tisanas, pero que no habían sido sometidas a estudios científicos que determinaran los componentes químicos a los que deben sus propiedades y por ende su eficacia terapéutica (Hernández, 2016).

Los productos elaborados a base de los principios activos de las plantas tienen menos efectos secundarios, es decir causan menos reacciones adversas que los productos farmacéuticos, en donde el uso de plantas puede generar ahorro y mayor efectividad y eficacia frente a una enfermedad o patología (Hernández, 2016).

www.bdigital.ula.ve

II.5.1. Formas farmacéuticas

Por lo antes expuesto se tiene que las formas farmacéuticas también llamadas formulas galénicas se definen como la disposición individualizada a que se adaptan las sustancias medicinales (principios activos) y excipientes para constituir un medicamento (Bisset, 1994). En consecuencia, los medicamentos se presentan en diferentes preparaciones que reciben el nombre de formas farmacéuticas o formas medicamentosas (Hernández, 2016).

Por otro lado, Balsam y Sagarin (1972), indican que las formas farmacéuticas son el producto resultante del proceso tecnológico que confiere a los medicamentos características adecuadas como la dosificación,

la eficacia terapéutica y la estabilidad en el tiempo, es decir, la forma de preparar un medicamento con el fin de su administración.

Helman (1982), clasifica las formas farmacéuticas según su estado físico: en sólidas que comprenden polvos, granulados, cápsulas, comprimidos, sellos, tabletas, supositorios, óvulos, implantes, en semisólida que comprenden pomadas, pastas, cremas, geles, y en líquidas que lo constituyen las soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires, lociones. Con respecto a la selección de la forma farmacéutica de un producto fitoterapéutico, Lock (1999), menciona los aspectos principales que deben tenerse en cuenta son: la forma debe ser aceptable para el paciente, química y físicamente estable y el producto debe ser correctamente envasado, exento de contaminación microbiana, capaz de proporcionar una dosis correcta de la droga, terapéuticamente eficaz.

Las formulaciones de uso externo son todas aquellas formas farmacéuticas cosméticas medicamentosas destinadas a ser aplicadas sobre la piel y mucosas con acción sistémica. Los preparados farmacológicos que se aplican directamente sobre la piel están formados por: fármaco o principio activo, vehículo o base y productos secundarios como conservantes, aromatizantes y colorantes (Hibbott, 1969).

Las formas posológicas tópicas constan por lo común de uno o varios fármacos activos, contenidos en un excipiente líquido o pastoso mejor conocido con el nombre de base, es en general, complejo. A parte de las sustancias destinadas a dar volumen a la forma, deben ubicarse otras de diversa función y categorías como: solubilizantes, conservadores, dispersantes, estabilizadores, humectantes entre otros (Munro y Stoughton, 1965).

II.5.2. Forma farmacéutica de acción tópica: crema

Las cremas son preparaciones semisólidas que contienen principios activos y aditivos necesarios para tener una emulsión generalmente aceite en agua con un contenido de agua superior al 20% (Liberman, 1899), así mismo la Real Farmacopea Española define las cremas como preparaciones multifasicas constituida por una fase lipófila y una fase acuosa. En la aplicación por masaje exhiben escasa resistencia y fluyen con facilidad y de modo uniforme. Su contenido acuoso y su blandura las distinguen de las otras formas tópicas semejantes. Una diferencia entre la crema y la pomada es que la pomada fluye con dificultad y las cremas fluyen fácilmente, además las pomadas son siempre monofásicas (Helman, 1982).

Desde otro punto de vista Cid y Moran (1974), mencionan que las cremas son formas farmacéuticas constituidas por dos fases, que se clasifican en hidrófobas (Emulsiones agua/aceite), donde la fase continua o externa es la fase lipofílica y las hidrófilas (Emulsiones O/W) donde la fase externa es de naturaleza acuosa, tales como jabones sódicos o de alcoholes grasos sulfatados y polisorbatos, a veces combinados en proporción es convenientes con tenso activos tipo agua / aceite.

Las cremas se preparan por tres métodos generales: mezclado mecánico de los ingredientes n, fusión y formación de emulsiones. El primer método se usa cuando el excipiente está constituido por agentes grasos blandos y aceites, el segundo cuando se emplean ceras e ingredientes de mayor punto de fusión y el tercer método, como su nombre lo indica O/W (fase oleosa / acuosas) o W/O (fase acuosa/ fase oleosa) pudiendo ver o no reacción química (Cid y Moran, 1974).

II.6. Componentes esenciales de las cremas de acción tópica

Un producto farmacéutico, está formado por lo que se denominan principios activos, su actividad define su función y el vehículo o excipiente.

II.6.1. Principio activo

Se entiende por principio activo o sustancia medicinal, a la materia de cualquier origen, capaz de producir cambios en los procesos fisiológicos o bioquímicos de los seres vivos; se trata, por tanto, de las sustancias químicas o biológicas, a las que se les atribuye una actividad apropiada, para constituir un medicamento (<http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-ley-medic.htm>). La elección de uno u otro es importante, al igual que la cantidad que se incluya. Pueden ser de origen: humano, animal, vegetal, mineral, microbiológico, químico o afines.

II.6.2. Vehículo o excipiente

El vehículo dermocosmético, está formado por una serie de sustancias diversas, que favorecen su aplicación y penetración. Así mismo le aportan las cualidades cosméticas de tacto, color, olor y textura. Algunos componentes que forman parte de los excipientes, también poseen otras acciones como hidratantes, emolientes, entre otras. El vehículo debe elegirse cuidadosamente de acuerdo con su inocuidad, compatibilidad, estabilidad y tolerancia (Olmo, 1995).

II.6.3. Fase acuosa

En la fase acuosa generalmente se emplea agua que debe ser desionizada y microbiológicamente pura. En esta fase suelen adicionarse

todos los principios activos, que por su hidrofiliidad puedan ser solubles en ella, así como también, se disuelven agentes humectantes, se incorporan agentes viscosantes y agentes conservadores, que evitan la contaminación con hongos, levaduras o bacterias (Olmo, 1995; Rieger, 2000; Bernard, 1988).

II.6.4. Fase oleosa

La fase oleosa su principal función en la mayoría de los preparados, es la de proveer emoliencia, renovando la flexibilidad y suavidad de la piel. La naturaleza de la capa residual de la fase oleosa, que queda adherida a la piel, modula el grado de oclusividad del producto. La formulación contiene aceites ligeramente oclusivos que retrasan la pérdida del agua de la piel. (Olmo, 1995; Rieger, 2000).

II.6.5. Agente surfactante o tensioactivo

Los agentes surfactantes o tensioactivos son sustancias anfífilas, cuya molécula posee esencialmente dos partes: un grupo hidrofílico (H), iónico o no iónico formado generalmente por heteroátomos de N, S, O, como por ejemplo los sulfonatos, sulfatos, polióxidos de etileno, entre otros), y un grupo lipofílico (L), que consiste en general, en una cadena hidrocarbonada con o sin grupo aromático. Las sustancias anfífilas pueden representarse esquemáticamente por la fórmula L-H (fig. 8). Por esta doble afinidad y dependiendo de la actividad interfacial que tiene el surfactante, podrá adsorberse a la interfase y mantener una dispersión, lo cual lo caracteriza como dispersante o emulsificante (Salage, 2000; Knowlton, 1993; Miñana, 1982; Forgiarini y col., 2001).

Miñana plantea que la selección de un surfactante, se hace basándose en las propiedades que debe poseer el producto final y también en la combinación de ingredientes que lo constituye y que tiene que cumplir con ciertas características como producir una baja tensión interfacial en el sistema específico, en el cual va a ser utilizado, se relativamente económico y no ser toxico ni irritante.

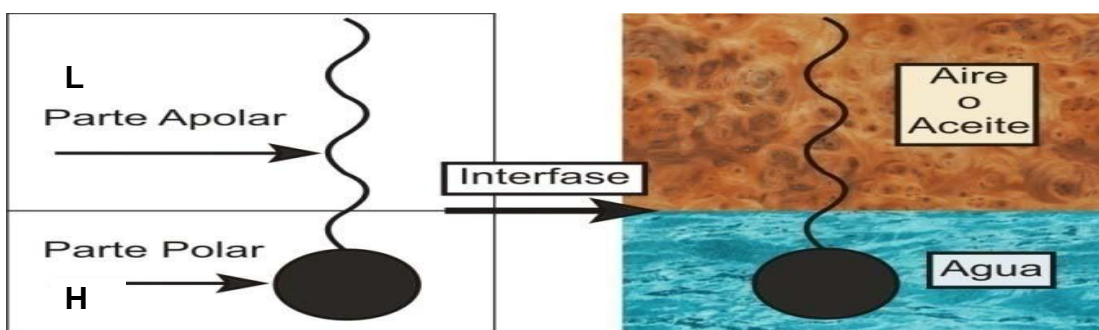


Figura 8: Esquema de surfactante.

Fuente: tomado y modificado de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n3/polar.jpg>.

www.bdigital.ula.ve

II.6.6. Agente conservador

El artículo Cosmetics y Toiletries (1993), explica que es necesario el uso de conservadores que permitan protegerlos eficazmente contra el crecimiento de microorganismos y contaminaciones accidentales, lo que garantiza una vida estable del producto, por lo menos dos años, incluso durante su consumo.

Estos agentes conservadores pueden ser de tres tipos: antioxidantes que retardan o impiden su enranciamiento; bactericidas que luchan contra el desarrollo de bacterias, y fungicidas que evita el crecimiento de hongos (Orth, 2000; Olmo, 1995). Los agentes de conservación más usados en productos del cuidado personal son: los parabenos (preservativos sintéticos

incluyen la mezcla de varios ésteres del ácido p-hidroxibenzóico (metilo, etilo, propilo y butilo) (Steinberg, 1984).

II.6.7. Agente viscosante

Son compuestos muy diversos, de origen vegetal, animal o sintético, que poseen la propiedad de ser hidrófilos. Son utilizados para espesar las preparaciones que tienen baja viscosidad y para estabilizar las emulsiones de fase continúa acuosa; los más utilizados son: los mucílagos vegetales (goma arábiga, goma tragacanto), los alginatos, los derivados de la celulosa (metilcelulosa y carboximetilcelulosa), las proteínas y los productos de degradación (gelatina) y ciertas sustancias vegetales (bentonita), (Miñana y Goncalves, 2011).

www.bdigital.ula.ve

II.7. Método de HLB: Balance Hidrofílico-Lipofílico

Este método nace en 1949, cuando Griffin notó que existía una relación entre la naturaleza de un surfactante y sus propiedades como agente tensoactivo y emulsionante. Introdujo el concepto de HLB (Balance Hidrofílico-Lipofílico) que, en esta época, revolucionó los métodos de formulación de las emulsiones y el manejo de los surfactantes (Griffin, 1949). Becher y Griffin (1970, 1974) recopilaron varios centenares de artículos que se refieren al HLB.

El HLB, es un concepto que permite, una cuantificación práctica y predicción del comportamiento de los tensioactivos en un sistema

determinado debido a que cada surfactante presenta un balance entre sus afinidades hidrofílicas (para la fase acuosa) y lipofílica (para la fase oleica).

A pesar de que el valor HLB es un buen parámetro para la elección del surfactante, tienen serias limitaciones; por ejemplo, este no determina la eficiencia del surfactante, ni tampoco su efectividad y varía con la temperatura (Griffin, 1949). Por tanto, el valor HLB, solo nos permite saber el tipo de emulsión que el surfactante generará, es decir, sistemas O/W o W/O.

El concepto de HLB es esencialmente fisicoquímico, en el sentido que él indica un balance entre las tendencias hidrofílicas y lipofílicas del emulsionante, así mismo, el autor por otra parte concluye que el concepto de HLB se basa en la máxima estabilidad de emulsiones O/W (Salager, 1998).

II.8. Control de calidad de los productos farmaceuticos: crema

Coello (2009) establece que objetivo del control de calidad del producto terminado es asegurar tanto el cumplimiento de las especificaciones establecidas para la formulación como la mantención de las características y composición del producto en forma constante desde un lote de producción a otro. Según Hernández (2016), describe las características organolépticas como aquellas que dan las plantas como aromas, colores y sabores que los hacen más gratos para el olfato y la vista.

De tal modo Coello (2009) indica que se inicia la evaluación de una forma farmacéutica tópica analizando las propiedades organolépticas y físicas del producto final como son el aspecto, olor, color, pH y además se puede medir la viscosidad en el equipo previamente calibrado con la cantidad suficiente de producto, también indica que se puede hacer la determinación de

untuosidad al tacto aplicando una pequeña cantidad de la crema en el dorso de la mano y determinar si existe presencia o ausencia de grumos.

II.8.1. Prueba de estabilidad

Una prueba de estabilidad puede ser definida como el proceso de evaluar un producto para asegurar que los atributos claves se mantienen dentro de lo aceptable, en la realización de estas pruebas hay que tomar en cuenta, ante lo expuesto, Albert y col., (1989) formulan que antes de iniciar los estudios de estabilidad de una forma farmacéutica, 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. Se tiene que existe una cantidad de pruebas que se utilizan para estudiar la estabilidad de un producto farmacéutico entre ellas tenemos algunas, una de ellas:

II.8.2. Prueba de estabilidad preliminar

La prueba de estabilidad preliminar que también es conocida según Junior (2001) como prueba de selección, estabilidad acelerada o de corto plazo, 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.

II.8.3. Prueba de estabilidad acelerada

También conocida como estabilidad normal o exploratoria sirve como auxiliar para la determinación de la estabilidad de la formulación o producto y puede ser empleado para estimar el plazo de validez o tiempo de vida útil del producto. Además, puede ser realizado cuando existan cambios significativos en ingredientes del producto y/o del proceso de fabricación, en material de acondicionamiento que entra en contacto con el producto, es decir, para el estudio de la compatibilidad de la formulación con los materiales de acondicionamiento (Junior, 2001).

Para realizar la prueba de estabilidad acelerada a productos farmacéuticos se recomienda que las muestras para evaluación de la estabilidad sean acondicionadas en frascos de vidrio neutro, transparente, con tapa que garantice un buen cierre evitando pérdida de gases o vapor para el medio, la cantidad de producto debe ser suficiente para las evaluaciones necesarias. En el caso que existiera incompatibilidad conocida entre los componentes de la formulación y el vidrio, el formulador debe seleccionar otro material de acondicionamiento. El empleo de otros materiales queda a criterio del formulador, dependiendo de sus conocimientos sobre la formulación y los materiales de acondicionamiento (Junior, 2001).

Se debe evitar la incorporación de aire en el producto, durante el envasado en el recipiente de prueba. Es importante no completar el volumen total del recipiente permitiendo un espacio vacío (head space) de aproximadamente un tercio de la capacidad del frasco para posibles

intercambios gaseosos. Generalmente tiene una duración de noventa días, aunque en algunos casos, la duración de esta prueba puede ser extendida por seis meses o hasta un año, dependiendo del tipo de producto las muestras pueden ser sometidas a calentamiento en estufas, enfriamiento en refrigeradores, exposición a la radiación luminosa y al ambiente (ver tabla 1), (Junior, 2001).

Tabla 1: valores generalmente adaptados para bajas temperaturas y temperaturas elevadas.

Temperaturas elevadas en:	Temperaturas bajas en:
Estufas	Nevera
$37 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$5 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$
$40 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$	Congelador
$45 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-5 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$
$50 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-10 \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Velasco (2001) señala que la radiación luminosa puede alterar significativamente el color y el olor del producto y llevar a la degradación de componentes de la formulación para la realización del estudio, la fuente de iluminación puede ser la luz solar captada a través de vitrinas especiales para ese fin o focos que presenten espectro de emisión semejante al del Sol, como los focos de xenón. También son utilizadas fuentes de luz ultravioleta.

Las muestras también deben ser sometidas a la prueba de estabilidad acelerada en su material de acondicionamiento, los productos deben ser almacenados en más de una condición de temperatura, para que se pueda evaluar su comportamiento en los diversos ambientes a los que pueda ser sometido (Junior, 2001).

La periodicidad de la evaluación de las muestras puede variar conforme la experiencia técnica, especificaciones del producto, características especiales de algún componente de la formulación o sistema conservante utilizado, sin embargo, lo más usual en este estudio acelerado es que sean evaluadas inicialmente en tiempo cero, 24 horas y a los 7, 15, 30, 60 y 90 días (Junior, 2001).

En caso del que el estudio se prolonga por más tiempo, se recomiendan evaluaciones mensuales hasta su término. Los parámetros a ser evaluados deben ser definidos por el formulador, dependen de las características de la formulación en estudio y de los componentes utilizados en esta formulación (Junior, 2001). De manera general, se evalúan:

Características organolépticas: aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable (Junior, 2001).

Características físico-químicas: valor de pH, viscosidad y densidad, entre otros (Junior, 2001).

Características microbiológicas: estudio del sistema conservante del producto por medio de la prueba de desafío efectuada antes y/o después del período de estudio acelerado (Junior, 2001).

Se debe tomar una muestra de referencia, también denominada patrón, que en general puede ser mantenida en nevera o a temperatura ambiente, al abrigo de la luz (Junior, 2001).

De igual manera, Leonardi y Campos (2001) describen otra prueba de estabilidad denominada prueba de anaquel la cual también conocida como estabilidad de larga duración o shelf life, es un estudio realizado en el

período de tiempo equivalente al plazo de validez estimado durante los estudios de estabilidad relacionados anteriormente. Es utilizado para evaluar el comportamiento del producto en condiciones normales de almacenamiento; la frecuencia de los análisis debe ser determinada conforme el producto, el número de lotes producidos y el plazo de validez estimado, tiene como objetivo validar los límites de estabilidad del producto y comprobar el plazo de validez estimado en la prueba de estabilidad acelerada.

II.8.4. Control de calidad de productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles

El principal ente que especifica la forma de trabajar en un laboratorio de control de calidad microbiológica de productos farmacéuticos es la OMS, la cual reitera la importancia de garantizar la calidad de productos, generando ensayos estandarizados y demostrados por cada laboratorio que los utilice, es decir, que para cada producto farmacéutico debe existir un protocolo de validación de técnicas que sustente que el producto permite la recuperación de microorganismos de referencia (OMS, 2013).

Es por esta razón, que este organismo, le otorga la facultad a un grupo de profesionales que desarrollan cada año, en el compendio conocido como USP, los ensayos microbiológicos estandarizados y cómo validarlos. Para el caso del examen microbiológico de productos no estériles, este se puede dividir en dos pruebas principales:

1. USP capítulo 61: Prueba de recuento microbiano (USP, 2016): consiste en la cuantificación de bacterias mesófilas recuperadas de un producto farmacéutico no estéril. Para cada producto existe un límite de microorganismos, entre bacterias y hongos, aceptable para su aprobación

2. USP capítulo 62: Prueba de microorganismos específicos (USP, 2016): consiste en determinar la ausencia o presencia de microorganismos patógenos en productos farmacéuticos. Estos microorganismos se encuentran especificados para cada forma farmacéutica (tabla 2), es decir, para el caso de medicamentos orales, se debe demostrar la ausencia de *Escherichia coli*, en el caso de medicamentos que tienen contacto con piel como cremas, ungüentos y polvos se debe determinar la ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; Por lo tanto, las bacterias y hongos especificados dependen del uso que se le va dar al fármaco y de la patogenicidad de los microorganismos mencionados .

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2: Límites de aceptabilidad para productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles según especificaciones de la USP.

Vía de administración	Recuento de microorganismos aerobios totales (ufc o ml)	Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras (ufc o ml)	Microorganismos específicos (1 g o ml)
Vía inhalatoria (excepto soluciones fisiológicas para nebulizar)	10^2	10^1	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de bacterias gran negativas tolerantes
Vías oromucosa Cutánea Gingival Nasal Auricular	10^2	10^1	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Parches transdérmicos (límites para un parche incluyendo la capa adhesiva y el soporte).			
Vía vaginal	10^2	10^1	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Ausencia de <i>Cándida albicans</i>
Preparaciones acuosas para uso oral	10^2	10^1	Ausencia de <i>Escherichia coli</i>
Preparaciones no acuosas para el uso oral	10^3	10^2	Ausencia de <i>Escherichia coli</i>
Vía rectal	10^3	10^2	-
Aplicaciones sobre escaras, ulceraciones o quemaduras	Ausencia de gérmenes revivificables (g ó ml)		

II.9. Importancia de la actividad antibacteriana

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales (curativos y preventivos), alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica (O. M. S., 2004).

Dentro de las actividades biológicas más comunes reportadas en el uso de los productos de origen natural, está la actividad antibacteriana, una de las principales razones relativa para ella es la rapidez y facilidad de los métodos de ensayos, frente a otros ensayos de actividad biológica (Márquez y col., 2004). Otra de las razones radica en la evidencia de los antimicrobianos usados con éxito en el pasado, en la actualidad ya no ejercen el mismo efecto sobre las bacterias puesto que estos han adquirido resistencia, hecho que ha provocado una alerta mundial entre los centros de salud y organizaciones dedicadas al estudio y control de los microorganismos (Bustos y cols., 2006).

En el caso particular de *S. aureus*, antes del uso de antibióticos este producía una mortalidad aproximada del 80 % y aun hoy en día este porcentaje se mantiene elevado encontrándose entre el 25% y 63% ya que las cepas han adquirido un amplio rango de resistencia a antibióticos la penicilina, metilina y vancomicina (Bustos y cols., 2006). De manera analógica los Enterococcus como *Enterococcus faecalis* presentan resistencia a los cefalosporina, clindamicina y cotrimoxazol (Caussey cols., 2006). Así como para *Escherichia coli* de aislamiento urinario se ha observado el aumento de la resistencia a microbianos como amoxicilina-clavulánico, ciprofloxacina y norfloxacina (Márquez y cols., 2004).

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Redo y col., 1989; Silver y Bastian, 1993). El desarrollo de la farmacéutica inicia con la identificación de principios activos, los análisis biológicos, la formulación de la dosis, seguida por estudios clínicos para establecer la seguridad, eficacia y perfil farmacológico de las nuevas drogas (Iwu y col., 1999).

II.9.1. Las bacterias

Murray y colaboradores (2009) describe a las bacterias como microorganismos procariotas, es decir, microorganismo celulares sencillos sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplasmático que se reproducen por división asexual, además, explica que la pared celular de las bacterias es muy compleja por lo cual existen dos formas básicas, debido a que unas bacteria tienen una pared celular Gram positiva con una gruesa capa de peptidoglucano y otras una pared celular Gram negativa con una delgada capa de peptidoglucano.

De igual modo, Barrios (1988), describe las características principales de las bacterias como seres unicelulares procariotas que pueden tener forma esférica, bacilar o en espiral, que se reproducen asexualmente por fisión binaria, que pueden llegar a ser fotosintéticas o no, inmóviles o móviles mediante flagelos.

II.9.2. Características de las bacterias usadas en la investigación

II.9.3. *Staphylococcus aureus*

Se caracterizan por pertenecer a la familia *Staphylococcaceae*, son cocos Gram positivos, no móviles, que no forman esporas, anaerobios facultativos y catalasa positivos (Koneman y col., 2008).

Se considera una flora normal de narinas, la nasofaringe, la región perianal y la piel humana, puede colonizar diversas superficies epiteliales o mucosa, puede transmitirse de persona a persona a través de fómites, del aire o de las manos sin lavar de profesionales de la salud sobre todo en el ámbito nosocomial, puede ser transmitido a los pacientes por trabajadores de la salud con lesiones cutáneas infectadas, las infecciones que por lo general se asocian con una intensa supuración y destrucción del tejido pueden agruparse en infecciones cutáneas localizadas, como foliculitis, forúnculos, infecciones de diversas heridas, infecciones profundas que se diseminan a través de la piel hasta causar bacteriemia (Forbes y col., 2009).

II.9.4. *Escherichia coli*

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* se caracteriza por ser bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos tiene capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas (Pascual y col., 2000).

Es una flora normal del intestino de los seres humanos y otros animales, también puede habitar en el aparato genital femenino, el modo de transmisión varía con el tipo de infección, en el caso de las infecciones no gastrointestinales los microorganismos pueden ser endógenos o diseminarse

de persona a persona sobre todo en el ámbito hospitalario en el caso de las infecciones gastrointestinales el modo de infección varía con el tipo de *Escherichia coli* y puede involucrar la diseminación fecal-oral entre seres humanos a través de alimentos o agua contaminados o consumo de carnes mal cocidas o por la leche del ganado bovino colonizado, esta puede producir infecciones urinarias, bacteriemias e infecciones nosocomiales en varios sitios del cuerpo y se considera la causa más frecuente de infecciones nosocomiales por Gram negativos (Forbes y col., 2009).

II.9.5. *Pseudomona aeruginosa*

Su reservorio habitual es el ambiente, sobrevive bien en los ambientes domésticos y en el ámbito hospitalario, rara vez forma parte de la flora normal de los seres humanos sanos (Forbes y col., 2009). Perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, bacilo Gram negativo rectos o ligeramente curvos que son aerobios estrictos, son móviles por medio de unos flagelos polares, utilizan glucosa en forma oxidativa y produce un pigmento difusible (Koneman y col., 2008).

Su modo de transmisión es a través de la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, exposición a dispositivos médicos y soluciones medicamentosas contaminadas, introducción por heridas penetrantes, es un patógeno oportunista muy agresivo que puede causar infecciones adquiridas en la comunidad o en el hospital como foliculitis, otitis externa, infecciones del aparato respiratorio, urinario y heridas entre otras (Forbes y col., 2009).

II.9.6. *Klebsiella pneumoniae*

Es un bacilo Gram negativo, no móvil, de la familia *Enterobacteriaceae*, es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada del género

Klebsiella (López y Echeverri, 2009). *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizado que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias (González y col., 2001), usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos (Vernon, 2003).

II.9.7. Métodos para determinar la actividad antibacteriana

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias sintética, estos métodos se aplican mucho en el ámbito hospitalario como es el caso del método de difusión de discos (Kirby-Bauer) (Phillips, 1998; Wayne, 1997), el método de pozo en agar (Frobisher y col., 1974) y el método de dilución en tubo (turbidimetria) (Wilcke, 1999); para hallar no solo la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos, cualquiera de los métodos mencionados puede utilizarse para hallar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales cada uno posee ciertos inconvenientes, por lo cual se hace necesario que al momento de realizarlas se deben hacer modificaciones para que sean adecuadas, reproducibles y fiables (Escobar, 2002).

Los problemas generales inherentes a los ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores (Vanden y Vlietinck, 1991; Hadacek y Greger, 2000), de allí la importancia de conocer los estándares para estas pruebas de actividad biológica. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana (Freixa y col., 1998; Salie y col., 1996).

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. De acuerdo a las investigaciones reportadas en el

periodo entre 1980 y 2007, las técnicas más usadas para la evaluación antimicrobiana de extractos vegetales son variadas (tabla 3) (Ramírez, 2009).

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, para evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo (Ramírez, 2009).

Tabla 3: Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana.

Método	Condición	MIC µg/ml (Concentración Inhibitoria Mínima)
Difusión en agar (discos)	S, I, R	No
Dilución en agar	S, I, R	Sí
Dilución en caldo	S, I, R	Sí
Métodos automatizados	S, I, R	Sí
E-test	S, I, R	Sí
Abreviaciones: S, susceptible; I, Intermedio; Resistente.		
MIC: concentración inhibitoria mínima.		

La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizada en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Anon, 2003).

De acuerdo al European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (conocido en español como el Comité Europeo de las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobianos) en el 2000 expone que los medios de

cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller hilton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo (Doughari, 2006).

II.9.8. Método de difusión en pozos

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Barry y col., 1979). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y colaboradores (método de Kirby-Bauer), este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos.

Según el National Committee for Clinical Laboratory (traducido al español significa Comité Nacional de Laboratorio Clínico) en 1997 establece que el objetivo fundamental 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 perforado formando unos pocillos donde se adiciona el producto a evaluar (Frobisher y col., 1974).

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de degeneración del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables (Ramírez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

II.10. Operacionalización del evento

Tabla 4: **Operacionalización del evento de estudio:** Formulación de la forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq.

Variable	Formulación de una forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base del extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq.
Tipo de variable	Independiente
Definición conceptual	Forma de preparar un medicamento que contiene un principio activo con el fin de su administración en la superficie corporal (Balsam y Sagarin, 1972).
Definición operacional	Se realizó bajo el método HLB: Balance Hidrofílico- Lipofílico
Dimensiones	Color Olor Aspecto pH Estabilidad
Indicador	Ensayos para determinar sus características organolépticas y físicas químicas.

Fuente: propia.

Tabla 5. **Operacionalización del evento de estudio:** Actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq.

Variable	Actividad antibacteriana de una forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base de extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq
Tipo de variable	Dependiente
Definición conceptual	La actividad antibacteriana se define como la actividad de una sustancia que inhibe el crecimiento de los microorganismos o lo destruye, un fármaco de amplio espectro puede inhibir una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, mientras que un fármaco de espectro reducido solo es activo contra determinados gérmenes (Murray y col., 2009).
Definición operacional	La actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico se midió por el método de difusión en pozo.
Dimensiones	1.Sensible 2.Sensibilidad intermedia 3.Resistencia
Indicador	Medición del diámetro del halo de inhibición.

Fuente: propia.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

III.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación señala el grado de profundidad y el tipo de resultado, y está en concordancia con el objetivo general, los tipos de investigación en este caso se definen por el objetivo, más que por el área de conocimiento en la cual se realiza el estudio, los métodos que se utilizan o la fuente de los datos. Cada tipo de investigación tiene características y procesos propios (Hurtado, 2010).

Por otro lado, Arias (1999), señala que el nivel de investigación se refiere al grado de profundidad con que se aborda un objeto o fenómeno. Así mismo Hurtado (2010), propone que la investigación proyectiva tiene como objetivo diseñar o crear propuestas dirigidas a resolver determinadas situaciones, el tipo de investigación realizada fue proyectiva ya que el grado de profundidad que se deseó abordar fue proponer la formulación de una forma farmacéutica de uso tópico desarrollada a base en extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq y determinar su actividad antibacteriana frente cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

III.2. Diseño de investigación

El término diseñar se refiere al plan o estrategia concebida para obtener la información que se desea. El diseño señala al investigador lo que debe hacer para alcanzar sus objetivos de estudio y para contestar las interrogantes de conocimiento que se ha planteado (Hernández y cols., 2003).

Antes lo expuesto, el diseño de investigación que fue aplicado en el estudio corresponde al de tipo experimental, ya que se formuló una forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq realizada en el Laboratorio de Galénica y la determinación de la actividad antibacteriana de la misma, para la cual se usaron cepas bacteriana Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional (ATCC), en el Laboratorio de Vacunas, del departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes.

En cuanto al tiempo en el cual se recolecto la información se aplicó el diseño evolutivo contemporáneo ya que los datos se obtuvieron durante el desarrollo de la investigación y en diferentes periodos de tiempo.

III.3. Población y muestra

III.3.1. Población

Una población o universo es el conjunto de casos que concuerdan con una serie de especificaciones (Selltiz y cols., 1980). Se entiende por población según Nuñez (2001), todas las unidades de observación,

individuos o conglomerados que tienen características similares o diferentes, pero que pueden ser estudiados.

En la investigación que se realizó y en función de los datos que se requieren para las fases de la investigación, el universo poblacional estuvo constituido por el extracto alcohólico obtenido de *Astronium graveolens* Jacq que se utilizó como principio activo para realizar la formulación farmacéutica y las cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional (ATCC) que fueron suministradas por el Laboratorio de Vacunas, del departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes.

III.3.2. Selección de la muestra

La muestra es un "subconjunto representativo de un universo o población." (Morles, 1994). Asimismo Núñez (2001) explica que la muestra es una fracción considerada de una población, universo o colectivo la cual se estudia para determinar los caracteres en la totalidad de una población, de esta manera, el tipo de muestreo en la investigación realizada corresponde al modelo no probabilístico de tipo interrelacional, ya que la elección de la muestra no depende de la probabilidad, sino que depende de las características de la investigación, es decir, no se realiza con fórmulas probabilísticas, por el contrario se toma en cuenta los criterios de los investigadores y de la investigación misma (Hernández y col., 2006).

De acuerdo a lo expresado anteriormente para la investigación llevada a cabo se utilizó como muestras el extracto alcohólico obtenido de las hojas de *Astronium graveolens* Jacq como principio activo para llevar a cabo la formulación de una forma farmacéutica de uso tópico (crema) y las cepas

bacterianas de referencia internacional (ATCC) Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y Gram negativas como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klepsiella pneumoniae* (ATCC 23357).

III.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Arias (2012) hace referencia a cualquier recurso, dispositivo o formato, ya sea en papel o digital, que se va a utilizar para obtener, registrar o almacenar información necesaria para ser utilizada en un futuro.

La técnica de recolección de datos para obtener la información de la investigación consistió en la observación directa de cada uno de los procesos implicados para obtener la forma farmacéutica de uso tópico elaborada a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq a diferentes concentraciones, así mismo, observar si la forma farmacéutica de uso tópico tiene actividad antibacteriana frente a bacterias de referencia internacional (ATCC).

El instrumento que se aplicó en la recolección de datos de la investigación se basó en una ficha que contiene la información sobre la forma farmacéutica que se elaboró, como el tipo, el principio activo, el peso de la formulación y la estabilidad a diferentes temperaturas, las propiedades organolépticas, físico-químicas de la formulación.

Además contiene de manera sintetizada los datos de las cepas bacterianas que se utilizaron para determinar la actividad antimicrobiana de la forma farmacéutica, como la clasificación taxonómica de la bacteria, la conformación y coloración que toma, los tipos de antibióticos a las que son resistentes, datos sobre la lectura de los halos de inhibición correspondiente en el ensayo de las bacterias frente a la forma farmacéutica tópica usando

como principio activo el extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq (ver anexos).

III.5. Metodología de la investigación

III.5.1. Recolección de la planta

Las partes aéreas de la especie vegetal *Astronium graveolens* Jacq fueron recolectadas en diciembre 2008 en la Estación Experimental Caparo, estación ubicada en los Llanos Occidentales al Suroeste del Estado Barinas en el Municipio Ezequiel Zamora, del material vegetal se seleccionó una muestra testigo la cual se depositó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).

www.bdigital.ula.ve

III.5.2. Obtención del extracto alcohólico

El material biológico recolectado correspondiente a las partes aéreas la especie vegetal *Astronium graveolens* Jacq, un total de 500 g de material seco, triturado y pulverizado, fueron sometidas a un proceso de maceración con etanol (EtOH) a temperatura ambiente por 3 días, para el cual se necesitó de un equipo simple, al pasar el tiempo propuesto se extrajo el extracto etanoico del material vegetal insoluble mediante la técnica de filtración por gravedad, posteriormente se usó la técnica de destilación a presión reducida bajo temperaturas comprendidas entre 40°C y 50°C para la eliminación del disolvente y así poder obtener el extracto crudo y seco de la planta en estudio, obteniendo un total de material seco y crudo de 15 g.

III.5.3. Eliminación del color natural del extracto

Para la eliminación del color natural del extracto crudo y seco de *Astronium graveolens* Jacq se realizó utilizando carbón activado, colocando el extracto crudo y seco en metanol mezclado con cantidad suficiente de carbón activado y agitando durante unos minutos a temperatura ambiente, posteriormente se filtró por la técnica de filtración por gravedad, observándose que el extracto aun preservaba su coloración natural, por ende se decidió someter a calentamiento el extracto con cantidad suficiente de carbón activado, obteniendo el mismo resultado, sin embargo se decidió trabajar el extracto en la formulación farmacéutica con el color natural del mismo.

III.5.4. Preparación de la crema

Para la elaboración de la crema de uso tópico a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq se utilizó el método del balance hidrófilo lipófilo (HLB).

Los componentes fueron los siguientes:

Tabla 6: Componentes de la crema

Componentes	
Extracto seco y crudo de <i>Astronium graveolens</i> Jacq	
Mezcla de surfactantes no iónicos	Agente viscosante
Aceite de origen sintético	Agente secuestrante
Agente conservador	Agente regulador de pH
Agente disolvente	Agua destilada

Método de elaboración:

Se clasificaron los componentes con base en su naturaleza hidrófila y lipófila, a excepción del agente viscosante y del principio activo, las materias primas utilizadas son de la casa sigma-aldrich.

En un recipiente de acero inoxidable se pesaron los componentes que constituyen la fase acuosa. Fase A

En otro recipiente de acero inoxidable, se pesaron los componentes de la fase oleosa. Fase B

En vaso de precipitado, se pesó el agente viscosante y se le adicionó agua destilada previamente pesada. Se solubilizó bajo agitación. Fase C

Luego, fueron pesados en vasos de precipitado: 1, 2 y 3 g de los principios activos (Extractos seco y puro de *Astronium graveolens* Jacq), y solubilizados en alcohol etílico respectivamente.

Posteriormente, las fases A y B fueron sometidas a calentamiento a 70 °C y a 65 °C respectivamente, luego bajo agitación mecánica, la fase A fue adicionada a la fase B. hasta completa homogeneización durante 25 minutos.

Formación de la emulsión:

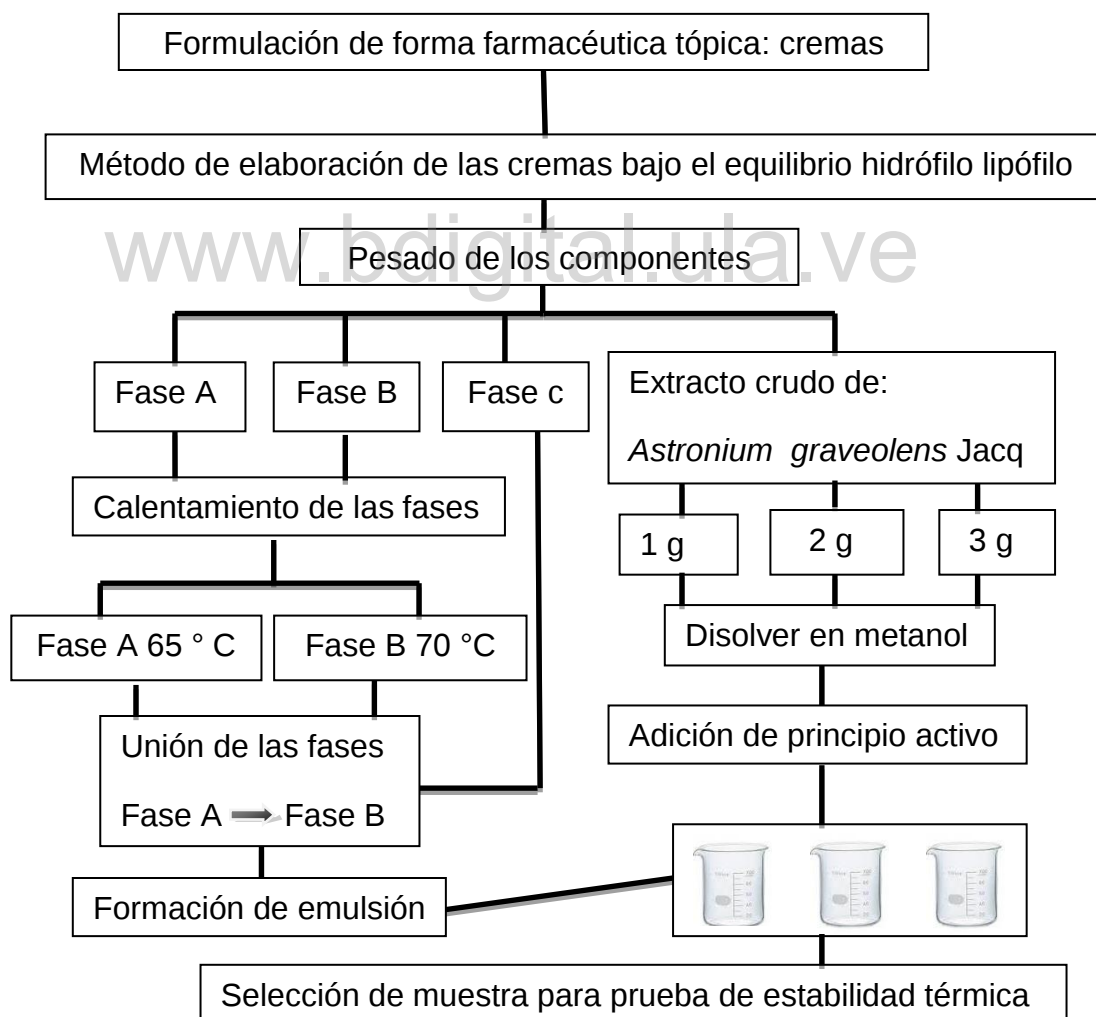
Se tomó la emulsión y se pesaron 3 cantidades iguales de la misma en balanza digital, a las que se le añadieron los principios activos, incorporaron bajo agitación mecánica por 5 minutos (ver esquema 1), luego se les midió el pH y fueron ajustados a valores eudérmicos (5-6).

Se determinaron las pruebas organolépticas como (pH, centrifugado, color, olor, aspecto, estado de presentación).

III.5.5. Prueba de estabilidad térmica

Una vez terminado el producto, en este caso la crema elaborada a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq al 1%, 2% y 3% se tomaron muestras para el estudio de estabilidad que fueron sometidas a condiciones de temperatura aceleradas mediante el uso de una estufa y a temperatura ambiente por un periodo de tiempo de 3 meses.

Esquema 1: Preparación de las cremas en el Laboratorio de Dermocosmética, en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.



III.5.6. Control de calidad microbiológico

Procedimiento realizado en el análisis microbiológico de la formulación farmacéutica de *Astronium graveolens* Jacq

Para llevar a cabo el análisis se eligió la crema de *Astronium graveolens* Jacq al 3%; se llevó al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Farmacia, adjunto a la Cátedra de Microbiología Aplicada en Microbiología de Medicamentos, el cual se encontró en óptimas condiciones para la realización del análisis, el laboratorio contaba con las instalaciones e instrumentos previamente desinfectados y esterilizados. El inicio de este análisis se llevó a cabo el lunes 28 de mayo del 2018, bajo la supervisión y apoyo del personal responsable y experto en la materia.

En el laboratorio se procedió a pesar 10 g de la muestra en una balanza de precisión, con la muestra ya pesada se adiciono a 90 ml de caldo pre enriquecido Lethen preparado en un Erlenmeyer (dilución 10^{-1}), inmediatamente se agito por aproximadamente 25 veces, se dejó sedimentar y luego con la ayuda de un pro-pipeteador y una pipeta volumétrica se realizó 1 dilución tomando de la solución preparada inicialmente una alícuota de 1 ml para colocarlo en 9 ml de agar peptonado (dilución 10^{-2}) agitar.

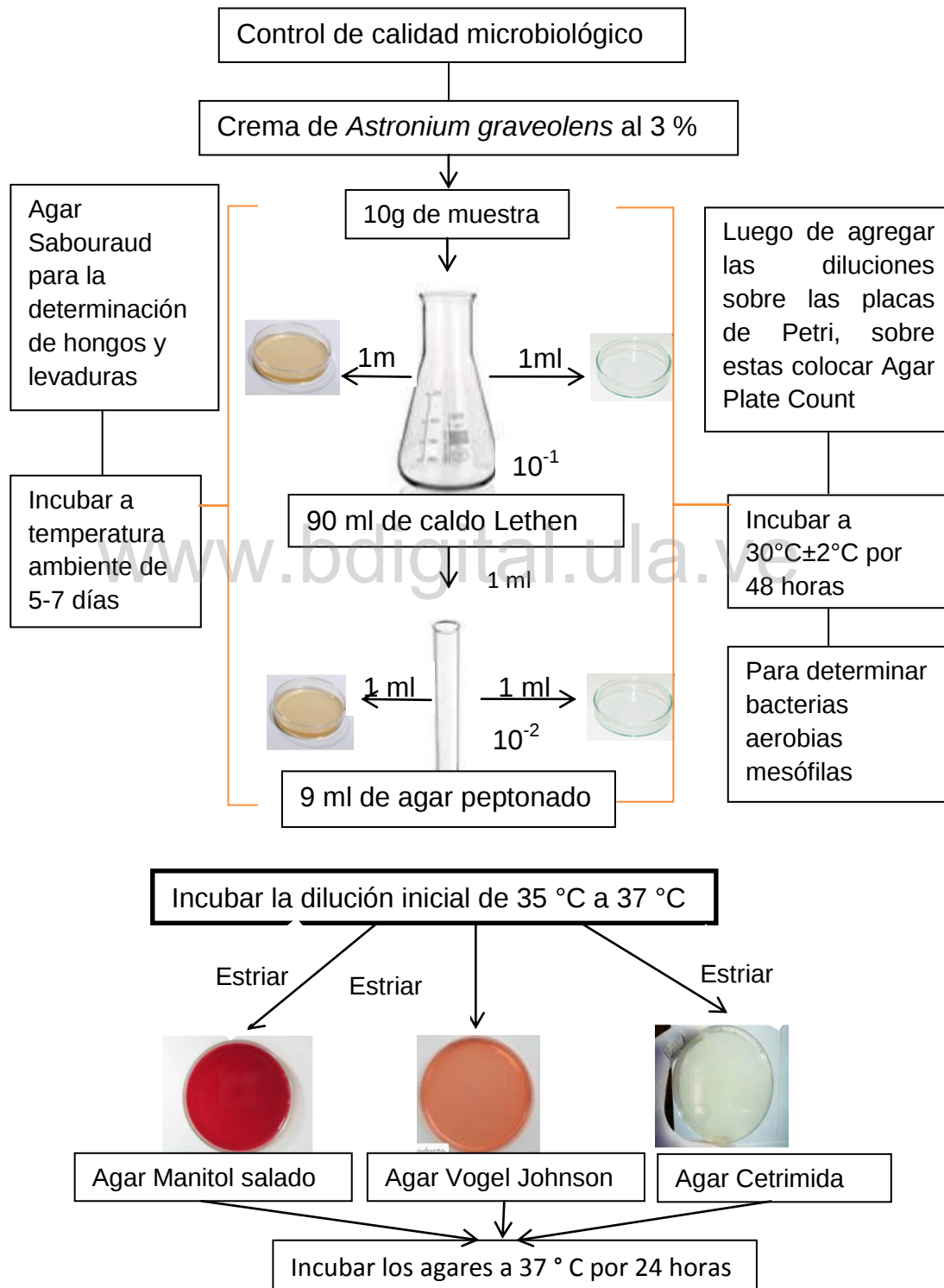
Posteriormente de la dilución inicial (dilución 10^{-1}) y la dilución secundaria (dilución 10^{-2}), se tomó 1 ml de cada dilución y cada uno de estos fueron colocados en una placa de Petri previamente estéril, a cada placa de Petri que contenían las diluciones preparadas se le añadió 15 ml de agar Plate Count para la determinación de bacterias aerobias mesófilas, luego las placas se incubaron por 48 horas a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, posteriormente en dos placas de Petri se colocaron 15 ml agar Sabouraud en cada placa, como base y en la parte superior se colocan las diluciones de la muestra de 1 ml cada una, para la determinación de hongos y levaduras, se incuba a temperatura ambiente de 5 a 7 días.

Para cada uno de los ensayos se tomó una placa de Petri de control, incubándose a la temperatura que indican los respectivos ensayos.

La dilución inicial (caldo Lethen que contienen los 10 g muestra a analizar), se llevó a incubación por 24 horas a una temperatura de 35 a 37 °C, pasado el tiempo de incubación requerido, con un aza calibrada se tomó una muestra de la dilución y se procedió a estriar sobre la superficie de las placas de Petri que contenían agar Vogel Johnson, agar Manitol salado para la determinación de *Staphylococcus aureus*, y agar Cetrimida para la determinación de *Pseudomona aeruginosa*.

Si existiera la presencia de *Staphylococcus aureus* se identificaría con colonias amarillas con zonas amarillas en el agar Manitol salado y colonias pequeñas negras rodeadas de zonas amarillas en el agar Vogel Johnson. Para la identificación de *Pseudomona aeruginosa* reconociendo si existe la presencia de este patógeno por la presencia de colonias pequeñas verdosas con fluorescencia verdosa a la luz UV.

Esquema 2: Análisis microbiológico de la formulación farmacéutica de uso tópico en el Laboratorio de microbiología de medicamentos, Escuela de Farmacia, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.



III.5.7. Determinación de la actividad antibacteriana de la crema

Para la determinación de la actividad antibacteriana de la crema de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% preparadas anticipadamente, se utilizó el método de difusión en pozos, el cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Producción de Vacunas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

III.5.8. Bacterias de ensayo

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la crema a diferentes concentraciones se seleccionaron cuatro especies de bacterias de referencia internacional pertenecientes a la colección de cultivos tipo Americano (ATCC), provenientes del cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis las cuales fueron:

Tabla 7: Bacterias Gram positivas y Gram negativas a ensayar

Bacterias	
Cepa grampositiva	Cepas gramnegativas
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)

III.5.9. Preparación de los inóculos bacterianos

Las cepas ATTC a utilizar se extrajeron de un medio de conservación y se sembraron en un caldo nutritivo, luego se encubaron por 24 horas a una temperatura de 37 °C, posteriormente para aislarlas y obtener cepas purificadas se cultivaron en medio BHI incubando por 24 horas a 37 °C, luego se tomó una pequeña cantidad de colonias bacterianas de cada una de las cepas con un asa en aro previamente estéril y se suspendió dicha muestra en una solución de cloruro de sodio estéril (equivalente al 0.85% p/v NaCl),

hasta poder observar que se ha logrado una turbidez optima correspondiente al patrón de 0.5 en la escala de Mc Farland, esta solución se realizó para cada una de las cepas bacterianas utilizadas.

III.5.10. Preparacion de las placas de Petri

Las placas de Petri se prepararon colocando 15 ml de agar base Mueller hilton estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente. Inmediatamente se preparó el agar semilla con 5 ml de agar Mueller hilton y 10 ul de cada inóculo bacteriano, después se procedió a colocar sobre el agar base 3 cilindros de acero inoxidable de 0.9 mm de diámetro y 1 mm de altura con la finalidad de realizar los pozos, los cilindros se colocaron en el agar de manera equidistantes uno del otro, y se vertió el agar semilla preparado en cada una de las placas de Petri, dejándose solidificar y luego extrayendo los cilindros cuidadosamente con una pinza estéril. Este procedimiento se realizó para cada una de las placas, los ensayos fueron realizados por triplicado.

III.5.11. Método de difusión en pozos

Una vez preparada las placas de Petri en los pozos realizados en el agar con los cilindros metálicos se procedió a colocar en cada pozo la cantidad suficiente de cada una de las cremas de *Astronium graveolens* Jacq al 1%, 2% y 3%, y un disco de antibiótico Tetraciclina de 30 ug como control positivo, además se dejó una placa de Petri solo con agar Mueller hilton estéril como control negativo, luego se incubaron las placas a 37°C por 24 horas. Por la parte posterior de cada placa de Petri se identificó cada uno de los pozos destinados a colocar las concentraciones diferentes de la crema de *Astronium graveolens* Jacq.

III.5.12. Lectura de los halos de inhibición

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas. La lectura las placas se realiza midiendo los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los pozos de igual forma que en el método Kirby Bauer (Buzzini y Pieroni, 2003; Morais y col., 2000), donde los halos mayores o igual a 14 mm se consideraran halos de inhibición significativos de acuerdo al protocolo establecido por CLSI (siglas que significan en español Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio), (CLSI, 2012).

www.bdigital.ula.ve

III.6. MATERIALES

Espécimen vegetal:

Extracto crudo y seco de *Astronium graveolens* Jacq

Materiales y equipos de laboratorio

Mezcla de surfactantes no iónicos

Aceite de origen sintético

Agente disolvente

Agente conservador

Agente secuestrante

Agente viscosante

Agente regulador de pH, agua destilada

Metanol, termómetro químico

Mortero con pistilo

Balanza digital. Marca OHAUS, varillas de vidrio

Agitador mecánico de varilla. Marca ika-Werke

Plancha de calentamiento. Marca termo scientific

pH metro. Marca OAKTON

Material de envasado (pomo 20 g)

Etiqueta y tijera, balanza de precisión

Vaso de precipitado Erlenmeyer

Pipetas volumétricas y pro-pipeteador

Placas de Petri estériles

Caldo Lethen

Agar Peptonado

Agar Plate count

Agar Sabouraud

Agar Vogel Johnson

Agar Manitol salado

Agar Cetrimida

Agar Mueller hilton

Contador de colonias

Agar BHI

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

Pseudomona aeruginosa (ATCC 27853)

Escherichia coli (ATCC 25922)

Klebsiella pneumoniae (ATCC 23357)

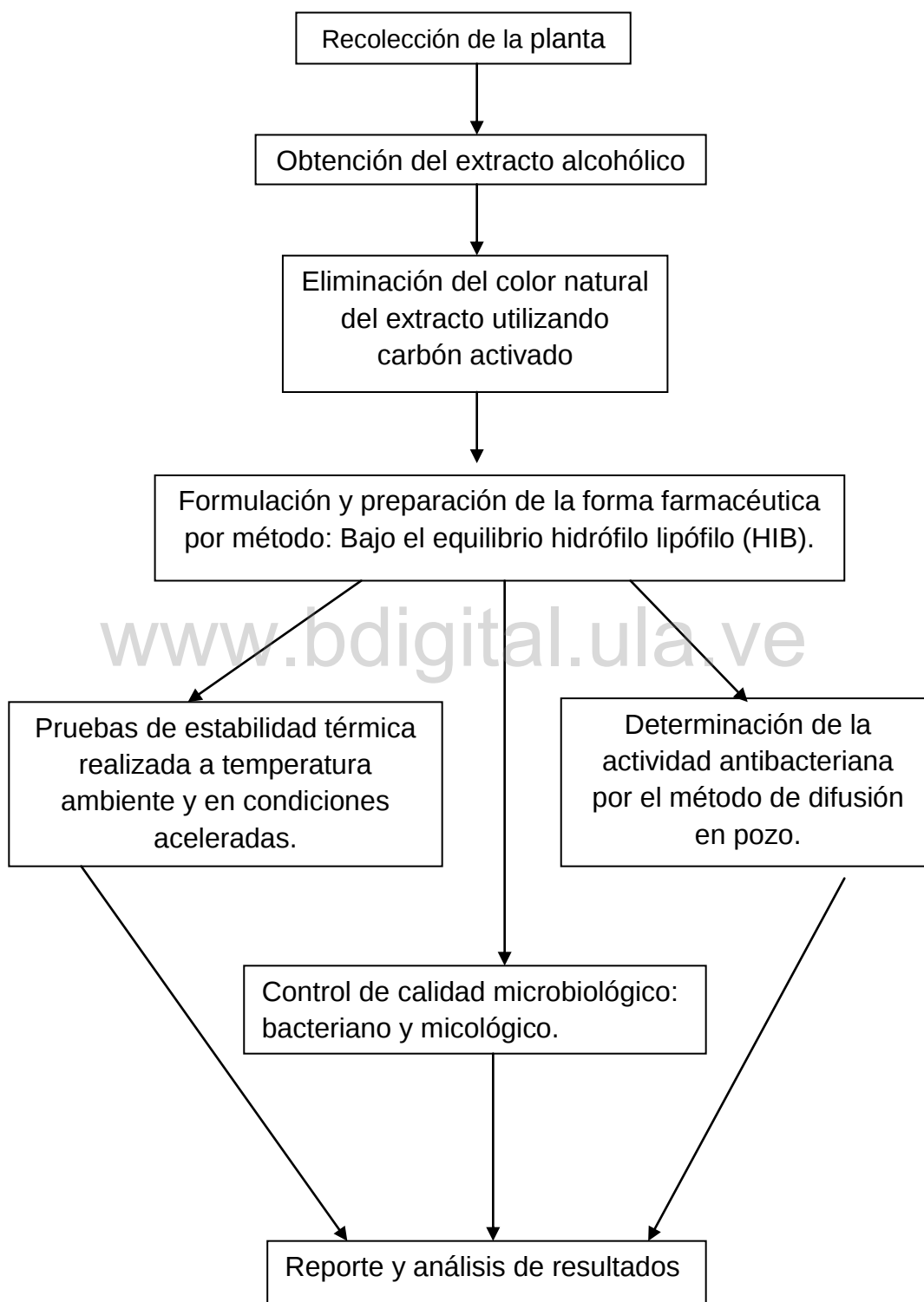
Discos de antibiótico tetraciclina (30 ug)

Patrón de turbidez Mc Farland 0.5

Cilindros metálicos (0.9 mm de diámetro y 1 mm de altura)

Pinzas y mechero Bunsen

Esquema 3: DISEÑO EXPERIMENTAL



III.7. Diseño de análisis

Los resultados fueron analizados a través de un enfoque cualitativo, en el que se describe las características organolépticas, la prueba de la estabilidad térmica, el estudio de control microbiológico y la actividad antibacteriana de cada una de las concentraciones obtenidas de la formulación de la crema a base de extracto alcohólico *Astronium graveolens* Jacq al 1%, 2% y 3% respectivamente. En consecuencia, los resultados serán analizados en función de los datos proporcionados por el estudio de las características organolépticas, el análisis del control de calidad microbiológico y la actividad antibacteriana de la formulación.

Por lo tanto, datos cualitativos como las características organolépticas, el control de calidad microbiológico se reportarán en cuadros al igual que la actividad antibacteriana.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1. RESULTADOS

IV.2. Preparación de la forma farmacéutica de uso tópico: crema

A partir del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq se realizó una forma farmacéutica de uso tópico (crema) en concentraciones de 1%, 2% y 3% respectivamente.

www.bdigital.ula.ve

IV.3. Determinación de las propiedades organolépticas

Tabla 8: Determinación de las propiedades organolépticas de la forma farmacéutica de uso tópico a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3%.

Propiedades organolépticas			
Especificaciones	Concentraciones de la crema		
	1%	2%	3%
Color	Marrón	Marrón	Marrón
Olor	Característico	Característico	Característico
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Estado	Semisólido	Semisólido	Semisólido
pH	5.5	5.5	6

IV.4. Prueba de estabilidad térmica

Una muestra de la forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% fueron sometidas a diferentes temperaturas para determinar la estabilidad de las mismas, obteniendo que las formulaciones son estables a diferentes condiciones térmicas por el periodo de prueba establecido, ya que se utilizó una muestra control y se observó que no hay cambio en sus propiedades organolépticas ni fisicoquímicas al finalizar la prueba.

IV.5. Control de calidad microbiológico

Una vez finalizada la determinación de propiedades organolépticas y la estabilidad térmica de las cremas a diferentes concentraciones; se realizó el control de calidad microbiológico de la crema de concentración 3%, cultivando la muestra en diferentes medios de cultivo para la búsqueda de bacterias aerobias mesófilas (tabla 9), de bacterias patógenas (tabla 10) y la búsqueda de hongos y levaduras (tabla 11)

Tabla 9: Determinación de bacterias aerobias mesófilas de acuerdo a las especificaciones de la USP

Medio de cultivo	Resultado	Especificaciones
Agar Plate count (dilución 10^{-1})	≤ 100 UFC en 10g	10^2 UFC/g
Agar Plate count (dilución 10^{-2})	≤ 100 UFC en 10g	10^2 UFC/g
Control negativo	Ausencia de gérmenes	

Tabla 10: Determinación de agentes patógenos de acuerdo a las especificaciones de la USP

Agente patógeno	Ensayo	Resultado	Especificaciones
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Vogel Johnson	Ausente	Ausente en 10g
	Agar Manitol salado	Ausente	Ausente en 10g
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Agar Cetrimida	Ausente	Ausente en 10g
Controles negativos	Ausencia de agentes patógenos		

Tabla 11: Determinación de hongos y levaduras de acuerdo a las especificaciones de la USP

Medio de cultivo	Resultado	Especificaciones
Agar sabouraud (dilución 10^{-1})	≤ 10 UFC en 10g	Menor de 10 UFC/g
Agar sabouraud (dilución 10^{-2})	≤ 10 UFC en 10g	Menor de 10 UFC/g
Control negativo	Ausencia de hongos y levaduras	

IV.6. Determinación de la actividad antibacteriana

De igual manera, se realizó el estudio de la actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico (crema) a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3 %, mediante el método de difusión en pozo, utilizando cepas Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *klebsiella pneumoniae*, todas las cepas fueron ATTC (ver

tabla 12). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las cepas bacterianas implicadas usando dos placas de control positivo (inoculadas con las cepas ATCC) y una placa de control negativo (sin inocular).

Tabla 12: Actividad antibacteriana de la crema de concentraciones 1%, 2% y 3%.

Microorganismos	Zona de inhibición en (mm)*			
	Concentración de las cremas			Control positivo
	1%	2%	3%	TE
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	NP	NP	NP	10*
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NP	NP	NP	10*
<i>Escherichea coli</i> (ATCC 27853)	NP	NP	NP	23*
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NP	NP	NP	22*

NP: no presenta actividad antibacteriana.

* mm de los halos de inhibición (promedio) de los discos del control positivo.

TE: Tetraciclina (30 ug).

Figura 9: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra *Staphylococcus aureus*.

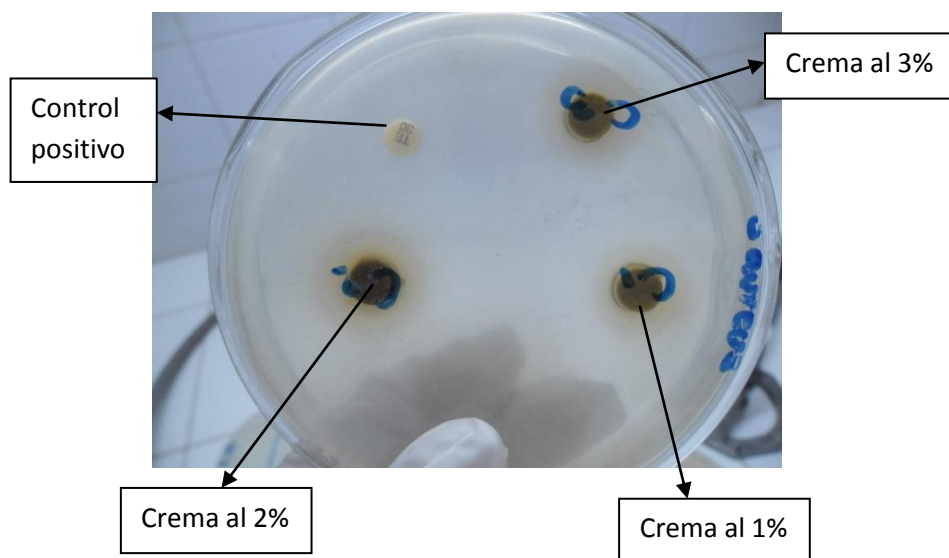


Figura 10: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra *Escherichia coli*.

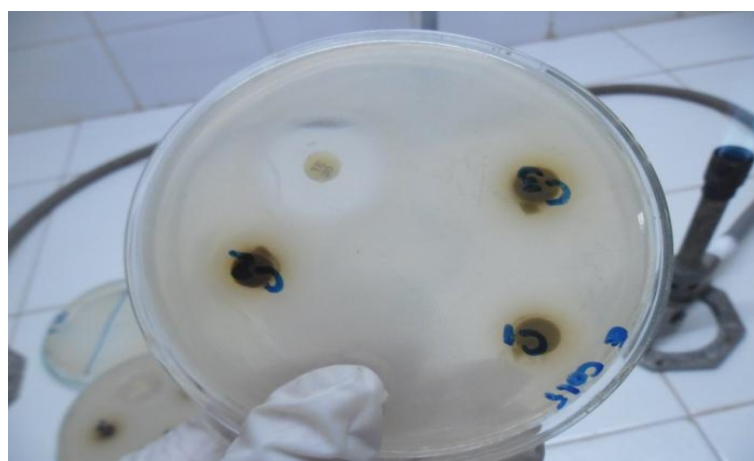


Figura 11: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra *Pseudomona aeruginosa*.



www.bdigital.ula.ve

Figura 12: Actividad antibacteriana de la crema a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% contra *Klebsiella pneumoniae*.



IV.7. DISCUSIÓN

En la literatura actualmente no se reportan estudios realizados acerca de formas farmacéuticas realizadas a base del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq, sin embargo hay estudios realizados acerca de la actividad antibacteriana y otras propiedades farmacológicas de esta planta, proveniente de sus aceites esenciales y extractos vegetales.

Hernández y cols.(2015), en una investigación realizada titulada estudio fitoquímico y evaluación del potencial biológico de plantas de la reserva forestal de Caparo: *Guarea guidonia* L, *Sleumer* (Maliaceae) y *Astronium graveolens* Jacq (Anacardiaceae), determinaron que el aceite esencial mostro actividad contras bacterias Gram negativas y Gram positivas ensayadas y los extractos EtOH y MeOH de *Astronium graveolens* Jacq resultaron activos contra bacteria Gram positivas y bacterias Gram negativas con halos de inhibición mayor de 14mm.

Por otra parte, Bonifacio y cols., (2015), en un estudio realizado denominado sistema lipídico nanoestructurado como estrategia para mejorar la actividad anti-*cándidas albicans* de *Astronium* spp incluyendo las especies como *Astronium flaxinofolium*, *Astronium urundeuva* y *Astronium graveolens* que son poseedoras de actividades anti- inflamatorias, anti-ulcerosas y antimicrobiana, demostrando que el extracto hidroalcoholico *Astronium graveolens* no mostro actividad antifúngica. Es importante mencionar, que también se han realizado otros estudios con respecto a esta planta como evaluar la actividad antitumoral y antioxidante del extracto de *Astronium graveolens* Jacq por Silvia y colaboradores en el 2016, en dicha investigación concluyeron que el extracto de *Astronium graveolens* Jacq tiene actividad antitumoral y antioxidante.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

A partir del extracto alcohólico obtenido de las partes aéreas de la planta *Astronium graveolens* Jacq se formuló una forma farmacéutica de uso tópico (crema) a diferentes concentraciones 1%, 2 % y 3% respectivamente realizado bajo el método hidrófilo lipófilo (HLB).

El extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq posee un olor y color característico propio de la planta, por lo tanto la crema terminada posee características organolépticas como: un olor característico, un color marrón parte de este proveniente del color natural del extracto alcohólico (verde oscuro), con un aspecto homogéneo y un estado de presentación semisólido, además con un Ph entre 5.5 y 6. Es indispensable indicar que los parámetros color, olor no poseen estándares de referencia con los que se puedan comparar, por lo que tienen sus propias características.

Se evaluó la estabilidad térmica de las crema de *Astronium graveolens* Jacq de concentración 1%, 2% y 3% a temperatura ambiente y a 45 °C por un periodo de 3 meses, concluyendo que las formulaciones son estables, debido a que no hay cambios en sus propiedades organolépticas.

El control de calidad microbiológico realizado con una muestra de crema de concentración 3%, dando como resultado la ausencia de microorganismos por lo que los mismos se encuentran dentro de los rangos microbiológicos menor a 1 UFC/g tanto para microorganismos aerobios mesófilos, microorganismos patógenos, levaduras y hongos, las pruebas realizadas demuestran que es un producto apto para el consumo ya que los rangos se encuentran dentro de las especificaciones para cosméticos, siendo todos inferiores a 1.

En cuanto a la evaluación de la actividad antibacteriana de la formulación farmacéutica, a pesar de haber investigaciones que demuestran que los aceites esenciales y los extractos obtenidos de las partes aéreas de *Astronium graveolens* Jacq muestran actividad frente bacterias Gram positivas y Gram negativas; la formulación farmacéutica de uso tópico (crema) a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq de concentraciones 1%, 2% y 3% no mostraron actividad antibacteriana frente las cepas bacterianas ATCC ensayadas, se indaga que puede ser debido a algunos de los excipientes utilizados en la formulación de la crema que no permitió que se liberara el potencial antibacteriano del extracto.

RECOMENDACIONES

Buscar alternativas para eliminar el color natural del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq, en la investigación se hizo uso del carbón activado para tratar de aclarar el extracto vegetal cuyo color original era un verde oscuro propio de las partes aéreas de la planta, no obteniendo resultados favorables originando de esta manera que las cremas quedaran de un color marrón.

Proponer una reformulación de la forma farmacéutica realizada e investigar cuales de los excipientes utilizados en la realización de las cremas de concentración 1 % ,2 % y 3 % a base de extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq, impidieron que se liberara el potencial antimicrobiano del principio activo.

Seguir estudiando los principios activos que se encuentran en la planta *Astronium graveolens* Jacq para que se pueda aplicar en la elaboración de otras formas farmacéuticas para contribuir con la salud de la comunidad.

Aprovechar los recursos naturales renovables que nos ofrecen los bosques y selvas de nuestro país, para de esta manera beneficiar a la población y motivar el uso de plantas medicinales no solo formas farmacéuticas químico sintéticas sino recurrir a medicina natural ya que sus principios activos no se encuentran manipulados por el hombre.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

- Abdel, S., Zaitoun, A., Farag, M., Gayed, S., Harraz, F.(2010). *Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of Schinus molle L. leaf and fruit essential oils against Trogoderma granarium and Tribolium castaneum*. Natural Products Research, v. 24, n. 3.
- Aguilar, C. y Sosa, V. (2004). *The evolution of toxic phenolic compounds in a group of Anacardeaceae genera*. Taxon. 53.357. publisher: international Association for plant taxonomy. Doi: 10.2307/4135614.
- Albert, I., Chaia, G., Lapos, A., Carvalho, A., Trevisan, C., Gomes, C., Mendes, H., Moraes, O., Mattos, R., Carvalho, R., Simas, S., Almeida, W.(1989). *Manual de Análisis Microbiológicas de Cosméticos*. INCQS/Fiocruz. Aerosol & Cosméticos (Encarte Técnico), São Paulo, v.60.
- Albornoz, A. (1979). *Medicina tradicional herbaria*. Editado por instituto farmacoterapico latina S.A., Caracas - Venezuela.
- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales: sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Publicaciones Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Anon (2003). *Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution*. European committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) of de European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Published by Elsevier Inc, 9(8), 9-15. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- Arias, F. (1999). *El proyecto de investigación: guía para su elaboración*. Tercera edición. Editorial Episteme, Orial ediciones, Caracas-Venezuela.

- Arias, F. G. (2012). *El proyecto de investigación introducción a la metodología científica* (6ta edición). Caracas, Venezuela: Episteme
- Balsam, M., Sagarin, E. (1972). *Cosmetics: science and technology* . 2nd, vol 2, Wiley-intercience , New York.
- Barrios, A. (1988). *Bacteriología y virología básica*. Editorial venezolana C.A., Mérida – Venezuela.
- Barry, D., Amsterdam, M. B., Coyle, E. H., Gerlach, C. Thornsberry, H.(1979). *Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test*. J. Clin. Microbiology. 10(6):910-8. Disponible en :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/punmed/118179/>
- Becher, P., Griffin, W. C. (1970), "*HLB: a Bibliography 1949-1969*", en Salenger, J.(Ed.), *Formulación HBL. PIT, R de Winsor* (pp.1-4) Cuaderno FIRP S210A en español. Merida- Venezuela, versión N° 2.
- Becher, P., Griffin, W. C. (1974), *Mc Cutcheon's Detergents and Emulsifiers*, en Salenger, J.(Ed.), *Formulación HBL. PIT, R de Winsor* (pp.1-4) Cuaderno FIRP S210A en español. Merida- Venezuela, versión N° 2.
- Benítez, R., Montesino, L. (1988). *Catálogo de Cien Especies Forestales de Honduras*, en Cordero, J. (Eds.), *Arboles de centroamerica: un manual para extensionistas* (pp.313-320). Centro agronómico y tropical de investigación y enseñanza. Costa rica. Recuperado de: <https://books.google.co.ve/books>.
- Bisset, N. G. (1994). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals:A handbook for practice on a scientist basis*. Medpharm Sientific Publishers, Stuttgart.10 (5) 560-566.doi:<https://doi.org/10.1002/ffj.2730100512>
- Blois, M.(1958). Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free radical. Nature, 181. 1199-1200. Doi: <https://doi.org/10.1038/1811199a>.
- Botelho, M., Rao, V., Montenegro, D., Bandeira, M., Fonseca, S., Nogueira, N., Ribeiro, R., Brito, G. (2008). *Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on*

- experimental periodontitis*. *Phytotherapy Research*, 22(4):442-449.doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.2325>.
- Bustos, J., Hamdan, A., Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno, en la comunidad*. *Revista biomédica*, 17 (4):287-305. Recuperado de: <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb061746.pdf>
- Butler, M. S. (2008). *Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials*. *Natural Product Reports*, 25(3):475-516. Doi: <https://doi.org/10.1039/b514294f>.
- Buzzini, P., Pieroni, A. (2003). *Antimicrobial activity of extracts of Clematis vitalba towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms*. *Fototerapia*. 74(4): 397 – 400. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(03\)00047-9](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(03)00047-9)
- Carlini, E., Duarte-almeida, J., Rodrigues, E., Tabach, R. (2010). *Antiulcer effect of the pepper trees Schinus terebinthifolius Raddi (aroeira-da-praia) and Myracrodruon urundeuva Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão)*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2),140-146.doi:<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200001>
- Causse, M., Franco, F., Rodriguez, F., Casul, M (2006). *Sensibilidad de los antimicrobianos de Enterococcus faecalis aislados de pacientes en la provincia de Córdoba(España)*. *Revista española de quimioterapia*,19 (2),140-143.Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo>
- Ceruks, M., Romoff. P., Fávero O. F, G. Enrique, J. G. (2007) *Polar phenolic constituents from Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae)*. *Química Nova*, 30 (3):597-599. Disponible en: [http:// www.scielo.br/scielo.php](http://www.scielo.br/scielo.php)
- Chen, T., Wielmer, E, D., Howard, J. J.(1984). *A volatile leafcutter ant repellent from Astronium graveolens*. *Naturwissenschaften*, v. 71, pag. 97-98.
- Cid, E., Morón, I. (1974). *cosméticos and perfumary* , editorial Iberolatina mexicana , mexico D.F., pag. 3.

- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.(2012). Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard- Eleventh Edition. Document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coello, R.(2009).*Elaboración y control de calidad de gel cicatrizante a base de sabila (aloe vera) y calendula (calendula officinalis)*. Tesis. Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba-Ecuador.
- Correia, S., David, J., David, J. M.(2006). *Metabólitos secundarios de especies de Anacardiaceae*. Química Nova, 29:1287-1300.
- Cronquist, A.(1988). *The evolution and classification of flowering plants*, 2nd ed. New York Botanical Garden, New York.
- De trinidad, P. (1993).*Criterios para la Selección de árboles plus y control fenológico de 5 especies nativas en condiciones de bosque seco tropicales en Chenocente*, Nicaragua tesis mag. Torrialba C.R. Catie.
- Ding Hou (1978). *Anacardiaceae*. In Flora malesiana, ser 1, vol. 8(3), van Steenis (ed.). Sijthoff & Noordhoff, Alphen van der Rijn.
- Dougharl, J. (2006). "Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. Trop." *Pharmaceutical Research*, Vol. 5(2):597.
- Echenique, M.(1970). *Descripción, características y uso de 25 maderas tropicales mexicanas, cámara de la industria de construcción*, serie maderas de México. Biblioteca del constructor México, D.F.
- Escobar, A. (2002).*Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar*. En http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_suscep.pdf.
- Escuela superior de agricultura "Luiz de Queiroz" Universidad de são paulo.(Guaritá). Disponible en: <http://www.esalq.usp.br/trilhas/lei/lei02.htm>.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (2000). *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of*

antibacterial agents by agar dilution, Clinical Microbiology and Infection. 6 (9).DOI:

- Feitosa, G., Maltoni, L., Cassiolato, R. y Paiano, O. (2011). *Crecimiento de mudas de Gonçalo-Alves (Astronium fraxinifolium) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio*. Rev. Árvore, 35(3).
- Freixa, B., Vila, R., Vargas, L., Lozano, N., Adzet, T. y Caniguera, S.(1998). " *Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants*", Phytotherapy Research, 12(6), 427.
- FIBV-MARNR (1998). *Lista de trabajo preliminar para el nuevo catálogo de la Flora Venezolana*. FIBV-PNUD. Caracas.
- Forbes, B.; Sahm, D.; Weissfeld, A. y Trevino, E.(2009). *Baley & Scott: Diagnóstico Microbiológico* (12^a ed.).Editorial Medica Panameicana S.A. Buenos Aires- Argentina.
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C. y Solans, C. (2001). *Formation and Stability of nanoemulsions in mixed nonionic surfactant systems*. Progr. Colloid. Polym. Sci. 118:184-189.
- Frobisher, M., Hinsdill, R. y Krabtree, K.(1974). *Fundamentals of Microbiology* .Ed.W.B. Saunders Company, Philadelphia, EEUU.
- Green, R., Tocoli, E., Lee, H., Nihei, K. y Kubo, I. (2008). *Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents*. European Journal of Medicinal Chemistry,43: 1315-1320.
- Griffin, W. (1949). *Clasificación of Surface-Active Agents by HBL*. J. Soc. Cosmetic Chem., 1:311.
- González, V., Alcántar, D., Cuauhtli, M., Daza, C. y Gayosso, C. (2001). *Multiresistant extended-spectrum b-lactamase producing Klebsiella pneumoniae causing an outbreak of nosocomial blood stream infection*. Infect Control Hosp Epidemiol , 22:723-725.
- Gutiérrez, M. (2000). *Catálogo de árboles semilleros del Pacífico Seco, seleccionados por el Programa de Restauración y Silvicultura*. MINAE, Sistema de Áreas de Conservación, Guanacaste, Costa Rica.

- Hadacek, H. y Greger. (2000). "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice", *Phytochemical Analysis*, Vol. 11(3),137.
- Helman, J. (1982). *Farmacotecnia teórica y práctica tomo VII*, CIA editorial continental S.A. de C.V. Calz de Tlalpan, México D.F.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, L. (2003). *Metodología de la investigación*. Tercera edición. McGRAW-HILL/ INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V., México D.F.
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. (2006). *Metodología de la Investigación*. México: McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, L. (2010). *Metodología de la investigación*. Quinta edición. McGRAW-HILL/ INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V., México D.F.
- Hernández, V., Mora, F., Araque, M., De Montijo, S., Rojas, L., Mélenz, P. y De Tommasi, N. (2013). *Chemical composition and antibacterial activity of Astronium graveolens Jacq essential oil*. Research Institute, Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, University of the Andes , Merida, venezuela.
- Hernández, V. (2015). *Estudio fotoquímico y evaluación del potencial biológico de plantas de la reserva forestal de Caparo: Guarea guidonia L, Sleumer(Melacieae) y Astronum graveolens Jacq*. Tesis doctoral. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida – Venezuela.
- Hernandez, M.(2016). *Elaboración de una forma farmacéutica para evitar la formación de caries dentales a partir del extracto de las hojas de la planta cordoncillo nativa del centro cultural uni-shu de la comuna chiguilpe de la ciudad de santo domingo de los tsáchilas*. Trabajo especial de grado. Universidad Regional Autónoma de los Andes- UNIANDES, Facultad de ciencias medicas. Ambato-Ecuador.

- Hernandez, V., Mora, F., Malafronte, N., y De tommasi, N.(2017). *Actividad anti- inflamatoria del extracto alcoholico de Astronium graveolens* Jacq.Revista de la Facultad de Farmacia. 59 (2): 8-12. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/45134/art2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Hibbott, H (1969). *Handbook of cosmetic science*, pergamon press, London.
- Huber, O., Duno, R., Riina, F., Stauffer, L., Pappaterra, A., Jiménez, S. Llamozas y Orsini, G. (1998). *Estado actual del conocimiento de la flora venezolana*. Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales Renovables. Caracas.
- Hurtado, J. (2010). *Metodología de la investigación:Guía para la comprensión holística de la ciencia* . Tercera edición, Caracas – Venezuela.
- Iwu, R., Duncan, C. y Okunji, O.(1999) "*New antimicrobials of plant origin*", J. Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Jiménez, M. (1999). *Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica*. INBio, San José, Costa Rica.
- Johann, S., Cisalpino, S., Watanabe, A., Cota, B., Siqueira, P., Pizzolatti, G., Zani, L.; Resende, A.(2010). *Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology*,48 (4): 388-396.
- Judd, W., Campbell, E., Kellogg, P. y Stevens, F. (1999). *Plant systematics, a phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 464 p.
- Judd, W., Campbell, E., Kellogg, P. y Stevens, F. Donoghue, J.(2002). *Plant systematics, a phylogenetic approach*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Junior, F.(2001).*Tests Físico-Químicos Aplicados a Produtos Cosméticos em Estudos de Estabilidade*. *Workshop – Avaliação da Estabilidade de*

- Produtos cosméticos – Anaisdo 15a Congresso Brasileiro de Cosmetologia*. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia,
- Knowlton, J. (1993). *Emulsion theory*, Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps. Butler, H. Ed., 9th Ed. Editorial Chapman Hall, 3 (19), 534-555.
- Konan, A. y Bacchi, M. (2007). *Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (Anacardium occidentale L.) leaves*. Journal of Ethnopharmacology, 112: 237-242.
- Koné, M., Soro, D., Dro, B., Yao, K. y Kamanzi, K. (2011). *Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory properties of Lannea barteri (Anacardiaceae)*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5 (10): 1516-1523.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., Win, W. (2008). *Diagnostico Microbiológico*. 5ta Edicion. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Knödler, M., Conrad, J., Wenzig, M., Bauer, R., Lacorn, M., Beifuss, U., Schieber, A. (2008). *Antiinflammatory 5-(11`Z-heptadecenyl)- and 5-(8`Z,11`Zheptadecadienyl)- resorcinols from mango (Mangifera indica L.) peels*. Phytochemistry, 69.
- Leonardi, R. y Campos, G. (2001). *Estabilidade de Formulações Cosméticas*, International Journal of Pharmaceutical Compounding, São Paulo, 3 (4):154-156.
- Lawrence, M. (1977). *Taxonomia das Plantas Vasculares* (Trad. del inglés al portugués por M. S. Telles Antunes). Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. (2): 457-568.
- Li, P., Zhao, J., Yang, B. (2011). *Strategies for quality control of Chinese medicines*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55: 802-809.
- Liberman (1989). *Pharmaceutical Dosage Forms Disperse Systems*. Marcel Decker, USA.

- Lorenzi, H. (1998). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. (2ª ed). Nova Odessa-SP, Editora Plantarum.
- Lock, O. (1994). *Métodos de Estudio de productos Naturales*., Lima- Perú., Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú.
- Macedo, M., Ferreira, R.(2004). *Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai*, Mato Grosso. Rev. Bras. Farmacog. 44: 40-44.
- Mahmoud, S., Marques, R., Pessoa, Ó., Lotufo, C., Magalhães, F., Moraes, O., Lima, P., Tininis, G., Oliveira, E. (2011). *In vitro cytotoxic activity of Brazilian middle west plant extracts*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 21(3): 456-464.
- Márquez, D., Galeano, E., Martínez, A. (2004). *Productos naturales con actividad antimicrobiana parte II*, vitae,11: 35-41.
- Matsuo, L., Figueiredo, R., Arruda, C., Pereira, F., Scutti, B., Massaoka, H.; travassos, R., Sartorelli, P., Lago, J.(2011). *α -Pinene isolated from Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 411:449-454.
- Morais, L., Carmo, M., Viegas, E.(2000). *Evaluation of antimicrobial activity of extracts of medicinal plants on three tomato phytopathogens*. ISHR Acta Horticulturae. Disponible en En <http://actahort.org/books/569/index/htm>.
- Morles, V. (1994). *Planteamiento y análisis de investigación*. (8ª ed). Caracas: El Dorado.
- Munro, D., Stoughton, R. (1965).Arch. Dermatology.
- Muñoz, J.(1999). *Anacardiaceae*. En: Zuloaga, F.O. y O. Morrone (Eds.). Catálogo de Plantas Vasculares de la República Argentina. I. Acanthaceae-Euphorbiaceae.

- Muñoz ,V., Rojas, I., Bourdy, G., Deharo, E., Quenevo, C., Frade, C., Sauvain, M.(2004). *Actividad citotóxica de plantas medicinales usadas por el grupo étnico boliviano Tacana*. Cuadernos.49:133-145.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M.(2009). *Microbiología médica*. Sexta edición, Elsevier S.L., Barcelona, España.
- Miñana, M.(1982). *Propiedades de los Sistemas Surfactante-Agua-Aceite Emulsionados: Influencia de la Formulación Físico-Química*. Informe Técnico FIRP, N° 8201, Escuela de Ingeniería Química, U.L.A. Mérida-Venezuela.
- Miñana, M., Goncalves, E. (2011). *Aplicaciones Cosméticas y Farmacéuticas de los surfactantes*. 3ª Ed. Caracas- Venezuela.
- Miño, J., Gorzalczany, V., Moscatelli, G., Ferraro,C., Acevedo, H.(2002). Actividad antinoceptiva y antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. (“ Ceibo”). Acta Farm Bonaer.
- Nagy, M. (2012). (Comp.) *History of phytotherapy and pharmacognosy*. Disponible en http://www.chem.uwec.edu/chem491_w01/%20Pharmacognosy%20491/%20%20%20%20%20Med%20Chem%20Lectures/Lecture%20%206/HistoryofPharmacognosy.pdf>.
- Napoleão, H., Gomes, S., Lima, A., Santos, L., Sá, A., Albuquerque, C., Coelho, B., Paiva, G (2011). *Termiticidal activity of lectins from Myracrodruon urundeuva against Nasutitermes corniger and its mechanisms*. International Biodeterioration & Biodegradation. 65:52-59.
- National Committee for Clinical Laboratory (1997). "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.*17(1).
- Nobre-Júnior, V., Oliveira, A., Maia, D., Nogueira, S., Moraes, O., Bandeira, M., Andrade, M., Viana, B.(2009). *Neuroprotective effects of chalcones from Myracrodruon urundeuva on 6-hydroxydopamine-induced*

- cytotoxicity in rat mesencephalic cells*. Neurochem. Res.34 (6):1066-1075.
- Núñez, C.(2001).*Exploración del sentido de vida a través del diseño de un instrumento cuantitativo*, tesis de maestría en desarrollo humano: Universidad de Celaya.
- Olaechea, M., Insausti, J., Blanco, A. y Luque, P. (2010). *Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales*. Medicina Intensiva, 34, (4), 256-267.
- Olmo, A.(1995). *El libro blanco de la belleza*. Alianza Editorial, S. A., Madrid-España
- O. M. S. (2004). "*Recomendaciones para gobiernos y consumidores acerca del uso de la medicina tradicional, complementaria y alternativa*", J. Public Health, 16: 218.
- OMS, (2013). *Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica*, Documento Técnico N° 11.
- Orth, D.(2000). *Preservation*, Harry's Cosmetology. Rieger M.M., Ed., Eighth Edition. Chemical Publishing Co., Inc. New York-United States of America. 14: 273-304.
- Pascual, M., Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria* (2da edición). España: Ediciones Díaz de Santos S. A.
- Pell,S. (2004). *Molecular systematics of the cashew (anacardeasea)*. Louisiana state university and agricultural and mechanical collage . Louisiana USA.
- Phillips, I. (1998). *The subtitles of antibiotic resistance*. J. Antimic. Chemother.42:5-12.
- Pinto, A., Souza, A., Oliveira, F. (2010). *Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose*. Crop Prot. 29(8): 838-842.
- PROECEN (1999).*Ciruelillo (Astronium graveolens Jacq.)*. Colección de Maderas Tropicales de Honduras, Ficha Técnica No. 7.

- Ramírez, L. y Castaño, D. (2009). *Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal*. *Scientia et Technica*, año XV, (42).
- Rao, N., Vlana, S., Menezes, M., Gadelha, G.(1987). *Studies on the anti-ulcerogenic activity of Astronium urundeuva Engl. aqueous extract*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*20 (6):803-805.
- Ratheesh, M., Helen, A.(2007). *Anti-inflammatory activity of Ruta graveolens Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats*. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (10): 1209-1211.
- Rayne, S. y Mazza, G.(2007). *Biological activities of extracts from Sumac (Rhus spp.): a review*. *Plant Foods for Human Nutrition*.62:165-175.
- Resende, F., Campos, D., Da Silva, V., De Grandis, R., Souza, L., Junior, C., Da Rocha, C., Campaner, L., Vilegas, W. y Varanda, E.(2015). *Mutagenicidad y actividad quimiopreventiva de las especies de Astronium evaluado mediante prueba de Ames*. *Research Gate . Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Disponible en: <http://www.https://www.redalyc.org/pdf/579/57932293009.pdf>.
- Redo, J., Rios, A. y Villar.(1989). "A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978- 1988", *Phytotherapy Research*, Vol. 3(4):117.
- Rieger, .M.(2000). *Cosmetic Emulsification, Harry's Cosmetology*. Rieger M.M., Ed., Eighth Edition. Chemical Publishing Co., Inc. New York- United States of America.10:211-233.
- Rivas, M. (2016). *Estudio de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de Helianthus annuus L*. Trabajo especial de grado. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida – Venezuela.
- Roca, A. (2008). *Historia de los medicamentos*. (2ª edición).
- Sá, A., Napoleão, H., Santos, L., Gomes, S., Albuquerque, C., Xavier, S., Coelho, L., Bieber, W., Paiva, G.(2008). *Induction of mortality on*

- Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. International Biodeterioration & Biodegradation, 62: 460-464.
- Sá, A., Gomes, S., Napoleão, H., Santos, L., Melo, L., Gusmão, N. B., Coelho, L., Paiva, G., Bleber, W.(2009). *Antibacterial and antifungal activities of Myracrodruon urundeuva* heartwood. Wood Science and Technology, 43: 85-95.
- Sá, A., Santos, L., Silva, B., Napoleão, H., Gomes, S., Cavada, S., Coelho, B., Navarro, F., Bleber, W., Paiva, G (2009). *Larvicidal activity of lectins from Myracrodruon urundeuva on Aedes aegypti*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C,149:300-306.
- Salager, J.(2000). *Formulation Concepts for the Emulsion Maker. Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*. Chapter 2. Nielloud Françoise y Marti-Mestres Gilberte, Eds., Marcel Dekker, Inc. New York-Basel.
- Salie, F., Eagles, K. y Lens, J.(1996). "*Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species*", Ethnopharmacology, 52(1):27
- Sarkany, I., Hadgaraf, J., Brit, J. (1965) .*Dermatol.*, pag: 77-579.
- Selltiz, C., Yohada, M., Deustsch, M., Cook, S. (1980). *Método de investigación en las relaciones sociales*. Novena edición, Madrid.
- Serikava, O.(2009). *Avaliação da atividade anti-ulcerogênica, antidiarréica e antiinflamatória de Astronium fraxinifolium Schott*. 50f. Relatório (Projeto de Iniciação Científica) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu,.
- Silva, G., Saraiva, S., Silva, B., Golçalves, A., Silva, P.(2010). *Potencial alelopático de extrato etanólico de Anadenanthera macrocarpa e Astronium graveolens*. Biosci. J., 26 (4): 632-637.
- Silva, G.,Rodriguez, D., Augustus, F., Valadares, M., Neto, O., Santos, L., Silva, L.(2012). *La actividad antitumoral y citotóxica de Kielmeyera*

- coriácea* y *Pyrostegia venusta* (Kev-Gawl) extrae-Miers. J. Med Plantas res; 6:4142-4148.
- Silva, P., Folho, C., Figueredo, M., Gomez, A., De Mello, T., Goncalvez, M. (2016). *Potencial antioxidante y antitumoral de Astronium graveolens*. Revista de investigación de productos y plantas naturales. 82(1):51-538.
- Spilva, A.(1979).*Guía de especialidades farmacéuticas en Venezuela*. Edición Martínez Mujia.
- Steinberg, C. (1984). *Cosmetic Preservatives, Drug & Cosmetic Industry*. 134 (5):32-109.
- Stevens, (2001). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 9, June 2008 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Wannan.
- Souza, C., Aquino, M., Milach, Jr., Bandeira, M., Nobre, P., Viana, B.(2007). *Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae) in rodents*. Phytotherapy Research, 21: 220-225.
- ThirakuL, S. y Maldonado, S. (1998). *Manual de Dendrologfa Para 146 Especies Forestales del Litoral Atlantico de Honduras*. Segunda Edicion.Editor: Escuela Nacional de Ciencias Forestales (ESNACIFOR). La Ceiba, Atlántida, Honduras.
- USP 39, (2016). *Chapter <61> : Microbiological Examination of Nonesterile Products: Microbial enumeration tests*, Ed. 39.
- USP 39, (2016). *Chapter <62> : Microbiological Examination of Nonesterile Products: Test of Specified Microorganism*, Ed. 39.
- Vanden, B. y Vlietinck, A.(1991). "Screening for antibacterial and antiviral agents. In Hostettmann, K (Ed). " *Methods in Plant Biochemistry Assay for Bioactivity*. Academic Press, London, 6:47.
- Veillon, J. (1994). *Especies forestales autóctonas de los bosques naturales de Venezuela*. Inst. Forest. Latinoamericano. 2da Edición. Mérida.

- Velasco. R., (2001). Factores que Influyen na Estabilidade dos Produtos Cosméticos. Anais do Congresso Nacional de Cosmetologia. 15ª edição, São Paulo.
- Vernon, O., Trick, E., Welbel, F., Peterson, J., Weinstein, A.(2003). *Adherence with hand hygiene: Does number of sinks matter? Infect Control Hosp Epidemiol*; 24:224-225.
- Viana , G., Bandeira , M., Matos, F., (2003). *Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from Myracrodium urundeuva allamao*. Phytomedicine.
- Vílchez, B.(2010). *Actividad Antioxidante, Antibacteriana Y Analgésica De Extractos De Mangifera Indica L. Variedad Pica*. Biofarbo, 18(2).
- Wayne, P.(1997). *Performance standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Approved Standards M2-A6.disponible en <http://www.nccls.org/es/source/orders/free/m2-a8.pdf>.
- Wilcke, J.(1999). *Antimicrobial therapy*. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary and Medicine.Disponible en :<http://www.cpharm.Vetmed.vt.edu/vm8784/ANTOMICROBIALS/Principles.htm>
- Winter, C., Risley, E., Nuss, G.(1962). *Carrageenan induced edema in the hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 111:544-547

ANEXOS

Anexo 1: Fichas de recolección de datos: Actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico contra *Staphylococcus aureus*

 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS ESCUELA DE BIOANÁLISIS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA LABORATORIO DE VACUNAS																			
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS CREMAS																			
Bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)																			
Conformación: coco en disposición de racimo																			
Coloración Gram: Gram positivos																			
Taxonomía	Resistencia de antibióticos																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Dominio</td><td>Bacteria</td></tr> <tr><td>Filo</td><td>Firmicutes</td></tr> <tr><td>Clase</td><td>Bacilli</td></tr> <tr><td>Orden</td><td>Bacillales</td></tr> <tr><td>Familia</td><td><i>Staphylococaceae</i></td></tr> <tr><td>Genero</td><td><i>Staphylococcus</i></td></tr> <tr><td>Especie</td><td><i>Staphylococcus aureus</i></td></tr> </table>	Dominio	Bacteria	Filo	Firmicutes	Clase	Bacilli	Orden	Bacillales	Familia	<i>Staphylococaceae</i>	Genero	<i>Staphylococcus</i>	Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Meticilina, Vancomicina</td></tr> <tr><td>Nafcilina, Tetraciclina</td></tr> <tr><td>Oxacilina, Eritromicina</td></tr> </table>	Meticilina, Vancomicina	Nafcilina, Tetraciclina	Oxacilina, Eritromicina	
Dominio	Bacteria																		
Filo	Firmicutes																		
Clase	Bacilli																		
Orden	Bacillales																		
Familia	<i>Staphylococaceae</i>																		
Genero	<i>Staphylococcus</i>																		
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>																		
Meticilina, Vancomicina																			
Nafcilina, Tetraciclina																			
Oxacilina, Eritromicina																			
Prueba de sensibilidad por difusión en pozo																			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th rowspan="3" style="width: 35%;">Microorganismo</th> <th colspan="4">Zona de inhibición del pozo (mm)</th> </tr> <tr> <th colspan="3">Concentración de la crema</th> <th>Control positivo</th> </tr> <tr> <th>1%</th> <th>2%</th> <th>3%</th> <th>TE</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"> <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) </td> <td style="text-align: center;">0 mm</td> <td style="text-align: center;">0 mm</td> <td style="text-align: center;">0 mm</td> <td style="text-align: center;">10 mm</td> </tr> </table>	Microorganismo	Zona de inhibición del pozo (mm)				Concentración de la crema			Control positivo	1%	2%	3%	TE	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0 mm	0 mm	0 mm	10 mm	Observaciones:
Microorganismo		Zona de inhibición del pozo (mm)																	
		Concentración de la crema			Control positivo														
	1%	2%	3%	TE															
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0 mm	0 mm	0 mm	10 mm															

Anexo 2: Fichas de recolección de datos: Actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico contra *Escherichia coli*

 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS ESCUELA DE BIOANÁLISIS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA LABORATORIO DE VACUNAS 																		
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS CREMAS																		
Bacteria: <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) Conformación: Bacilos Coloración Gram: Gram negativos Taxonomía <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Dominio</td><td>Bacteria</td></tr> <tr><td>Filo</td><td>Proteobacteria</td></tr> <tr><td>Clase</td><td>Gammaproteobacteria</td></tr> <tr><td>Orden</td><td>Enterobacteriales</td></tr> <tr><td>Familia</td><td><i>Enterobacteriaceae</i></td></tr> <tr><td>Genero</td><td><i>Escherichia</i></td></tr> <tr><td>Especie</td><td><i>Escherichia coli</i></td></tr> </table>	Dominio	Bacteria	Filo	Proteobacteria	Clase	Gammaproteobacteria	Orden	Enterobacteriales	Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>	Genero	<i>Escherichia</i>	Especie	<i>Escherichia coli</i>	Resistencia de antibióticos <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Fosfomicina , Tobramicina</td></tr> <tr><td>Nitrofurantoina, Cefuroxima</td></tr> <tr><td>Cefixima</td></tr> </table>	Fosfomicina , Tobramicina	Nitrofurantoina, Cefuroxima	Cefixima
Dominio	Bacteria																	
Filo	Proteobacteria																	
Clase	Gammaproteobacteria																	
Orden	Enterobacteriales																	
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>																	
Genero	<i>Escherichia</i>																	
Especie	<i>Escherichia coli</i>																	
Fosfomicina , Tobramicina																		
Nitrofurantoina, Cefuroxima																		
Cefixima																		
Prueba de sensibilidad por difusión en pozo																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th rowspan="3" style="width: 35%;">Microorganismo</th><th colspan="4">Zona de inhibición del pozo (mm)</th></tr> <tr> <th colspan="3">Concentración de la crema</th><th>Control positivo</th></tr> <tr> <th>1%</th><th>2%</th><th>3%</th><th>TE</th></tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)</td><td>0 mm</td><td>0 mm</td><td>0 mm</td><td>23 mm</td></tr> </table> Observaciones:	Microorganismo	Zona de inhibición del pozo (mm)				Concentración de la crema			Control positivo	1%	2%	3%	TE	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0 mm	0 mm	0 mm	23 mm
Microorganismo		Zona de inhibición del pozo (mm)																
		Concentración de la crema			Control positivo													
	1%	2%	3%	TE														
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0 mm	0 mm	0 mm	23 mm														

Anexo 3: Fichas de recolección de datos: Actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico contra *Pseudomona aeruginosa*

 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS ESCUELA DE BIOANÁLISIS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA LABORATORIO DE VACUNAS																			
VIDA ANTIBACTERIANA DE LAS CREMAS																			
Bacteria: <i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)																			
Conformación: Bacilos																			
Coloración Gram: Gram negativos																			
Taxonomía <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Dominio</td><td>Bacteria</td></tr> <tr><td>Filo</td><td>Proteobacteria</td></tr> <tr><td>Clase</td><td>Gammaproteobacteria</td></tr> <tr><td>Orden</td><td>Pseudomonadales</td></tr> <tr><td>Familia</td><td><i>Pseudomonadaceae</i></td></tr> <tr><td>Genero</td><td><i>Pseudomonas</i></td></tr> <tr><td>Especie</td><td><i>Pseudomona aeruginosa</i></td></tr> </table>	Dominio	Bacteria	Filo	Proteobacteria	Clase	Gammaproteobacteria	Orden	Pseudomonadales	Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>	Genero	<i>Pseudomonas</i>	Especie	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Resistencia de antibióticos <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Aminopenicilinas</td></tr> <tr><td>Amoxicilina/ ac. Clavulanico</td></tr> <tr><td>Cefotaxima</td></tr> <tr><td>Cefalosporina de 1ra, 2da y 3ra generación.</td></tr> </table>	Aminopenicilinas	Amoxicilina/ ac. Clavulanico	Cefotaxima	Cefalosporina de 1ra, 2da y 3ra generación.
Dominio	Bacteria																		
Filo	Proteobacteria																		
Clase	Gammaproteobacteria																		
Orden	Pseudomonadales																		
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>																		
Genero	<i>Pseudomonas</i>																		
Especie	<i>Pseudomona aeruginosa</i>																		
Aminopenicilinas																			
Amoxicilina/ ac. Clavulanico																			
Cefotaxima																			
Cefalosporina de 1ra, 2da y 3ra generación.																			
Prueba de sensibilidad por difusión en pozo																			
Microorganismo	Zona de inhibición del pozo (mm)																		
	Concentración de la crema			Control positivo															
	1%	2%	3%	TE															
	0 mm	0 mm	0 mm	10 mm															
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)																			
Observaciones:																			

Anexo 4: Fichas de recolección de datos: Actividad antibacteriana de la forma farmacéutica de uso tópico contra *Klebsiella pneumoniae*

	UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS ESCUELA DE BIOANÁLISIS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA LABORATORIO DE VACUNAS																		
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS CREMAS																			
Bacteria: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)																			
Conformación: Bacilos																			
Coloración Gram: Gram negativos																			
Taxonomía <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Dominio</td><td>Bacteria</td></tr> <tr><td>Filo</td><td>Proteobacteria</td></tr> <tr><td>Clase</td><td>Gammaproteobacteria</td></tr> <tr><td>Orden</td><td>Enterobacteriales</td></tr> <tr><td>Familia</td><td>Enterobacteriaceae</td></tr> <tr><td>Genero</td><td><i>Klebsiella</i></td></tr> <tr><td>Especie</td><td><i>Klebsiella pneumoniae</i></td></tr> </table>		Dominio	Bacteria	Filo	Proteobacteria	Clase	Gammaproteobacteria	Orden	Enterobacteriales	Familia	Enterobacteriaceae	Genero	<i>Klebsiella</i>	Especie	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistencia de antibióticos <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Ampicilina</td></tr> <tr><td>Penicilinas</td></tr> <tr><td>Cefalosporinas</td></tr> </table>	Ampicilina	Penicilinas	Cefalosporinas
Dominio	Bacteria																		
Filo	Proteobacteria																		
Clase	Gammaproteobacteria																		
Orden	Enterobacteriales																		
Familia	Enterobacteriaceae																		
Genero	<i>Klebsiella</i>																		
Especie	<i>Klebsiella pneumoniae</i>																		
Ampicilina																			
Penicilinas																			
Cefalosporinas																			
Prueba de sensibilidad por difusión en pozo																			
Microorganismo	Zona de inhibición del pozo (mm)																		
	Concentración de la crema			Control positivo															
	1%	2%	3%	TE															
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	0 mm	0 mm	0 mm	22 mm															
Observaciones:																			

Anexo 5: Ficha de recolección de datos: Características organolépticas de las cremas.

 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS ESCUELA DE BIOANÁLISIS DEPARTAMENTO DE FARMACIA LABORATORIO DE GALÉNICA		FORMA FARMACÉUTICA							
Tipo de forma farmacéutica: crema a diferentes concentraciones 1%, 2% y 3%. Principio activo: Extracto alcohólico de <i>Astronium graveolens</i> Jacq Peso del envase (g): 20 g Peso neto de las formulaciones: Crema de <i>Astronium graveolens</i> Jacq al 1%: 57,27 g. Crema de <i>Astronium graveolens</i> Jacq al 2%: 46,93 g. Crema de <i>Astronium graveolens</i> Jacq al 3%: 46,17 g. Estabilidad a diferentes temperaturas: Temperatura ambiente (medio ambiente): ☒ Estable ☐ No estable Temperatura de 45°C (Estufa): ☒ Estable ☐ No estable									
Características de la forma farmacéutica tópica									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="padding: 5px;">Características organolépticas</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Color: Marrón</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Olor: Característico</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Aspecto: Homogéneo</td> </tr> </table>		Características organolépticas	Color: Marrón	Olor: Característico	Aspecto: Homogéneo	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="padding: 5px;">Características físico químicas</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">PH: 5.5 – 6.</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Estado de presentación: semisólido</td> </tr> </table>	Características físico químicas	PH: 5.5 – 6.	Estado de presentación: semisólido
Características organolépticas									
Color: Marrón									
Olor: Característico									
Aspecto: Homogéneo									
Características físico químicas									
PH: 5.5 – 6.									
Estado de presentación: semisólido									
Observaciones:									