

PASANTÍA EMPRESARIAL EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA VEGETAL *LABFARVE*

BRAYAN ANDRÉS HERRERA ARCINIEGAS

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS AMBIENTAL, CIVIL Y QUÍMICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA



PAMPLONA - 2019

PASANTÍA EMPRESARIAL EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA VEGETAL *LABFARVE*

BRAYAN ANDRÉS HERRERA ARCINIEGAS

PROYECTO DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

Dirigido por:

JACQUELINE CORREDOR ACUÑA
IQ. Ph.D M.Sc Ingeniería

ROLDAN EGBERTO DÍAZ CASTRO
Químico Farmacéutico

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS AMBIENTAL, CIVIL Y QUÍMICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA



PAMPLONA - 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis padres (Sandra Esmeralda Arciniegas Granados y Jorge Eliecer Herrera Carrillo), por ser los mejores y quienes han sido un excelente apoyo siempre, a la Fundación Laboratorio de Farmacología Vegetal LABFARVE, por brindarme la posibilidad de realizar la pasantía, al Programa de Ingeniería Química de la Universidad de Pamplona, por permitir mi formación académica y otorgarme las herramientas y conocimientos para ser un excelente profesional.

A mi tutora en la Universidad, la profe Jacqueline Corredor Acuña, por brindarme el apoyo, y a todos los profes de la carrera por sus gratas enseñanzas.

A mi tutor en el laboratorio, el Dr. Roldan Diaz, por sus excelentes consejos y enseñanzas, al Dr. Miguel Pombo y al Dr. Oscar, por apoyarme y orientarme de la mejor manera en cromatografía, a la señora Bianed, a las Dras. Alba y Leidy, a Don Javier, y a cada una de las personas que laboran en esta gran empresa por aportarme sus experiencias y compartir muy buenos momentos.

RESUMEN

En este trabajo de pasantía empresarial (*1 de abril al 31 de julio*), se apoyó al laboratorio LABFARVE en dos proyectos muy importantes. Primero, en la cuantificación de quercetina en el extracto de *Caléndula Officinalis* L. (por ser el extracto de mayor rotación), mediante la técnica de análisis instrumental de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), fijando la fase móvil (polar), con ácido fosfórico al 0,08% A, y metanol B, un volumen de inyección de 5 µL, un flujo de 1 mL/min, una temperatura de 35°C, y la utilización de un gradiente para la elución óptima del pico de quercetina, donde se obtuvo una concentración de 5,2180 µg/mL del marcador en el extracto. Segundo, se realizó un diseño preliminar de un percolador, a través del software SolidWorks, realizando la transferencia del proceso actual, que es un proceso estático, a un proceso dinámico, que podrá optimizar el tiempo de extracción; simulando finalmente, el funcionamiento de las variables propuestas para este diseño. También, se realizó una rotación por las diferentes áreas que integran el laboratorio, desarrollando actividades que allí realizan, y adquiriendo habilidades y destrezas relacionadas con la organización y funcionamiento de los laboratorios de farmacología, aplicando y complementando los conocimientos adquiridos durante la formación académica.

PALABRAS CLAVE: Industria Farmacéutica, *Caléndula Officinalis* L., Diseño, HPLC.

ABSTRACT

In this business internship work (April 1 to July 31), LABFARVE laboratory was supported in two very important projects. First, in the quantification of quercetin in the extract of *Calendula Officinalis* L. (as it is the extract with the highest rotation), by means of the technique of instrumental analysis of high performance liquid chromatography (HPLC), setting the phase mobile (polar), with phosphoric acid 0.08% A, and methanol B, an injection volume of 5 µL, a flow of 1 mL/min, a temperature of 35 °C, and the use of a gradient for optimal elution of the quercetin peak, where a concentration of 5,2180 µg/mL of the marker in the extract was obtained. Second, a preliminary design of a brewer was made, through SolidWorks software, transferring the current process, which is a static process, to a dynamic process, which can optimize the extraction time; finally simulating the operation of the proposed variables for this design. Also, there was a rotation through the different areas that make up the laboratory, developing activities they perform there, and acquiring skills and skills related to the organization and operation of pharmacology laboratories, applying and complementing the knowledge acquired during academic training.

KEY WORKS: Pharmaceutical Industry, *Calendula Officinalis* L., Design, HPLC.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	IV
Palabras Clave.....	IV
Abstract.....	IV
Key Works	IV
Anexos	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tablas	X
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción	2
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivo General.....	3
1.4 Objetivos Específicos.....	4
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Descripción de las Características de la Empresa.....	6
2.2 Misión	6
2.3 Visión.....	6
2.4 Reseña Histórica	6
2.5 <i>Caléndula Officinalis</i> L.....	8
2.6 Clasificación Taxonómica	10
2.7 Metabolitos Primarios y Secundarios	10
2.8 Flavonoides Glicósidos y Agliconas.....	11
2.9 Actividades Terapéuticas	13
2.10 Toxicidad	14
2.11 Métodos de Extracción	14
2.11.1 Percolación.....	15
2.11.2 Maceración.....	15
2.11.3 Decocción	16
2.11.4 Infusión	16
2.11.5 Digestión	16
2.12 Tipos de Extractos.....	16
2.12.1 Tinturas	17
2.12.2 Extractos Fluidos	17
2.12.3 Extractos Secos	17
2.12.4 Extractos Blandos	18
2.12.5 Crioextractos	18
2.13 Preparaciones a Base de <i>Caléndula Officinalis</i> L.....	18

2.14 Formas Farmacéuticas	18
2.15 Marco Legal	19
2.15.1 Normas Farmacológicas para Preparaciones a Base de <i>C. Officinalis</i> L.....	19
2.15.2 Informe Técnico (#32) de la OMS (Organización Mundial de la Salud)	19
2.15.3 Norma ISO 14644	20
2.15.4 Norma ISO 17025	21
2.15.5 Norma ISO 22716.....	22
Capítulo 3. ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PASANTÍA	23
3.1 Descripción de Actividades	24
3.1.1 Actividad 1. Inducción.....	24
3.1.2 Actividad 2. Investigación a cerca de Cuantificación de Quercetina en el Extracto de Caléndula	24
3.1.3 Actividad 3. Producción.....	24
3.1.4 Actividad 4. Jefatura de Planta	25
3.1.5 Actividad 5. Control de Calidad	25
Capítulo 4. CUANTIFICACIÓN DE QUERCETINA EN EL EXTRACTO	26
4.1 Principios Activos en la <i>Caléndula Officinalis</i> L.	27
4.2 Cromatografía en Capa Delgada.....	28
4.2.1 Perfil Cromatográfico Planta Pulverizada de Caléndula	28
4.2.2 Perfil Cromatográfico Tintura 1:5 de Caléndula	28
4.2.3 Perfil Cromatográfico Extracto Fresco 1:1 de Caléndula	28
4.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	29
4.3.1 Instrumentación del HPLC	31
4.4 Metodología	32
4.4.1 Materiales.....	35
4.4.2 Equipos	35
4.4.3 Reactivos.....	35
4.5 Desarrollo del Sistema Cromatográfico.....	36
4.5.1 Preparación de la Fase Móvil.....	36
4.5.2 Preparación de las Soluciones.....	36
4.6 Metodología de Hidrolisis.....	37
4.7 Sistema Cromatográfico Óptimo para la Elución de Quercetina.....	38
4.8 Curva de Calibración	39
Capítulo 5. DISEÑO PRELIMINAR DEL PERCOLADOR.....	42
5.1 Proceso de Extracción Actual	43
5.1.1 Metilparabeno	44
5.1.2 Propilparabeno	45
5.2 Puntos Críticos	47
5.3 SolidWorks	47
5.4 Metodología	47

5.5 Resultados	51
5.5.1 Balances de Materia	55
5.5.2 Balance de Energía en la Chaqueta.....	58
Capítulo 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
6.1 Conclusiones	61
6.2 Recomendaciones	62
Capítulo 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7.1 Lista de Referencias	64

ANEXOS

Anexos 1. Cámaras Cromatográficas para la CCD.	71
Anexos 2. Apertura de los Tamices Utilizados para la Granulometría.	72
Anexos 3. Placa Cromatográfica de la Planta Pulverizada de Caléndula.	72
Anexos 4. Placa Cromatográfica de la Tintura de Caléndula.	73
Anexos 5. Placa Cromatográfica del Extracto Fresco de Caléndula.	74
Anexos 6. Cromatografía del Extracto de Caléndula.	75
Anexos 7. Cromatógrafo JASCO EXTREMA.	76
Anexos 8. Rellenos de Columnas (USP 40, NF 35).	77
Anexos 9. Desgasificación de los Solvente con Ultrasonido.	77
Anexos 10. Sistema de Filtración por Membrana 0,45 μm para Solventes.	78
Anexos 11. Hidrolisis Acida del Extracto Hidroalcohólico de C. Officinalis.	79
Anexos 12. Fraccionamiento Liquido – Liquido del Extracto de C. Officinalis con Éter Etílico.	80
Anexos 13. Rotaevaporador para la Concentración y Purificación de la Quercetina.	81
Anexos 14. Cromatogramas de las Soluciones Patrón para la Curva de Calibración.	82
Anexos 15. Datos Obtenidos para la Curva de Calibración.	82
Anexos 16. Datos de la Regresión y Suavidad de la Curva, obtenidos del Software GraphPadPrism.	83
Anexos 17. Cromatogramas del Extracto de Caléndula a Diferentes Longitudes de Onda CH8 = 370 nm “Optima”.	84
Anexos 18. Cromatogramas del Extracto de Caléndula Hidrolizado a Diferentes Longitudes de Onda CH8 = 370 nm “Optima”.	84
Anexos 19. Medidas Recipiente Interno [mm].	85
Anexos 20. Medidas Recipiente Externo en [mm].	86
Anexos 21. Estructura de una Célula Vegetal.	87
Anexos 22. Trazo Final en Papel del Diseño del Percolador.	88
Anexos 23. Pruebas de Laboratorio para Diseño Experimental.	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caléndula officinalis L. (Figura tomada de Köhler's Medizinal-Pflanzen, vol.I, 1887).	9
Figura 2. Estructura General de Flavonoides (* Posiciones Hidroxiladas).	11
Figura 3. Estructura de los diferentes grupos de flavonoides. Isoflavonas 2, flavonoles 3, flavononas 4, flavonas 5, catequinas 6 y antocianinas 7.	12
Figura 4. Estructura de flavonoides presentes en Caléndula officinalis. Glicósidos de isorhamnetina 8a: 8b=narcisina; 8c=isorhamnetin-3-O-rutinosilrhamnosido; 8d=isorhamnetin-3-O-glucósido; 8e=isorhamnetin-3-O-glucosilclucósido. Glicósidos de quercetina 9a: 9b=rutina; 9c=isoquercitrina; 9d=hiperósido; 9e=quercetin-3-Orutinosilrhamnosido (adaptado de Bilia, A.R., et al.,2002).	12
Figura 5. Placa Cromatográfica.	29
Figura 6. Esquema de Componentes Básicos de un HPLC (Orrego. N., et al. 2016).	31
Figura 7. Estructura de Identificación de la Quercetina.	34
Figura 8. Curva de Calibración Suavizada.	40
Figura 9. Cromatogramas del Extracto de Caléndula.	41
Figura 10. Proceso de Extracción Actual de Plantas en Labfarve.	44
Figura 11. Etapas de Lixiviación.	54
Figura 12. Lixiviación en Una Sola Etapa.	55
Figura 13. Diagrama de Bloques del Diseño del Percolador.	56
Figura 14. Vista Isométrica del Diseño del Percolador.	57
Figura 15. Vista Superior del Diseño del Percolador.	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la C. Officinalis L.....	10
Tabla 2. Principales Metabolitos Primarios y Secundaros.....	11
Tabla 3. Ventajas y Desventajas de los Procesos de Extracción más Utilizados.....	16
Tabla 4. Listado de Planta y Preparaciones Aceptadas por el INVIMA para el año 2019.....	19
Tabla 5. Extracción de las Diferentes Partes de la Caléndula.....	27
Tabla 6. Metabolitos de la Extracción de Toda la Planta de Caléndula.....	27
Tabla 7. Condiciones Óptimas para la Hidrolisis Acida del Extracto.	38
Tabla 8. Sistema Cromatográfico Optimo para la Elución de Quercetina en el Extracto.....	39
Tabla 9. Gradiente Utilizado para la Optima Elución de Quercetina en el Extracto.	39
Tabla 10. Pasos y Variables del Proceso Actual en Labfarve.....	45
Tabla 11. Pasos y Variables de las Propuestas de Mejora del Proceso de Extracción.....	48
Tabla 12. Ventajas y Observaciones de las Propuestas de Mejora con Respecto al Proceso Actual.....	49
Tabla 13. Dimensiones del Percolador.	52

1.

Introducción y Objetivos

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas por miles de años para el tratamiento de las diferentes afecciones del cuerpo humano. Con el transcurso de los años, las plantas medicinales han ganado una gran importancia en el sector medicinal. Actualmente, se trabaja en la automatización de los procesos de extracción de los principios activos (quienes son los que dan la acción terapéutica), para producir las diferentes formas farmacéuticas conocidas (sólidas, líquidas, semisólidas, etc.), y así ofrecer productos de excelente calidad que ayuden al tratamiento de las diferentes enfermedades que afectan al organismo (Rawat, P et al., 2016; Jiménez, N et al., 2015; Caballero, K et al., 2014).

Se reporta que hay alrededor de 250000 especies de plantas medicinales en el mundo, y en Colombia, se reportan unas 6000 plantas aromáticas y medicinales nativas, de las cuales únicamente se ha industrializado aproximadamente el 1% (Leaman. D, et al., 2017; Jaric. S, et al., 2006; Cragg. G, et al., 1997).

En este trabajo, se integraron los análisis hechos por pasantes anteriores, donde se realizó un diseño preliminar de un percolador, en función de las siguientes variables: agitación, que propuso la compañera María Alejandra Villamizar, y una centrifugación final del bagazo, que propuso el compañero Daniel Galeano, para obtener un mayor rendimiento del proceso, con la adición de nuevas variables. Temperatura, a través de una chaqueta de calentamiento con aislamiento térmico para evitar pérdidas de energía, que probablemente aumente la solubilidad del solvente con respecto a la sustancia activa de interés (que en este caso se analizó la quercetina), aunque cabe resaltar que para trabajos futuros se deba analizar la influencia de esta variable con respecto a metabolitos termolábiles, una recirculación del líquido, para garantizar la máxima extracción posible de metabolitos con este solvente al 36% de alcohol, y una hermeticidad, que me evite perdidas de grado alcohólico.

JUSTIFICACIÓN

Desde el pasado 6 de abril de 2019 comenzó a regir en Colombia el decreto No. **1156** del 2018 que dicta los lineamientos de autorización de comercialización de productos Fito terapéuticos, y en el cual se define que las sustancias activas de dichos productos corresponden a aquellas que tienen una actividad terapéutica definida, es decir a los extractos, fracciones o compuestos puros obtenidos de las especies vegetales. Estos deben ser normalizadas en su preparación a través de *extractos estandarizados*, indicando:

- ✓ Solvente.
- ✓ Método de extracción.
- ✓ Marcadores de identificación y cuantificación.

Para lo cual, se debe disponer de métodos analíticos adecuados que los cuantifiquen. En los casos en que no se puedan identificar las sustancias activas, se puede considerar que todo el material de la planta medicinal, parte de esta o su preparación constituye la sustancia activa. El cual, reitera lo establecido en el decreto N.º **2266** del 15 de julio del 2004, donde se define también, que *“para el caso de los productos Fito terapéuticos cuyas sustancias activas hayan sido identificadas, se debe normalizar su preparación si se dispone de métodos analíticos adecuados que los cuantifiquen. En los casos en que no se puedan identificar las sustancias activas, se puede considerar que todo el material de la planta medicinal o su preparación constituyen la sustancia activa”*.

Que en comparación con el decreto N.º **677** del 26 de abril de 1995, por quien se reglamenta parcialmente el régimen de registros y licencias, el control de calidad, así como el régimen de vigilancia sanitaria de medicamentos, cosméticos, preparaciones farmacéuticas a base de recursos naturales, productos de aseo, higiene y limpieza y otros productos de uso doméstico, se establece que se debe indicar solamente el solvente utilizado y la proporción entre el peso del material y el volumen del solvente utilizado. Si el solvente es etanol, debe figurar su porcentaje.

Por lo tanto, se hace necesaria la cuantificación de los extractos (en este trabajo específico, *extracto de caléndula*), que garanticen una medida más real, indicando la presencia efectiva de las sustancias con acción terapéutica presentes en las diferentes formas farmacéuticas, ya que en el laboratorio solo se lleva a cabo control de análisis cualitativo, con cromatografía en capa delgada (CCD).

También se pretende un aumento de la producción del laboratorio, con el proyecto en marcha de la reconstrucción del área de magistrales, por lo cual, se hace necesario el diseño de un equipo que pueda optimizar el tiempo de extracción de las sustancias activas de interés presentes en las plantas.

OBJETIVO GENERAL

Aplicar y complementar los conocimientos adquiridos durante la formación académica en la industria fitoterapéutica y fitocosmética, apoyando al laboratorio a través de las actividades asignadas en el cronograma de pasantía, que conllevaran a la mejora de los procesos de extracción, análisis fisicoquímicos, diseño de equipos y optimización de tiempos, desde el punto de vista de la ingeniería química.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Conocer los procesos de extracción de sustancias activas, y los procesos empleados para la elaboración de los medicamentos (fitoterapéuticos, fitocosméticos y esencias florales), fabricados por el laboratorio Labfarve.
- ✓ Ejecutar actividades relacionadas con el control fisicoquímico de los insumos (extractos vegetales), en el lapso de la pasantía.
- ✓ Cuantificar la quercetina como marcador en el extracto de *Caléndula Officinalis* L., la cual es una de las sustancias activas responsables de dar la acción terapéutica a los productos.
- ✓ Realizar un diseño preliminar de un percolador que pueda optimizar el tiempo de extracción, realizando una transferencia del proceso actual estático, a un proceso dinámico, con la adición de temperatura y recirculación.

2.

Marco Teórico

DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA EMPRESA

La empresa, es un laboratorio de farmacología, en donde se elaboran productos fitoterapéuticos, fitocosméticos y esencias flores, todos con la base de extractos de plantas colombianas con propiedades medicinales. Ubicado en la carrera 111 No. 157-45 Bogotá D.C.

MISIÓN

Mejorar el estado de salud y bienestar de las personas, mediante el consumo de preparaciones farmacéuticas, seguras y eficaces, elaboradas con base en ingredientes naturales que han sido investigados, desarrollados y producidos con los más altos estándares de calidad y con criterios de bio-comercio.

VISIÓN

En el 2020, ser líderes en fitoterapéuticos por nuestra investigación, calidad y sentido social en Colombia y Ecuador, y ser la industria colombiana preferida para la maquila de fitoterapéuticos para uso humano, generando bienestar para la comunidad y consolidándose como una organización prospera y en expansión que se reconoce por su impacto social y su significativo aporte al bio-comercio.

RESEÑA HISTÓRICA

El laboratorio de farmacología vegetal e investigaciones asociadas (Labfarve), fue fundado por el Doctor Jorge Piñeros Corpas en el año 1984, después de ser, por varios años, una unidad de investigación de la fundación clínica hospital Juan N. Corpas.

El Dr. Piñeros Corpas conformó un grupo multidisciplinario de profesionales que se dedicaron a la investigación y el desarrollo de preparaciones farmacéuticas, principalmente a base de plantas medicinales colombianas, que reforzaran y complementaran el ejercicio de la medicina familiar, con enfoque social, por medio del uso de la terapéutica alternativa y la farmacología vegetal, para beneficio de la salud de la población colombiana.

Las razones para la fundación de Labfarve fueron principalmente las siguientes:

1. Colombia es el segundo país en biodiversidad del mundo, con más de sesenta mil especies vegetales, de las cuales, cerca del 10% son medicinales.
2. El empleo de preparaciones farmacéuticas a base de plantas medicinales reduce significativamente la ocurrencia de efectos secundarios, mientras que se reduce sustancialmente la posibilidad de toxicidad.

3. Los costos de los medicamentos de síntesis química son cada vez mayores, mientras que los de los extractos vegetales impactan positivamente el precio final para el sistema de salud, siendo el paciente el principal beneficiado.
4. El médico en Colombia debe tender a ampliar sus posibilidades terapéuticas con el uso de preparaciones farmacéuticas de origen vegetal, científicamente desarrolladas. Reconociendo las bondades de las plantas medicinales colombianas, Labfarve, con el apoyo de la unidad de terapéuticas alternativas de la clínica Corpas y del centro de investigaciones de la fundación universitaria Juan N. Corpas, configuró un grupo de investigación multidisciplinario, reconocido por Colciencias, en el que participan médicos, químicos farmacéuticos, ingenieros químicos, ingenieros industriales, agrónomos, microbiólogos, biólogos y botánicos, y cuenta en la actualidad con un equipo cercano a los ciento cincuenta funcionarios que despliegan actividades de investigación y desarrollo, cultivo, procesamiento, control de calidad, análisis químico y microbiológico y estudios clínicos y toxicológicos de extractos vegetales de la más alta calidad, además de los funcionarios que desarrollan actividades del orden administrativo.

Labfarve ha trabajado de la mano de la academia, realizando convenios de investigación con otras organizaciones de orden científico y ha desarrollado proyectos en alianza con diferentes universidades. También ha trabajado de la mano de algunas comunidades indígenas a quienes asesora y de quienes recibe retroalimentación, así como de las comunidades de campesinos a quienes acompaña en asuntos agroindustriales.

Labfarve fue pionero y ha sido líder en la investigación y el desarrollo de extractos de plantas medicinales y cuenta con la certificación de cumplimiento de buenas prácticas de manufactura (BPM), además de contar con el certificado ecológico que garantiza las buenas prácticas agrícolas de sus cultivos de plantas medicinales y ha sido reconocido como miembro de la UEBT, entidad internacional que promueve el bio-comercio ético. LABFARVE tiene un exclusivo proceso de producción para la elaboración de sus productos, estrictos controles de calidad y estudios de estabilidad y toxicidad que determinan su seguridad y eficacia, que inician desde la recepción de las plantas medicinales en estado natural, hasta llegar al producto terminado.

De hecho, Labfarve ha sido un referente permanente de entidades científicas del orden Nacional e Internacional. Así mismo, cuenta con autorización para la comercialización de sus productos en los Estados Unidos, con aprobación de la FDA y en otros países, en los cuales actualmente tiene presencia institucional.

Hoy con más de 30 años en el mercado, Labfarve realiza investigaciones conjuntas con la fundación universitaria Juan N. Corpas en Bogotá – Colombia, contribuyendo significativamente en la conformación de grupos multidisciplinarios de profesionales en el

área de la investigación y la aplicabilidad de la flora medicinal colombiana; de esta manera enriquece los múltiples programas de medicina familiar y social en la Corpas.

Labfarve ha sido un pionero con logros palpables para el crecimiento de la industria naturista del país. De cara al futuro, el potencial investigativo y de desarrollo de LABFARVE partirá siempre de la premisa de realizar investigaciones sobre plantas medicinales promisorias, que estén al servicio de la salud de millones de personas.

Caléndula Officinalis L.

La *Caléndula officinalis* L., es una planta perteneciente a la familia Asteráceae, nativa de la región mediterránea, pero que se extendió a Europa y América. La palabra “Caléndula” deriva del latín “caléndulae” (calendario), que designa el primer día de cada mes (Ulbritch, et al., 2006). La caléndula (llamada así comúnmente), ha sido ampliamente utilizada desde hace tiempo con fines terapéuticos, pues se le atribuyen diversas propiedades a los extractos y tinturas realizadas principalmente a partir de sus flores (Duke, J.A., et al. 2002; EMEA, 2008). Entre las propiedades reportadas para el extracto de flores de caléndula se tiene actividad antimicrobiana (Attard, A, et al. 2009; Radioza, S.A., et al. 2007; Roopashree, T.S, et al., 2008), antiinflamatoria (Amoian, B., et al. 2010; Chandran, P.K., et al. 2009; Ukiya, M., et al., 2006), inmunomoduladora (Attard, A., et al. 2009), cicatrizante (Preethi, K.C., et al. 2009; Leach, M.J., 2008), antioxidante (Ćetković, G.S., et al., 2004; Fonseca, Y.M, et al., 2010), entre otros. En la figura 1, se observan las diferentes partes de la caléndula:



Figura 1. *Caléndula officinalis* L. (Figura tomada de Köhler's Medizinal-Pflanzen, vol.I, 1887).

Entre los principales compuestos presentes en las flores de caléndula se encuentran saponinas triterpénicas, principalmente glicósidos del ácido oleanólico, alcoholes triterpénicos libres y esterificados, especialmente 3-monoesteres del faradiol, carotenoides, polisacáridos, esteroides, sesquiterpenoides, aceites esenciales y flavonoides basados en quercetina, isorhamnetina y kaempferol (ESCOP MONOGRAPHS, 2003; WHO Monographs, 2002).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

En la siguiente tabla 1, se observa la clasificación taxonómica de la caléndula (Ortiz, J.M, et al., 2011):

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la *C. Officinalis L.*

Reino	<i>Plantae</i>	(Vegetal)
Subreino	<i>Tracheobionta</i>	(Plantas Vasculares)
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>	(Plantas con Semillas)
División	<i>Magnoliophyta</i>	(Plantas con Flores)
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	(Plantas Dicotiledóneas)
Subclase	<i>Asteridae</i>	-
Orden	<i>Asterales</i>	-
Familia	<i>Asteráceae</i>	-
Genero	<i>Caléndula L.</i>	-
Especie	<i>Caléndula Officinalis L.</i>	-

METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Las especies vegetales poseen diversos componentes en su estructura, los cuales sin lugar a duda son importantes para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de las plantas. Estos componentes son de diversa naturaleza química, por lo que se les clasifica en dos grandes grupos: orgánicos e inorgánicos (Carrión, A., et al, 2010).

Los componentes inorgánicos más importantes son el agua y los minerales. El agua, se encuentra en cantidad variable de acuerdo con la especie y a la parte de la planta así, “las hojas y los tallos contienen más cantidad de agua, hasta un 80% en algunos casos, mientras que las semillas contienen menos cantidad” (Kuklinski, et al., 2000).

Los minerales pueden presentarse en diversas formas, como sales solubilizadas (cloruros, nitratos, fosfatos, etc.), sales cristalizadas (carbonato cálcico, oxalato cálcico, etc.); además, se encuentran los oligoelementos (magnesio, hierro, manganeso, flúor, etc.). Los minerales se encuentran combinados con las sustancias orgánicas dentro de las especies vegetales (Carrión, A., et al, 2010).

Dentro de los componentes orgánicos, podemos citar tanto a los metabolitos básicos o primarios relacionados con el metabolismo esencial celular y los metabolitos secundarios que no están necesariamente relacionados con el metabolismo esencial, pero son en su

mayoría responsables de la actividad terapéutica de las drogas vegetales (Carrión, A., et al, 2010), los más importantes se observan en la tabla 2:

Tabla 2. Principales Metabolitos Primarios y Secundaros.

COMPUESTOS PROCEDENTES DEL METABOLISMO PRIMARIO	COMPUESTOS PROCEDENTES DEL METABOLISMO SECUNDARIO
Glúcidos	Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos
Lípidos y Grasas	
Aminoácidos	
Proteínas	Derivados Fenólicos: fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides, antocianinas
Ácidos Nucleicos	
Compuestos Nitrogenados (glucósidos cianogenéticos, enzimas)	
	Alcaloides

En este caso, se estudiaron los metabolitos secundarios, ya que la quercetina, que es la sustancia de interés, se encuentra dentro de los flavonoides.

FLAVONOIDES GLICÓSIDOS Y AGLICONAS

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios de gran importancia, pues se encuentran en la mayoría de los vegetales superiores en mayor o menor grado. Su estructura se compone de tres anillos, en donde el anillo A proviene de la ruta del acetato, el anillo B proviene de la ruta del shikimato y el anillo C se origina por adición nucleofílica de Michael del grupo OH en posición 1, a la cetona α, β insaturada (Marcano, D., et al. 2002). En la figura 2, se observa la estructura general del grupo de metabolitos flavonoides:

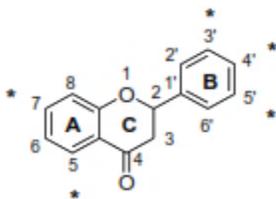


Figura 2. Estructura General de Flavonoides (* Posiciones Hidroxiladas).

Los flavonoides pueden dividirse en diferentes categorías, de acuerdo con sus estructuras, las cuales conllevan a distintas propiedades biológicas. En la figura 3, se observan las diferentes estructuras del grupo de los flavonoides (numeradas del 2 al 7), los cuales pueden encontrarse en su forma glicosilada en la posición "3" (flavonoides glicósidos), o pueden

encontrarse en su forma libre (agliconas). La hidrólisis del enlace glicosídico da como resultado la obtención de la aglicona respectiva (Marcano, D., et al. 2002):

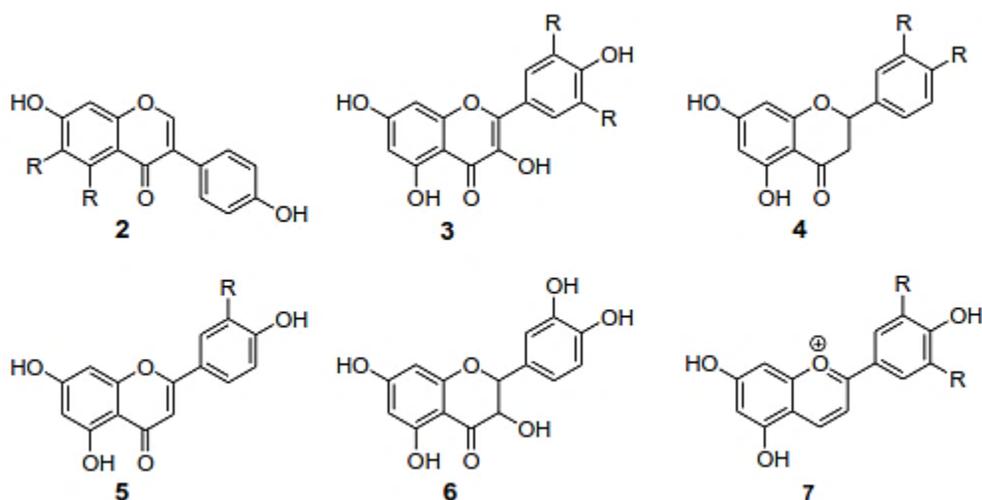


Figura 3. Estructura de los diferentes grupos de flavonoides. Isoflavonas 2, flavonoles 3, flavononas 4, flavonas 5, catequinas 6 y antocianinas 7.

En la *Caléndula Officinalis* L., se encuentran principalmente estructuras de tipo flavonoles (#3 en la figura 3), siendo los glicósidos de isorhamnetina 8b-e (*narcisina e isorhamnetina*) y quercetina 9b-e (*rutina y quercetina*), los de mayor proporción. En la figura 4, se observan las estructuras de estos flavonoides:

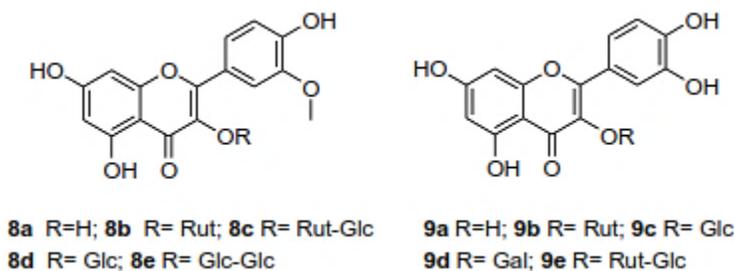


Figura 4. Estructura de flavonoides presentes en *Caléndula officinalis*. Glicósidos de isorhamnetina 8a: 8b=narcisina; 8c=isorhamnetin-3-O-rutinosilrhamnosido; 8d=isorhamnetin-3-O-glucósido; 8e=isorhamnetin-3-O-glucosilclucósido. Glicósidos de quercetina 9a: 9b=rutina; 9c=isoquercitrina; 9d=hiperósido; 9e=quercetin-3-O-rutinosilrhamnosido (adaptado de Bilia, A.R., et al.,2002).

ACTIVIDADES TERAPÉUTICAS

La caléndula tiene diversas actividades terapéuticas, pero dentro de las más utilizadas se encuentran la actividad antiinflamatoria y la cicatrizante. Estudios previos han demostrado la actividad antiinflamatoria de la caléndula, corroborando así el uso tradicional de esta planta para tal fin. Son diversos los compuestos relacionados con dicha actividad, entre los que están los monoésteres de faradiol, siendo el faradiol en su forma libre el de mayor actividad, obteniéndose resultados comparables con la Indometacina, en dosis equimolares. Sin embargo, dada la prevalencia en el contenido del faradiol esterificado, puede estar más relacionado con esta actividad (Zitterl-Eglseer, K., et al., 1997). Por otro lado, los flavonoides glicósidos de las agliconas isorhamnetina 8a y quercetina 9a (*figura 4*) aislados de *C. Officinalis* L. también contribuyen a la acción antiinflamatoria, pues se ha demostrado la inhibición de la lipoxigenasa a nivel in vitro, la cual se encuentra relacionada con la formación de leucotrienos durante el proceso inflamatorio (EMEA, 2008; Bezakova, L., et al., 1996).

Por otro lado, la actividad cicatrizante adjudicada a esta planta ha sido objeto de diversos estudios. Por ejemplo, por medio del ensayo CAM (Chick Chorioallantoic Membrane) se han detectado altos niveles de ácido hialurónico (compuesto relacionado en los procesos de cicatrización) en áreas de neovascularización, al trabajar el extracto acuoso seco de hojas de caléndula, relacionándose este comportamiento con la presencia de flavonoides, por inhibición de la actividad de la hialuronidasa (Patrick, K.F., et al., 1996).

Por su parte, Matysik (2005) y colaboradores, realizaron un ensayo bioguiado con el fin de obtener la fracción del extracto de las flores de caléndula que estimulara la proliferación de un cultivo celular de fibroblastos de piel humana (HSF, Human Skin Fibroblast), encontrando que la fracción de acetato de etilo (polaridad media), estimulaba su proliferación, al mismo tiempo que mantenía los mejores niveles de viabilidad a las concentraciones trabajadas (en comparación con los otros extractos). Esta fracción era rica principalmente en triterpenos como ácido oleanólico, β -amirina y acetato de β amirina, seguida de flavonoides glicósidos de isorhamnetina, quercetina, isoquercitrina y ácidos fenólicos como caféico, vainílico, clorogénico, p-cumárico, y siríngico.

Adicionalmente, se han realizaron pruebas in vitro para evaluar la recuperación de quemaduras térmicas en piel de rata y el posible mecanismo de acción, tras la administración oral de diferentes dosis del extracto de flores de *C. Officinalis*. Con lo anterior, se observa un aumento de la hexosamina y la hidroxiprolina en el tejido granular, lo que muestra la efectividad del extracto en aumentar el contenido de colágeno en el tejido expuesto a la quemadura, ya sea por aumento de su síntesis o disminución del catabolismo, en donde la presencia de flavonoides en el extracto juega un papel importante (Chandran, P.K., et al., 2008).

TOXICIDAD

Las flores de caléndula aparecen clasificadas dentro de los alimentos seguros, haciendo parte de los alimentos dietarios (FDA, 20139). Dentro de la monografía de la European Medicines Agency (EMA) para la *Caléndula Officinalis* L., se encuentran revisiones sobre toxicidad aguda, subcrónica, mutagenicidad y carcinogenicidad. Para la toxicidad subcrónica se tienen resultados de LD50 intravenoso para extractos acuosos e hidroalcohólicos (1:1, 30% etanol) de 375 mg/Kg de ratón y 526 mg/100g de ratón.

Incluso, no se manifiestan signos de toxicidad en ratones ni ratas cuando el extracto hidroalcohólico se administra oralmente en dosis superiores a 5 g/Kg de peso (Silva, E.J., et al., 2007). De igual manera, no se observan señales de toxicidad cuando se realizan ensayos de toxicidad subcrónica a 18 y 21 meses en ratones (EMA, 2008).

En cuanto a la genotoxicidad y mutagenicidad, se usó el test de Ames para determinar la concentración de un extracto hidroalcohólico (1:1, 60% etanol) que no conlleven a mutagenicidad. En las pruebas realizadas con *Salmonella typhimurium* no se observó mutagenicidad entre 50 y 5000 µg/plato, mientras que las pruebas con *Aspergillus nidulans* exhibieron toxicidad en el rango de concentraciones de 5 platos desde 0.1 a 1.0 mg de sólidos/mL ensayado. Sin embargo, los resultados no fueron confirmados por el modelo in vivo usando el test de micronúcleos, lo cual puede explicarse principalmente a los perfiles del proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción (Ramos, A., et al., 1998).

Los datos colectados son respaldados por estudios más recientes de toxicidad crónica y subcrónica, en donde se evalúa la toxicidad del extracto seco de *C. officinalis* (extracción acuosa) y se establece que el Non Observed Adverse Effects Level (NOAEL) para el extracto seco es de 2000 mg/Kg de ratón y el ensayo de toxicidad subcrónica establece que el Lowest Observed Effect Level (LOEL) es de 50 mg/Kg/día en ratas (Lagarto, A., et al., 2011).

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal, se debe tener en cuenta, que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dichas plantas, los cuales necesitan de un líquido extractivo (Solvente) que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo (Carrión, A., et al., 2010).

A continuación, se citarán los métodos de extracción más importantes:

Percolación:

Es el método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana, USP. Es un método que consiste en que el menstruo (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de menstruo acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva (Selles, et al., 1992). Este tipo de extracción se realiza en recipientes (*percoladores*) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una buena extracción de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el menstruo y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. “La percolación es el método extractivo menos adecuado en el caso de gran gelificación o si las drogas son muy voluminosas” (Voigt, et al., 1982) Cabe recalcar que previo a la extracción es necesario humectar la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del menstruo en las membranas celulares durante la percolación.

Maceración:

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el menstruo, constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el menstruo actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular (Selles, et al., 1992). Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. A partir de este método no se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento” (Voigt, et al., 1982). En la tabla 3, se muestran algunas ventajas y desventajas entre los procedimientos de extracción (percolación y maceración) más utilizados dentro de la fitoquímica:

Tabla 3. Ventajas y Desventajas de los Procesos de Extracción más Utilizados.

VENTAJAS		DESVENTAJAS	
PERCOLACIÓN	MACERACIÓN	PERCOLACIÓN	MACERACIÓN
Extracción completa de principios activos y es posible conocer la concentración exacta de los mismos	Sirve para drogas rígidas (tallos y raíces)	Alto consumo de solvente	Lentitud del proceso
No se produce saturación del solvente y se requiere menor tiempo para la extracción comparado con la maceración	Reducción de costos de solvente		Extracción incompleta de la droga
			Saturación del solvente

Decocción:

Llamada también cocimiento, este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de droga más menstroo a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos (Selles, et al., 1992).

Infusión:

Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5% (Carrión, A., et al., 2010), que, en diferencia con la decocción, en la infusión se trabaja durante menos tiempo, y se prepara a un porcentaje más bajo.

Digestión:

“Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60°C” (Selles, et al., 1992). Al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos. Adicionalmente a esto, aumenta la solubilidad de las drogas con el solvente.

TIPOS DE EXTRACTOS

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos,

secos, blandos y los crioextractos (Carrión, A., et al., 2010). También, se subdividen según su relación inicial de droga/solvente:

Tinturas:

Cuando se trabajan tinturas, se utiliza una relación 1:5 de la droga con respecto al solvente, y es la maceración alcohólica de una planta previamente hidratada. Esta, es la clase de extracto que más se prepara en el laboratorio Labfarve para producir, y tiene la ventaja de que, al desecarse la planta, se inactivan todos los procesos de transformación química que normalmente se producen en el seno del agua. Por lo tanto, las sustancias químicas que contiene la planta, cualquiera que sea su grado de actividad, son mucho más estables.

La planta fresca puede secarse al aire seco y circulante, preferiblemente al abrigo de la luz directa del sol. Puede también deshidratarse al calor (30 a 60°C), siempre y cuando haya un escape adecuado del agua de vaporización.

Cuando la planta está seca, se pone en contacto con alcohol de 70° en proporción de 20 partes de la planta por 100 de alcohol. Se agita con alguna frecuencia para hacer más íntima la mezcla y se filtra a los ocho días; finalmente el producto debe guardarse en frasco oscuro y ponerse al abrigo de la luz directa (Piñeros-Corpas. J, et al., 1992).

Extractos Fluidos:

Los extractos fluidos son extractos de drogas que, con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación (Voigt, et al., 1982).

Extractos Secos:

Los extractos secos son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5% (Voigt, 1982). Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua. Actualmente es posible obtener extractos secos nebulizados que son más estables que los tradicionales, por ser menos higroscópicos.

Extractos Blandos:

Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan (Carrión, A., et al., 2010).

Crioextractos:

Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que, dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70°C (Castillo, et al., 2007). Los crioextractos resultan muy caros, pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies.

PREPARACIONES A BASE DE *Caléndula Officinalis* L.

Actualmente en el laboratorio Labfarve, la caléndula es considerada la planta por excelencia, ya que, a partir del extracto de esta sola planta, es con la que más productos se producen, en total 6 productos:

- Crema de Caléndula x 60g = Actividades Antiinflamatoria y Cicatrizante.
- Soluciones Orales (360 y 60 mL) = Antiinflamatorias.
- Gotas de Caléndula x 60 mL (extracto puro) = Antiinflamatorias.
- Baños Locales x 360 mL = Antiinflamatorios y Cicatrizantes.
- Capsulas de Caléndula x 500 mg = Antiinflamatorias.
- Crema Pañalitis (110 y 60 g) = Protectora, Antiinflamatoria y Cicatrizante.

FORMAS FARMACÉUTICAS

Las formas farmacéuticas son las disposiciones de los productos obtenidos a partir de un proceso, para constituir un medicamento facilitando la dosificación, administración y liberación de este. Según la USP 40 - NF 35 (Farmacopea de los Estados Unidos de América), las formas farmacéuticas son aerosoles, capsulas, cremas, emulsiones, espumas, gases, geles, gránulos, gomas, implantes, inyecciones, insertos, líquidos, lociones, tabletas de disolución bucal, ungüentos, pastas, pellets, píldoras, emplastos, polvos, jabones, champús, soluciones, tiras, supositorios, suspensiones, cintas adhesivas (García, P, et al., 2010).

MARCO LEGAL

Normas Farmacológicas para Preparaciones a Base de *C. Officinalis* L.:

Antes de la comercialización de un producto fitoterapéutico dentro del mercado colombiano, éste debe haber sido contemplado dentro de las Normas Farmacológicas Colombianas, en donde el interesado expone ante la entidad regulatoria la información que considere pertinente para demostrar que el producto final, tiene soporte de eficacia. Posteriormente, un nuevo interesado puede sustentar la comercialización de su producto, si este tipo de preparación se encuentra ya registrada en las normas farmacológicas.

Para el caso de la *Caléndula Officinalis* L., el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), aprobó para el año actual 2019, según el decreto 1156 de 2018, las preparaciones herbarias que se observan en la tabla 4:

Tabla 4. Listado de Planta y Preparaciones Aceptadas por el INVIMA para el año 2019.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	DRUGA	PREPARACIONES HERBARIAS*
<i>Caléndula officinalis</i> L.	Caléndula	flores	a) Uso interno (vía oral) 1) TABLETA: Flores de Caléndula officinalis L. - Flores) 539 mg. (Acta 33 de 1998) 2) EXTRACTO: Cada mL contiene el equivalente a 0,2 g de Caléndula flores (Acta 33 de 1998/ Acta 01 de 1999). 3) POLVO: Caléndula flores 100%; (Acta 34 de 1998). 4) TABLETA: Caléndula flores 500 mg. (Acta 01 de 1999) 5) ELIXIR: Cada 100 mL contiene Extracto equivalente a 2,5 g de flores de caléndula (Acta 05 de 1999). 6) CÁPSULA: Caléndula flores 300 mg (Acta 15 de 2003). 7) SOLUCIÓN ORAL: Extracto seco de flores de Caléndula (equivalente a 62,5 mg de flavonoides) 2,5%. (Acta 27 de 2004). 8) ELIXIR: Cada 100 mL contiene extracto equivalente a 5 g de flores pulverizadas de caléndula (Acta 27 de 2004). 9) CÁPSULA: Polvo de flores de Caléndula 500 mg. (Acta 04 de 2005). JARABE: Cada 100 mL contiene extracto 1:1 de flores de caléndula en alcohol de 36%; 10 mL. (Acta 14 de 2005). 10) SOLUCIÓN ORAL: Cada mL de solución contiene 0,025 g de flores pulverizadas de Caléndula. (Acta 23 de 2005). 11) SOLUCIÓN ORAL (JARABE): Cada 100 mL contiene 25 mL de extracto fluido de flores de caléndula en etanol de 36% v/v. (Acta 37 de 2005). 12) SOLUCIÓN ORAL (JARABE): Cada 100 mL contiene Extracto 1:1 de flores de caléndula en alcohol de 36% v/v. 16 mL. (Acta 22 de 2006). 13) SOLUCIÓN ORAL (JARABE): Cada 100 mL: Extracto fluido de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) (1:1,2) 25 mL. (Acta 04 de 2007). 14) SOLUCIÓN ORAL: Cada 100 mL contiene 20 mL de extracto fluido de flores de caléndula (1:1 en etanol de 20 G.L.) (Acta 06 de 2010). 15) CÁPSULA: Cada cápsula contiene: extracto 1:1 de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) en alcohol al 36%; 1,5 mL. (Acta 07 de 2011). 16) SOLUCIÓN ORAL: Cada 120 mL contiene extracto 1:1 de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) en etanol 50%; 24 ml (Acta 06 de 2016). 17) SOLUCIÓN ORAL: Cada 100 ml contiene extracto fluido 1:1 de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) 20 g (Acta 06 de 2016). 18) SOLUCIÓN ORAL: Cada 100 ml contiene extracto fluido 1:1 de flores pulverizadas de caléndula (Caléndula officinalis L.) en etanol al 20%; 20 g (Acta 06 de 2016). 19) SOLUCIÓN ORAL: Cada 100 ml contiene extracto fluido 1:1 de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) 25 g (Acta 06 de 2016). 20) SOLUCIÓN ORAL (JARABE): Cada 100 ml contiene caléndula (Caléndula officinalis L.) flores deshidratadas en polvo 20 g (Acta 06 de 2016). 21) TABLETA: Cada tableta contiene extracto seco 3:1 de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) 150 mg (Acta 06 de 2016). 22) SOLUCIÓN ORAL: Cada 100 ml contiene extracto fluido 1:1 de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) 25 ml (Acta 06 de 2016). 23) SOLUCIÓN ORAL (JARABE): Cada 100 ml contiene flores pulverizadas de caléndula (Caléndula officinalis L.) 2,5 g (Acta 06 de 2016). 24) SOLUCIÓN ORAL: Cada 100 ml contiene extracto fluido de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) 1:1 en etanol al 36%; 25 ml (Acta 06 de 2016). 25) SUSPENSIÓN ORAL: Cada 100 ml contiene extracto de flores de caléndula (Caléndula officinalis L.) 1:1 en alcohol al 36%; 25 ml (Acta 06 de 2016).

Informe Técnico (#32) de la OMS (Organización Mundial de la Salud):

Este informe presenta las recomendaciones de un grupo internacional de expertos convocado por la Organización Mundial de la Salud para que examine diversos asuntos relativos a la garantía de la calidad de los productos farmacéuticos y las especificaciones aplicables a sustancias y formas farmacéuticas.

Siendo de especial interés para los servicios nacionales de reglamentación farmacéutica, el informe contiene recomendaciones sobre las prácticas adecuadas de fabricación de productos farmacéuticos, y pautas provisionarias para la inspección de los fabricantes de productos farmacéuticos y para la aplicación del Sistema OMS de Certificación de la Calidad de los Productos Farmacéuticos Objeto de Comercio Internacional. Se examinan

diversos temas relacionados con el progreso de la Farmacopea Internacional, como también cuestiones vinculadas a la estabilidad de las formas farmacéuticas, a las preparaciones extemporáneas, y a la capacitación de funcionarios encargados de la reglamentación farmacéutica. Se incluyen asimismo pautas para garantizar la calidad de los productos farmacéuticos fabricados por tecnología recombinante del ADN, y acerca de la comprobación de los procedimientos analíticos, como también listas de Sustancias Químicas Internacionales de Referencia y Espectros Infrarrojos Internacionales de Referencia.

Norma ISO 14644:

La ISO 14644 es una de las normas más importantes en el entorno farmacéutico, y es la única norma técnica a la que se hace una referencia directa en la reglamentación oficial. En la versión actual del Anexo 1 de las cGMP EU, cuando se habla de clasificación de salas limpias y dispositivos de aire limpio, se la cita explícitamente como norma de referencia. La largamente esperada versión final de la norma ISO 14644, sobre clasificación de limpieza de aire por concentración de partículas para salas limpias, finalmente se ha editado. Esta norma es decisiva y debe utilizarse para clasificar las salas limpias que se utilizan en la fabricación de productos farmacéuticos. Contiene las tablas de clasificación de limpieza de las salas y los límites máximos de partículas permitidos, además de instrucciones claras sobre cómo realizar las mediciones de cantidad de partículas en el aire.

La revisión de esta norma se inició en 2007 y se han ido publicando diferentes borradores en 2011, 2012 y 2014, pero ninguno de ellos pudo alcanzar el estatus de versión final, por lo que, durante todo este tiempo, la versión aplicable era la de 1999.

La Organización Internacional de Normalización (ISO) el 15 de diciembre de 2015 publicó la nueva edición de ISO 14644:

- ISO 14644-1: 2015 "Salas limpias y entornos controlados asociados Parte 1: Clasificación de la limpieza del aire por concentración de partículas". Reemplaza ISO 14644-1: 1999.
- ISO 14644-2: 2015 "Salas limpias y entornos controlados asociados Parte 2: Monitoreo para proporcionar evidencia del desempeño de la sala limpia relacionado con la limpieza del aire por concentración de partículas". Reemplaza ISO 14644-2: 2000.

Estos son los principales cambios que incluye:

1. El número de puntos de medición ya no se calcula más por pulgadas cuadradas de superficie.
2. Las partículas de 5 µm de ISO 5 ya no están en la tabla de valores límites.
3. No se realizan más cálculos estadísticos de UCL. Ya no es necesario realizar una observación en todos los puntos de medición de la sala limpia. Cada punto se considera de forma individual y debe cumplir con el valor límite.
4. La longitud del tubo del contador de partículas debe ser menor a 1 metro.
5. La clasificación numérica, los volúmenes de muestras, los períodos de medición y los criterios de cancelación se mantienen sin cambios frente a la versión anterior.

Norma ISO 17025:

La norma ISO 17025 hace parte de la normatividad internacional en el campo de la actividad técnica, llevada a cabo por la Organización Internacional de Normalización (ISO), la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) y otras organizaciones internacionales vinculadas a la ISO e IEC, que conforman el Comité de ISO para la evaluación de la conformidad (CASCO). La norma ISO 17025 contiene los requisitos a cumplir por los laboratorios de ensayo y de calibración para demostrar un sistema de gestión, la competitividad técnica y la capacidad de generar resultados técnicamente válidos. Esta normatividad cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio (NTC-ISO/IEC 17025, 2005).

La normatividad de esta manera cubre un amplio campo de temas, que implican el acogimiento y cumplimiento de diferentes requerimientos, que se dividen en dos: Requerimientos relativos a la gestión y requerimientos técnicos.

Dentro de los requerimientos relativos a la gestión se consignan diferentes temas relacionados con la organización, sistema de gestión, control de documentos, servicio al cliente, acciones correctivas y preventivas, auditorías internas entre otros.

En la subdivisión de requerimientos técnicos se tratan los temas o factores que de una u otra forma determina la exactitud y la confiabilidad de los ensayos. De acuerdo con esto, los requerimientos de la normatividad se centran en:

- Factores humanos.
- Instalaciones y condiciones ambientales.
- Métodos de ensayo y de calibración, y la validación de los métodos.
- Equipos.
- Trazabilidad de las mediciones.
- Muestreo.

- Manipulación de los ítems de ensayo y de calibración.

Para la determinación de la incertidumbre de las mediciones, la norma ISO 17025 no es estricta sobre el procedimiento para su evaluación, pero especifica que se debe tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable de ésta, siendo posible su determinación por medio de los datos de validación del método para su evaluación (NTC-ISO/IEC 17025, 2005).

Norma ISO 22716:

La Norma UNE - EN ISO 22716 Productos Cosméticos. Guía de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), proporciona pautas de actuación para el control de los procesos de producción, almacenamiento y expedición de productos cosméticos. La implantación de esta Norma es de carácter voluntario, no obstante, conlleva dos ventajas fundamentales, que hacen recomendable su implantación: legales (Reglamento 1223/2009, Real Decreto 1599/1997).

3.

Actividades Realizadas Durante la Pasantía

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

A continuación, se describen las 5 actividades realizadas durante el transcurso de la pasantía empresarial en el laboratorio, donde se aplicaron y se complementaron los conocimientos adquiridos durante la formación académica:

ACTIVIDAD 1. Inducción (01/04/2019 - 05/04/2019):

En esta actividad, se realizó un recorrido por la empresa de manera general, y se revisó la literatura acerca de la normatividad que rige a los laboratorios de farmacología, para estar en sintonía con la empresa y seguir las buenas prácticas de laboratorio (BPL).

ACTIVIDAD 2. Investigación a cerca de Cuantificación de Quercetina en el Extracto de Caléndula (08/04/2019 - 17/05/2019):

En esta actividad, se realizó un análisis bibliográfico sobre cromatografía líquida de alta resolución HPLC, y su aplicación para la cuantificación de metabolitos secundarios en extractos. La fundación cuenta con un equipo de cromatografía de la marca JASCO EXTREMA, que tiene una columna CO-4061 C18 (apolar), por lo cual, se debe trabajar en fase reversa. Para la cuantificación de quercetina (que es el metabolito de los 125 presentes, con mayores actividades) en el extracto de *Caléndula Officinalis* L., se definió una fase móvil polar compuesta por dos componentes: metanol grado HPLC y ácido fosfórico al 0.08% (diluido en agua grado HPLC), en función de lo reportado en la USP y en los diferentes paper's encontrados para la cuantificación de este marcador en los extractos de caléndula.

ACTIVIDAD 3. Producción (20/05/2019 - 07/06/2019):

Se hicieron varios recorridos por las áreas de producción del laboratorio, desde la fabricación y el envasado, hasta el área de acondicionamiento (codificado, etiquetado, termo encogido, revisión y embalaje) de los productos antes de salir al mercado, en donde se observó que todos los procesos son todavía manuales, rescatando lo que quería el fundador de dar oportunidades de empleo.

En la producción, los extractos tienen diferentes fases, por ejemplo, cuando se preparan soluciones orales, se envasa directamente el extracto; cuando se producen capsulas, se evapora el extracto y luego se mezcla con almidón que le da la consistencia sólida para luego ser molido y encapsulado. Cabe resaltar que no todos los extractos se mezclan con almidón, en el caso de la balsamina, se mezcla con oxido de magnesio, debido a que cuando se mezcla con almidón, se forman moléculas de glucosa, lo cual afectaría a las personas con problemas de diabetes, este producto es denominado *Glunat*.

En el caso de la fabricación de cremas, el extracto se lleva a una marmita en compañía de otras materias primas, como, por ejemplo, ácido esteárico, aceite mineral, bórax, esencia (*aroma*), propilenglicol, trietanolamina (da consistencia y viscosidad), carboximetil celulosa, anolina, agua y otros.

ACTIVIDAD 4. Jefatura de Planta (10/06/2019 - 21/06/2019):

Actualmente, el laboratorio está en remodelación del área de magistrales, y se espera un aumento en la producción para un mediano plazo, por lo cual, la jefatura de planta tiene planeado elaborar un proyecto de diseño de un percolador que sea capaz de optimizar el tiempo de extracción. En esta actividad, se realizó un diseño preliminar de un percolador, realizando una transferencia del proceso actual estático, a un proceso dinámico, e integrando los trabajos de pasantes anteriores. Implementando calentamiento a través de una chaqueta de calentamiento con aislamiento, una recirculación y hermeticidad como nuevas variables, utilizando como herramienta de apoyo, el software SolidWorks, ya que el laboratorio cuenta con su respectiva licencia.

ACTIVIDAD 5. Control de Calidad (06/2019 - 19/07/2019):

En esta actividad, se observó y se realizó algunos de los análisis fisicoquímicos que se le hacen a los extractos y a los productos antes de salir al mercado, como, por ejemplo, cromatografía en capa delgada (*anexo 1*), que es el análisis que se hace para identificar la presencia efectiva de los metabolitos de interés (para la caléndula se analiza la rutina, que es un flavonoide), y granulometría, a través de los tamices STANDARD NTC A.S.T.M. E-11-87 (*anexo 2*), donde se define un tamaño de 841 μm para la caléndula, con la cual se realiza la extracción. También, se realizan análisis organolépticos: apariencia, olor y color, fisicoquímicos: pH (solución al 10%) con un pH metro AZ meter 86501, materia extraña (%), cenizas totales (utilizando una balanza METTLER AJ150, y una mufla Thermolyne de Thermo SCIENTIFIC), cenizas insolubles en HCl y extracto soluble en agua; además, de los análisis microbiológicos: aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras, todos en Unidades Formadoras Colonias/g, salmonella spp (ausencia/presencia en 10g).

4.

Cuantificación de Quercetina en el Extracto

PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA *Caléndula Officinalis* L.

Se ha reportado que la caléndula tiene 125 metabolitos secundarios, los cuales se extraen de todas las partes de las plantas. En la tabla 5, se observa la cantidad de metabolitos secundarios extraíbles de cada parte de la planta, y el número de actividades (terapéuticas y cosméticas) reportadas hasta el momento (de las cuales la actividad antiinflamatoria y la cicatrizante son las de interés). En la tabla 6, se observan los metabolitos extraíbles cuando se trabaja con toda la planta (parte aérea, como es el caso del laboratorio, y en donde se observa que la quercetina es el bioquímico que más actividades tiene (*Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, online*):

Tabla 5. Extracción de las Diferentes Partes de la Caléndula.

<i>Caléndula Officinalis</i> L.			
PARTE	METABOLITOS	ACTIVIDADES	METABOLITOS CON ACTIVIDAD
Flores	73	314	26
Hojas	4	87	4
Planta	28	242	8
Raíz	3	26	2
Semillas	10	44	6
Brote	1	-	-
Brote de Plántula	6	-	-
Todas las Partes	125	471	46

Tabla 6. Metabolitos de la Extracción de Toda la Planta de Caléndula.

PLANTA	
METABOLITO	ACTIVIDADES
Acido Cafeico	102
Kaempferol	75
Ácido Láurico	7
Acido P-Coumarico	25
Quercetina	176
Rubixantin	1
Ácido Salicílico	34
Violaxantin	2

CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

Actualmente, el análisis que se realiza en el laboratorio para la identificación de los metabolitos en los extractos, es la cromatografía en capa delgada (CCD), que es una técnica cromatográfica de separación de compuestos según polaridades, en donde la fase estacionaria utilizada es una placa de sílica gel (polar), con detección de luz ultravioleta a 365 nm y finalmente se calcula el R_f , que es la relación de la distancia recorrida por la muestra, sobre, la distancia recorrida por la fase móvil, como se observa en la figura 5 (Wagner. H, Blandt. S, et al., 1996):

Perfil Cromatográfico Planta Pulverizada de Caléndula (*anexo 3*):

- Patrón: Rutina al 0.05% en metanol.
- Rango aceptación: (R_f 0.40 – 0.60).
- Método de Extracción: 1g de muestra se disuelve en 10 mL de metanol, se somete a calentamiento 60°C por 5 minutos, se filtra y 6 μ L son utilizados para la siembra cromatográfica.
- Fase Móvil: Acetato de Etilo – Acido Fórmico – Ácido Acético Glacial – Agua (100:11:11:26).
- Revelador: Natural Products-Polietilenglicol (NP/PEG), Luz UV a 365 nm.

Perfil Cromatográfico Tintura 1:5 de Caléndula (*anexo 4*):

- Patrón: Rutina al 0.05% en metanol.
- Rango aceptación: (R_f 0.40 – 0.60).
- Método de Extracción: 2 mL de muestra se disuelve en 10 mL de metanol, se somete a calentamiento 60°C por 5 minutos, y 6 μ L son utilizados para la siembra cromatográfica.
- Fase Móvil: Acetato de Etilo – Acido Fórmico – Ácido Acético Glacial – Agua (100:11:11:26).
- Revelador: Natural Products-Polietilenglicol (NP/PEG), Luz UV a 365 nm.

Perfil Cromatográfico Extracto Fresco 1:1 de Caléndula (*anexo 5*):

- Patrón: Rutina al 0.05% en metanol.
- Rango aceptación: (R_f 0.40 – 0.60).
- Método de Extracción: 2 mL de muestra se disuelve en 10 mL de metanol, se somete a calentamiento 60°C por 5 minutos, y 6 μ L son utilizados para la siembra cromatográfica.

- Fase Móvil: Acetato de Etilo – Acido Fórmico – Ácido Acético Glacial – Agua (100:11:11:26).
- Revelador: Natural Products-Polietilenglicol (NP/PEG), Luz UV a 365 nm.

$$R_f = \frac{\text{Distancia Recorrida por el Producto}}{\text{Distancia Recorrida por la Fase Movil}}$$

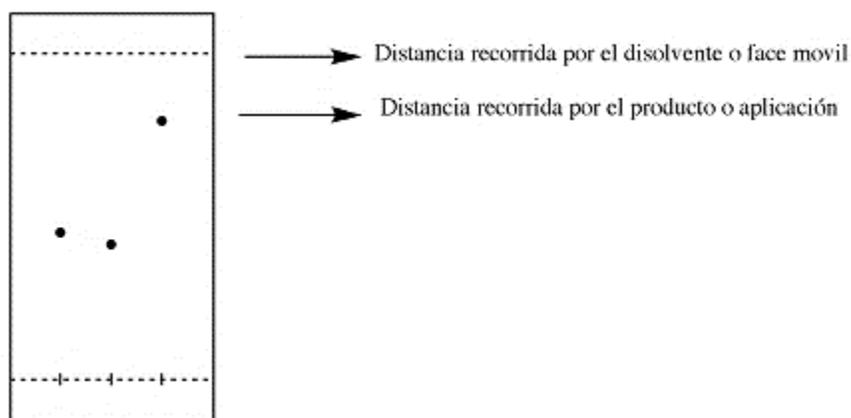


Figura 5. Placa Cromatográfica.

CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía es un método de separación física en el cual, los componentes se distribuyen en dos fases inmiscibles: una fase móvil, que fluye a lo largo de una fase estacionaria (*anexo 6*). En el caso de la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que recorre la fase estacionaria (un sólido o un líquido adherido a un sólido). Las dos fases se escogen de tal forma que los compuestos de la muestra se distribuyan de distinto modo entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente por el flujo de la fase móvil, permitiendo a los compuestos separarse según esta movilidad en bandas y poder ser analizados cualitativa o cuantitativamente (Skood, et al., 1992). El HPLC es una clase de cromatografía líquida en la que la separación se produce entre una fase móvil (el solvente) y una fase estacionaria (la columna). Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria la separación se puede dar de 4 maneras diferentes:

1. Cromatografía de adsorción: se basa en la magnitud de la interacción de los distintos componentes de la muestra con la fase sólida (fenómeno de adsorción).
2. Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria es un sólido capaz de intercambiar iones con la fase móvil.
3. Cromatografía de afinidad: la separación se da por una interacción específica entre el analito y la columna.
4. Cromatografía de exclusión molecular: la separación se produce por el tamaño molecular, de tal manera que la fase estacionaria está formada por un material lleno de poros con tamaños predeterminados.

La cromatografía de adsorción es la más utilizada. Se distinguen dos modelos según la polaridad de las fases utilizadas:

- a. **Fase Normal:** la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. De este modo los compuestos polares son fuertemente retenidos por la columna, dejando a los compuestos no polares eluir primero.
- b. **Fase Reversa:** la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. En este caso, los compuestos no polares son fuertemente retenidos por la columna, dejando a los compuestos polares eluir primero (mayor tiempo de retención para los compuestos apolares). Este tipo de fase es la más utilizada en la actualidad, ya que, la mayor parte de los compuestos de interés son de naturaleza hidrofílica. Normalmente, se usan como fase estacionaria hidrocarburos como C8 (n-octilo) o C18 (n-octadecilo).

La elución de los compuestos depende, por tanto, de la polaridad de la fase móvil, y esta puede mantenerse constante a lo largo de todo el proceso cromatográfico (*elución isocrática*), o variar a lo largo del método (*elución a gradiente*) (Belanger, et al., 1997).

En el caso de los compuestos fenólicos es frecuente utilizar cromatografía de adsorción en fase reversa a gradiente. La columna de separación que se utiliza mayoritariamente es una columna C-18 de sílica gel, de una longitud entre 100 y 300 mm y con un diámetro interno de entre 2 – 4.6 mm, aunque ocasionalmente se puede usar columna C8. Se aconseja que la columna se mantenga a una temperatura de 40°C durante el análisis. Mantener la temperatura constante durante el análisis es importante para obtener tiempos de retención reproducibles y una mejor resolución de los picos. Además, permite reducir la presión de la columna a altas velocidades de flujo. La elección de un método a gradiente es esencial para la buena separación estructural de las diferentes moléculas. Normalmente se usa un solvente A (agua acidificada o buffer acuoso) y un solvente B, que puede ser un solvente orgánico como metanol o acetonitrilo, puro o acidificado. El volumen de inyección puede variar de 1 a 100 µL, dependiendo del diámetro interno de la columna (Lamuela-Raventos, et al., 2014).

INSTRUMENTACIÓN DEL HPLC

La fundación cuenta con un equipo HPLC JASCO EXTREMA (*anexo 7*), que consta de los siguientes componentes, como se observa en la figura 6:

- ✓ Un sistema de suministro y almacenamiento de la fase móvil (en reservorios).
- ✓ Un sistema de bombeo (este equipo cuenta con una bomba cuaternaria PU - 4180).
- ✓ Un sistema de inyección de la muestra (auto muestreador AS - 4150).
- ✓ Una columna (CO - 4061 LC Column 100 x 4,6 mm), el equipo cuenta con una pre columna, que protege a la columna (*apolar*).
- ✓ Un detector (MD - 4010), en nuestro caso un detector de arreglo de fotodiodos PDA UV - vis.
- ✓ Un sistema de adquisición de datos (LC - NetII/ACD).

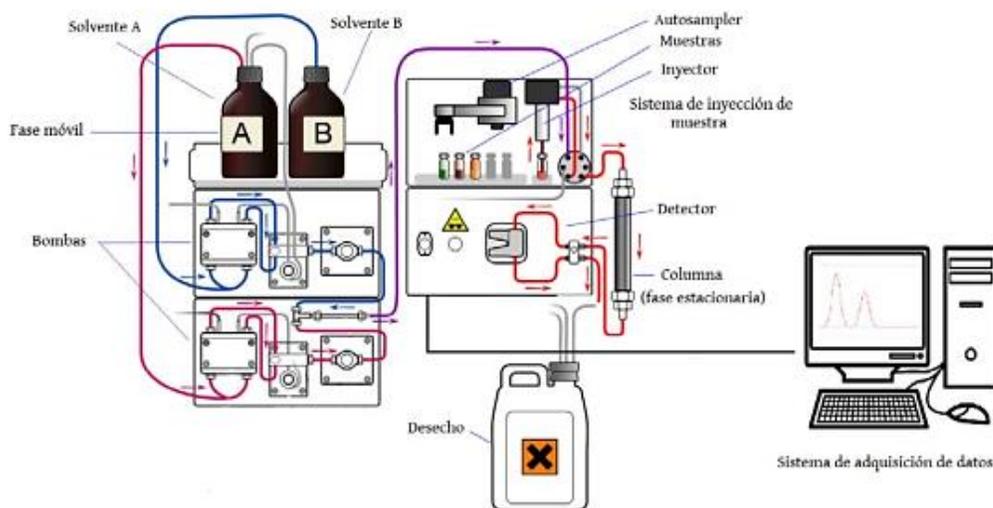


Figura 6. Esquema de Componentes Básicos de un HPLC (Orrego. N., et al. 2016).

Los compuestos fenólicos, debido a la existencia de dobles enlaces conjugados y compuestos aromáticos, exhiben absorbancia en la región UV-Vis, a diferentes longitudes de onda. Los flavonoides tienen dos bandas de absorción características: la primera entre 240 y 285 nm de longitud de onda, correspondiente al anillo A, y la segunda banda tiene su máximo en un rango de 300 a 550 nm, la cual se atribuye a la sustitución o conjugación del anillo C. Con respecto a los flavonoides, cada subclase presenta absorciones características, por ejemplo, las flavonas y los flavonoles (quercetina) presentan bandas

intensas a 280 – 350 nm y las flavononas (naringenina) a 280 – 290 nm (Abad-Garcia, et al., 2009; Sakakibara, et al., 2003).

METODOLOGÍA

Inicialmente, se planteó una metodología cromatográfica según lo descrito en la USP 40 NF 35 para la cuantificación de quercetina a través de HPLC, en donde se define que la quercetina contiene no menos de 98,0% y no más de 102,0% de quercetina (C₁₅H₁₀O₇), calculado con respecto a la sustancia anhidra.

El procedimiento descrito es el siguiente:

- **Fase Móvil:** Metanol, agua y ácido fosfórico (100:100:1).
- **Solución de Aptitud del Sistema:** 0,02 mg/mL de ER Quercetina USP, de ER Kampferol USP y de ER Isorhamnetina USP en metanol.
- **Solución Estándar:** Transferir 10 mg de ER Quercetina USP a un matraz volumétrico de 50 mL y agregar 20 mL de metanol para disolver. Agregar 20 mL de agua, mezclar y diluir con metanol a volumen.
- **Solución Muestra:** Transferir 10 mg de Quercetina a un matraz volumétrico de 50 mL y agregar 20 mL de metanol para disolver. Agregar 20 mL de agua, mezclar y diluir con metanol a volumen.

Sistema cromatográfico:

- Modo: HPLC.
- Detector: UV 370 nm.
- Columna: 4,6 mm x 25 cm; relleno L1 (*anexo 8*).
- Velocidad de flujo: 1,0 mL/min.
- Volumen de inyección: 20 µL.

Procedimiento:

1. Equilibrar la columna y el detector con fase móvil a la velocidad de flujo especificada hasta obtener una señal constante.
2. Inyectar una muestra a través del inyector o usar un muestreador automático.
3. Comenzar el programa de gradientes.
4. Registrar el cronograma.
5. Analizar según se indica en la monografía.

Aptitud del Sistema:

- **Muestras:** Solución de aptitud del sistema y Solución estándar.

(NOTA - Los tiempos de retención relativos para quercetina, kaempferol e isorhamnetina son 1,0; 1,8 y 2,0, respectivamente).

Requisitos de Aptitud:

- Resolución: No menos de 1,5 entre kaempferol e isorhamnetina, Solución de aptitud del sistema.
- Eficiencia de la columna: No menos de 2000 platos teóricos.
- Desviación estándar relativa: No más de 2,0%, Solución estándar.

Análisis:

- Muestras: Solución estándar y Solución muestra

Calcular el porcentaje de Quercetina en la porción de Muestra tomada:

$$\text{Resultado} = \left(\frac{r_u}{r_s} \right) * \left(\frac{C_s}{C_u} \right) * 100$$

Donde:

- r_u = respuesta del pico de la Solución muestra.
- r_s = respuesta del pico de la Solución estándar.
- C_s = concentración de ER Quercetina USP en la Solución estándar (mg / mL).
- C_u = concentración de Quercetina en la Solución muestra (mg / mL).

Pero para poder adaptar esta metodología (que sería lo ideal), se deben seguir los procedimientos e implementar los mismos reactivos. En vista de que la columna con la que cuenta la fundación no es la misma, y al no tener los reactivos de isorhamnetina ni kaempferol para realizar la aptitud del sistema, se realizó un análisis bibliográfico, en donde se encontraron algunas revisiones para la cuantificación de la quercetina a través de HPLC, y se tomaron como referencia los siguientes trabajos:

- John Alexander Muños, en su trabajo “Cuantificación de flavonoides, expresados como quercetina total, en algunos extractos y soluciones de uso oral a base de *Caléndula Officinalis*, 2014”, analizó la cuantificación de un extracto

hidroalcohólico de caléndula, utilizando la misma fase móvil descrita en la USP, e hidrolizando el extracto, antes de llevarlo a cromatografía, para separar la quercetina de los flavonoides glicosidos y dejarla en forma de aglicona (libre), a través de la ruptura de enlaces, y así, poder identificar mejor la quercetina, ya que al ser un extracto, contiene gran cantidad de componentes. También, utilizo un gradiente para la óptima elución de la quercetina, debido a lo mismo, a su gran cantidad de componentes. En este trabajo, se encontró que los resultados mostraron que las metodologías desarrolladas cumplen parámetros de selectividad, linealidad, precisión y exactitud necesarios para su utilización, por lo que fueron utilizadas en la determinación del contenido de quercetina total en algunos extractos hidroalcohólicos a base de *C. Officinalis*.

En la evaluación de dos lotes diferentes de extracto hidroalcohólico 1:1, se obtuvo un contenido de quercetina total de 64 y 19.8 $\mu\text{g/g}$ para cada uno, con un alto porcentaje de desviación.

- “Validación de una metodología por HPLC para cuantificar quercetina total en los extractos de *Caléndula Officinalis*, (2015)”, en este paper, de la revista cubana de farmacia, se validó también una metodología cromatográfica efectiva para la óptima elución de quercetina en los extractos, encontrando un contenido de quercetina de 72,41 $\mu\text{g/g}$ de producto (Muños. J. A, et al., Morgan. J. E, et al., Trujillo. M, et al., 2015).
- Se encontró que la concentración de quercetina en los extractos hidroalcohólicos, aumenta a medida que aumenta el grado de alcohol en el solvente. Con porcentajes de 30, 50 y 70% de alcohol, se obtiene 49, 56 y 61 $\mu\text{g/g}$ de planta en seco, respectivamente (Alina. O, et al., 2015). En la figura 7, se observa la estructura molecular de identificación de la quercetina:

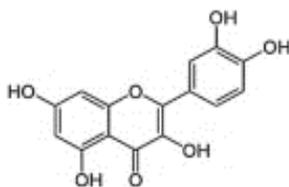


Figura 7. Estructura de Identificación de la Quercetina.

MATERIALES

- Columna cromatográfica SiliaChrom C18 (LC Column 100 x 4.6mm); 5µm.
- Material volumétrico (Balones aforados, pipetas graduadas, probetas, erlenmeyers, beakers, viales).
- Jeringas desechables.
- Filtros 0.45 µm para muestras (HPLC).
- Membranas de 0.45 µm para solventes, Millipore ®.
- Soporte universal.
- Pinzas.

EQUIPOS

- Cromatógrafo JASCO EXTREMA. Bomba PU 4180, con Desgasificador; Automuestreador AS 4150; Detector PDA MD 4010; Interfase LC - NetII/ACD.
- Balanza analítica METTLER AJ150. Min 150 g d= 0,1 mg.
- Ultrasonido Elma ® E 60 H, Elmasonic P.
- Equipo de filtración Millipore.
- Montaje para fraccionamiento líquido – líquido.
- Rota - Evaporador IKA ® HB 10.

REACTIVOS

- Metanol grado HPLC (MeOH) (Scharlau)
- Agua grado HPLC (J.T.Baker).
- Ácido fosfórico (H₃PO₄) al 85% (Riedel-de Haen).
- Estándar de Quercetina Dihidratada (Sigma).
- HCl 37% (Chemí)
- Éter etílico (Chemí)

DESARROLLO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Preparación de la Fase Móvil:

Fase Acuosa (H_3PO_4 0.08% (p/v) en agua grado HPLC):

Se tomo 0,3 mL de ácido fosfórico 85% (p/p), se diluyo con agua purificada (HPLC), y se llevó a un balón aforado de 500 L. Luego, se pasó el solvente a un reservorio (rotulado como H_3PO_4 0.08% en H_2O) y se desgasifico con ultrasonido durante 30 minutos a 60 Hz (*anexo 9*).

Fase Orgánica:

Se filtro 500 mL de $MeOH$ grado HPLC a través de membrana de $0.45 \mu m$ (*anexo 10*), se pasó el solvente a un reservorio (rotulado como $MeOH$), y se desgasifico con ultrasonido durante 30 minutos a 60 Hz (*anexo 9*).

Preparación de las Soluciones:

Solución de quercetina estándar 450 $\mu g/mL$:

Se peso 12.6 mg de estándar de quercetina di hidratado, y se llevó a un beaker de 20 mL. Se disolvió en 10mL de $MeOH$ con ayuda de ultrasonido, y se llevó a un balón de 25mL con $MeOH$. Finalmente, se rotulo como quercetina 450 $\mu g/mL$.

Solución quercetina estándar 225 $\mu g/mL$:

Se tomar una alícuota de 5 mL de la solución de quercetina 450 $\mu g/mL$, y se llevó a 10 mL con $MeOH$ en balón aforado. Se rotular la solución como quercetina 225 $\mu g/mL$.

Solución madre de quercetina estándar 9 $\mu g/mL$:

De la solución de quercetina de 225 $\mu g/mL$, se tomó una alícuota de 2 mL, y se llevó a 50 mL en balón aforado con $MeOH$: H_2O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 9 $\mu g/mL$, la cual es la solución madre de los puntos para la curva de calibración.

Solución quercetina estándar 1,8 $\mu g/mL$:

Se tomo 2 mL de la solución madre de quercetina 9 $\mu g/mL$, y se llevó a 10 mL en balón aforado con $MeOH$: H_2O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 1,8 $\mu g/mL$.

Solución quercetina estándar 2,7 µg/mL:

Se tomo 3 mL de la solución madre de quercetina 9 µg/mL, y se llevó a 10 mL en balón aforado con MeOH: H₂O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 2,7 µg/mL.

Solución quercetina estándar 3,6 µg/mL:

Se tomo 4 mL de la solución madre de quercetina 9 µg/mL, y se llevó a 10 mL en balón aforado con MeOH: H₂O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 3,6 µg/mL.

Solución quercetina estándar 4,5 µg/mL:

Se tomo 5 mL de la solución madre de quercetina 9 µg/mL, y se llevó a 10 mL en balón aforado con MeOH: H₂O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 4,5 µg/mL.

Solución quercetina estándar 5,4 µg/mL:

Se tomo 6 mL de la solución madre de quercetina 9 µg/mL, y se llevó a 10 mL en balón aforado con MeOH: H₂O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 5,4 µg/mL.

Solución quercetina estándar 6,3 µg/mL:

Se tomo 7 mL de la solución madre de quercetina 9 µg/mL, y se llevó a 10 mL en balón aforado con MeOH: H₂O (80:20). Se rotulo la solución como quercetina 6,3 µg/mL.

METODOLOGÍA DE HIDROLISIS

Se realizó una hidrolisis ácida con HCL 3,5 N, para separar la quercetina de los flavonoides glicósidos presentes en los extractos hidroalcohólicos de caléndula. Inicialmente se diluyo el HCL de 37% a 3,5 N, luego se tomó 20 mL de este y se mezcló con 20 mL de agua y 20 mL del extracto como se observa en la tabla 7, y se realizó la hidrolisis a 80°C aproximadamente durante 1 hora (*anexo 11*), para obtener así, la quercetina a partir de los flavonoides glicósidos presentes en el material de partida, y poder identificarla en el extracto para la cuantificación.

Tabla 7. Condiciones Óptimas para la Hidrolisis Acida del Extracto.

CONDICIÓN	VALOR
Temperatura (°C)	80
Volumen de Extracto (mL)	20
Volumen de Agua (mL)	20
Volumen de HCL (mL)	20
Extracción con Éter Etílico (mL)	60

Pasada la hora de hidrolisis, se dejó enfriar la muestra, mientras se realizaba el montaje de fraccionamiento liquido – liquido. Teniendo listo el montaje y la muestra hidrolizada a temperatura ambiente, se realizó una extracción continua con éter etílico (*anexo 12*), durante 24 horas, para recuperar la quercetina en el éter y poderla llevar a análisis cromatográfico, e identificar el pico en el extracto (en el extracto quedan los componentes polares, y en el éter los de mediana polaridad, las agliconas quedan en el agua y la quercetina en el éter).

Después de las 24 horas de extracción, se llevó la muestra a un rotaevaporador a 50 °C, 87 rpm y 758 mbar (*anexo 13*), durante 30 minutos aproximadamente, para evaporar el éter y concentrar la muestra quercetina (*purificación*). Finalmente, se añadió 2 mL de metanol grado HPLC al balón donde quedo la muestra seca, para disolver, y se tomó una alícuota de 0,5 mL de esta muestra que se diluyo con 1,5 mL de metanol (HPLC) para inyectar finalmente en el cromatógrafo.

SISTEMA CROMATOGRÁFICO ÓPTIMO PARA LA ELUCIÓN DE QUERCETINA

Con base en los trabajos mencionados anteriormente, los equipos y reactivos disponibles en la fundación, se planteó un sistema cromatográfico óptimo para la elución de quercetina en los extractos de caléndula, mostrado en la tabla 8, y con la utilización de un gradiente por la gran cantidad de componentes presentes en los extractos, mostrado en la tabla 9:

Tabla 8. Sistema Cromatográfico Optimo para la Elución de Quercetina en el Extracto.

PARÁMETRO	VALOR
Solventes Fase Móvil	A = H ₃ PO ₄ 0,08% en H ₂ O B = MeOH
Columna	C - 18 5 μm (LC Column 100 x 4,6 mm)
Temperatura (°C)	35
Volumen de Inyección (μL)	5
λ _{opt_PDA} (nm)	370

Tabla 9. Gradiente Utilizado para la Optima Elución de Quercetina en el Extracto.

GRADIENTE			
Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (mL/min)
0,05	65	35	1
1,5	65	35	
4	45	55	
12	50	50	
13	100	0	
20	100	0	
21	65	35	
30	65	35	

CURVA DE CALIBRACIÓN

Teniendo las soluciones preparadas y el sistema cromatográfico definido, se realizó la secuencia de inyecciones (*por duplicado*) al equipo, y se linealizaron los datos, a través de una curva de calibración en el rango de 1,8 – 6,3 ppm. Al analizar los cromatogramas (*anexo 14*) y los datos (*anexo 15*) obtenidos, inicialmente se obtuvo una correlación entre los datos de 0,94, por lo cual se eliminó el primer punto de la concentración de 2,7, y el segundo punto de la concentración de 4,5 ppm, y se suavizó la curva a través del software de análisis estadístico GraphPadPrism (*anexo 16*), obteniendo un excelente ajuste lineal, como se observa en la figura 8:

Curva de calibración suavizada (Quercetina)

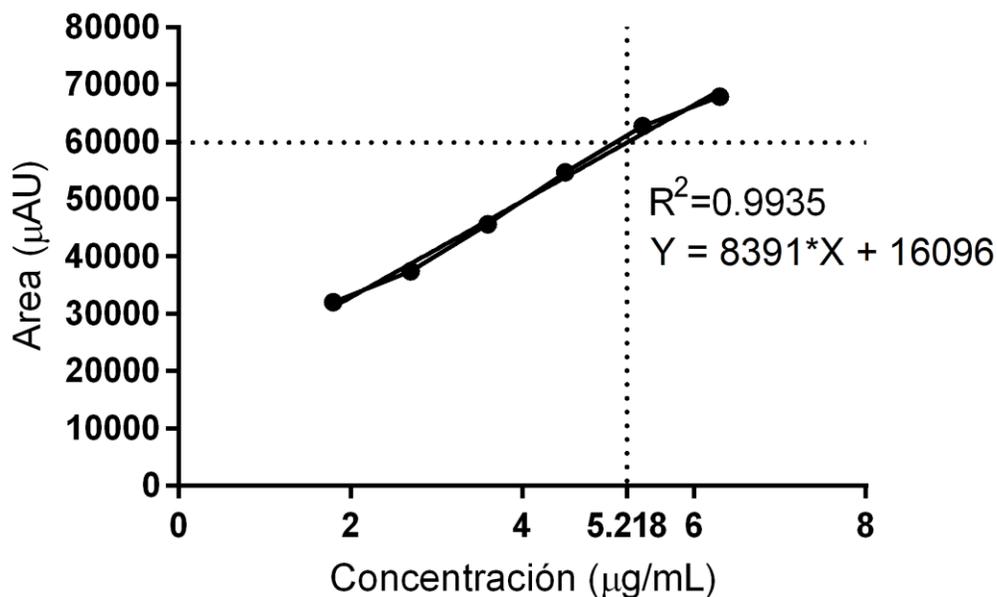


Figura 8. Curva de Calibración Suavizada.

Finalmente, teniendo las muestras del extracto sin hidrolizar y con hidrolisis, y la curva de calibración, se pasó a inyectar las muestras en el equipo, determinando que la longitud de onda del PDA (Detector de Arreglo de Fotodiodos), en la cual se observan mejor los picos de quercetina es, efectivamente, en 370 nm, como lo descrito en la USP y en los paper's (anexos 17 y 18).

En la figura 9, se observan los cromatogramas de los extractos con y sin hidrolisis, y se encontró un número de platos teóricos de 10103, lo cual es aceptable dentro de los requisitos de la USP, y un área de pico de 59881 µUA de quercetina en el extracto de caléndula. Con esta área, se determinó una primera aproximación de la concentración de quercetina en los extractos producidos por el laboratorio.

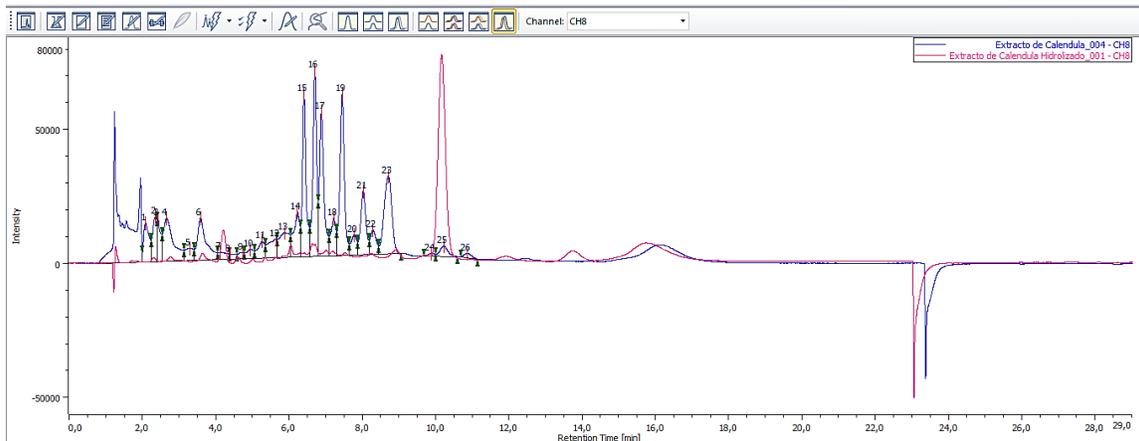


Figura 9. Cromatogramas del Extracto de Caléndula.

Con la ecuación de la curva de calibración:

$$Y = 8391X + 16096$$

Se calculo una primera aproximación de la concentración de quercetina en los extractos de caléndula producidos por en Labfarve:

$$X = 5,2180 \mu\text{g}/\text{mL}$$

$$\text{Densidad}_{\text{Extracto}} = 0,9690 \text{g}/\text{mL}$$

$$X = 5,3849 \mu\text{g}/\text{g} \text{ de Extracto}$$

Que, en comparación con los valores encontrados en la literatura, con el porcentaje más cercano de alcohol de 30%, se obtiene 49 $\mu\text{g}/\text{g}$ de planta en seco (Alina. O, et al., 2015), determinando que se tiene un valor bajo de este marcador, por lo cual, se justifica también el diseño e implementación de un nuevo percolador que aumente esta concentración en los extractos.

5.

Diseño Preliminar del Percolador

PROCESO DE EXTRACCIÓN ACTUAL

El proceso actual por el cual se obtiene el extracto de caléndula, y los diferentes extractos de las plantas medicinales que se utilizan en la preparación de los productos farmacéuticos (fitoterapéuticos, fitocosméticos y esencias florales) en el laboratorio, pasan primero por una selección y lavado (con agua potable) de la planta fresca que llega del jardín (o de un cultivo cercano). Luego de tener la mejor planta seleccionada y limpia, se pasa a secado en un horno de acero a 60°C de temperatura. Posteriormente, la planta seca pasa a un molino hasta obtener un tamaño de partícula pulverizado ($D_{p_{prom}} = 841 \mu m$); se pesan bolsas de 2,5 kilos de planta pulverizada, pasar a análisis por control de calidad. En caso de ser aceptada por control microbiológico, se lleva a espera para extracción, y en caso de ser rechazada, pasa a destrucción.

Cuando se va a realizar la extracción, se lleva la cantidad de planta pulverizada y de etanol (96%) solicitadas a dispensación, para entrar a la planta y realizar el proceso. Una vez allí, se prepara el solvente, añadiendo inicialmente 110 L de agua purificada en un recipiente de 180 L, luego se añaden 69 L de alcohol. En un recipiente aparte, se disuelven los parabenos en 1 L de alcohol (0.0375 kg de metilparabeno puro y 0.0075 kg de propilparabeno puro), para añadirlos en el recipiente de 180 L, y ajustar finalmente el grado de alcohol en 36% con agitando, hasta obtener disolución completa.

Seguidamente, el operario ajusta el filtro del percolador, el cual se cubre con una gaza y se coloca en el orificio de flujo de salida. Se toma una bolsa de planta pulverizada, y se coloca en un recipiente plástico de 40 L, se añade 3 L de solvente preparado anteriormente, y se agita la planta de tal modo que quede humedecida, esto se hace aproximadamente en 10 minutos y se añade la planta directo al percolador. Se repite así este procedimiento hasta tener en el percolador la cantidad que se desea extraer de planta, para finalmente adicionar la cantidad restante de solvente hasta completar la relación. Se tapa el percolador, se identifica correctamente y se abre la llave del filtro para recoger el líquido en un recipiente plástico para asegurar que este fluyendo, se añade nuevamente al percolador, se tapa y se deja en maceración durante 24 horas.

Al término de las 24 horas de maceración, se hace la recolección en un recipiente de plástico de volumen de acuerdo con la cantidad de extracto requerido (se debe recibir el extracto en recipientes limpios y desinfectados), a través de gravedad. Se mide el grado de alcohol que debe estar entre 20 - 30 %, y en caso de estar por encima, se evapora a un volumen determinado y luego se ajusta el grado alcohólico. Si existe merma en el volumen, y el grado alcohólico está bajo, se hace el ajuste correspondiente solo con alcohol hasta lograr el grado óptimo, dependiendo del caso, que pasa nuevamente a control, donde aprueban o rechazan el extracto, según análisis cualitativos y microbiológicos. En caso de rechazo del extracto, pasa a destrucción.

En la figura 10, se observa el diagrama de flujo del proceso de extracción que se lleva a cabo actualmente en Labfarve, donde finalmente pasa el extracto aceptado por calidad a producción de las diferentes formas farmacéuticas:

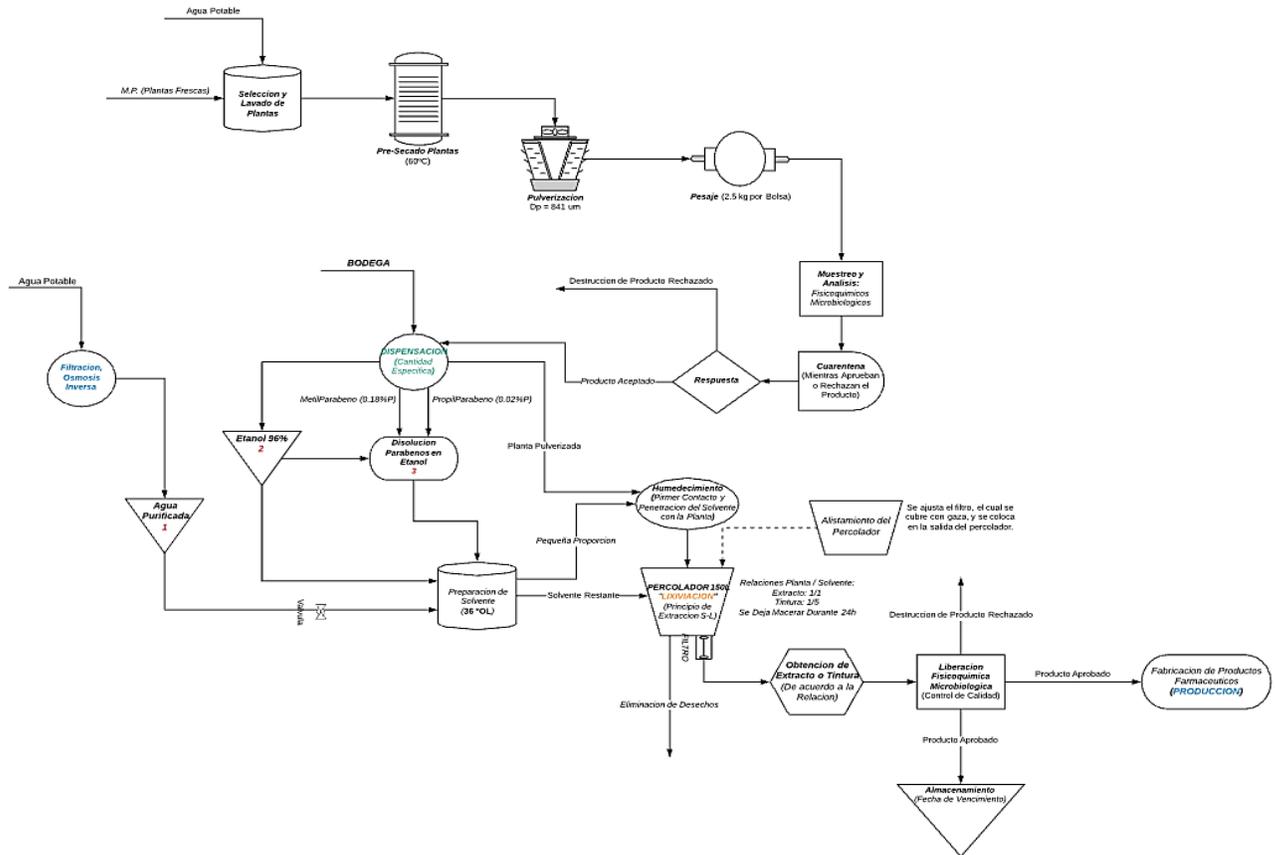


Figura 10. Proceso de Extracción Actual de Plantas en Labfarve.

METILPARABENO

El metil p-hidroxibenzoato, es un parabeno comúnmente utilizado como preservante antimicrobiano, y tiene mayor efectividad contra levaduras y mohos. Para esta aplicación, se utiliza en conjunto con otros parabenos tales como Propilparabeno. La actividad antimicrobiana de este parabeno se exhibe comúnmente entre *pH* 4-8. Esta actividad disminuye al incrementar el pH, debido a la formación de aniones de Fenol-ato.

Este parabeno es incompatible con surfactantes no iónicos, tal como Polisorbato 80, como resultado de micelización. Sin embargo, Propilenglicol puede ser usado para evitar esta interacción. A su vez, es incompatible con: Bentonita, Trisilicato de Magnesio, Talco,

Tragacanto, Alginato de Sodio, Aceites Esenciales, Sorbitol, Atropina, Azúcares y Polialcoholes. Cabe notar que algunos plásticos pueden absorber Metilparabeno.

En cuanto a estabilidad, soluciones acuosas de este parabeno con un pH de 3-6 son estables hasta por 4 años a temperatura ambiente, mientras que soluciones con pH superior a 8 son sujetas a hidrólisis (Quinn, M.E., et al., 2009).

El uso de Metilparabeno sin Propilenglicol crea la posibilidad de que esté perdiendo sus propiedades antimicrobianas al entrar en contacto con ciertos aceites esenciales de las plantas y Polialcoholes causados por la posible fermentación de la planta en maceraciones prolongadas. Finalmente, debido a que los parabenos son adicionados antes de que el pH del producto sea regulado, es posible que pierdan sus propiedades al ingresar a un producto alto en pH, aunque posteriormente se regule.

PROPILPARABENO

Propil p-hidroxibenzoato, es un parabeno también utilizado como preservante antimicrobiano. Al igual que el Metilparabeno, la actividad antimicrobiana se exhibe comúnmente entre *pH* 4-8, y esta actividad disminuye al incrementar el pH debido a la formación de aniones de Fenol-ato. A su vez, es más efectivo contra bacterias Grampositivos que contra bacterias Gramnegativo.

Además de ser incompatible con surfactantes no iónicos, este parabeno puede ser absorbido por algunos tipos de plásticos, $AlMgO_4 Si^+$, Trisilicato de Magnesio, Oxido-Hidróxido de Hierro (III) y Azul Ultramarino ($Al_6Na_8O_{24}S_3Si_6$).

En cuanto a estabilidad, soluciones acuosas de este parabeno con un pH de 3-6 son estables hasta por 4 años a temperatura ambiente, mientras que soluciones con pH superior a 8 son sujetas a hidrólisis (Quinn, M.E., et al., 2009).

- En la tabla 10, se observan la descripción de los pasos y de las variables del proceso actual en el laboratorio:

Tabla 10. Pasos y Variables del Proceso Actual en Labfarve.

PASO	Proceso Actual <i>LABFARVE</i>		
	Descripción	SI	NO
Planta Pulverizada	Para este proceso, se usa una planta pulverizada $D_{p_{prom}} = 841\mu m$, liberada fisicoquímica y microbiológicamente por control de calidad.	X	

Solvente	Actualmente, se prepara un solvente hidroalcohólico para la extracción, añadiendo inicialmente 110 L de agua purificada en un recipiente de 180 L, y se añade 69 L de etanol 96 %. En un recipiente aparte, se disuelven los parabenos (metil y propil parabenos) en 1 L de alcohol, para añadirlos finalmente en el recipiente y ajustar el grado de alcohol en 36 %.	X	
Primer Contacto (Planta/Solvente)	En este paso del proceso, el operario toma una bolsa de planta pulverizada (<i>aproximadamente 2.5 kg</i>) y la coloca en un recipiente de 40 L, añade 3 L de solvente preparado anteriormente, y agita la planta, de tal modo que quede humedecida, esto se hace aproximadamente en 10 <i>min</i> y se añade la planta directo al percolador.	X	
Ajuste del Percolador (filtro)	Para este proceso, se ajusta el filtro del percolador, el cual se cubre con una gaza y se coloca en la salida del percolador.	X	
Lixiviación (Extracción S/L)	En este paso, se añade la materia prima pulverizada humedecida al percolador, luego se añade toda la cantidad de solvente restante, y se deja en maceración durante 24 h.	X	
Temperatura	En este proceso, se realiza una maceración a temperatura ambiente.		X
Recirculación	En el proceso actual, solo se abre la válvula de salida al inicio, para ver que el líquido efectivamente este fluyendo, se añade nuevamente el líquido al percolador, se tapa y se deja en maceración durante las 24 h.		X
Recolección	En esta parte del proceso, se hace una sola recolección en un recipiente de volumen de acuerdo con la cantidad de extracto requerido, se mide el grado de alcohol que debe estar entre 20 - 30 %, y en caso de estar por debajo o por encima, se ajusta.	X	

Tratamiento del Bagazo	En el proceso actual, el bagazo sale directamente para eliminación de desechos después de la recolección del extracto o la tintura.		x
------------------------	---	--	---

PUNTOS CRÍTICOS

Según lo observado, y mediante un análisis concienzudo del proceso de extracción, se llegó a inferir los siguientes puntos que al parecer son críticos, y que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar un nuevo equipo para la extracción.

- Primero, muchas veces se tienen pérdidas de volumen y grado de alcohol final, debido a la no hermeticidad de los equipos.
- Segundo, las plantas absorben aproximadamente un 50 % de solvente, y al culminar el proceso de extracción, sale el bagazo con gran cantidad de extracto y con alta concentración probablemente, de metabolitos de interés, que finalmente se desecha.

Para el diseño preliminar de este nuevo percolador, se tuvo muy en cuenta estas dos consideraciones.

SOLIDWORKS

SolidWorks es un software que cubre todos los aspectos del proceso de desarrollo de productos con un flujo de trabajo integrado a la perfección, que incluye las etapas de diseño, validación, diseño sostenible, comunicación y gestión de datos. Los diseñadores y los ingenieros pueden abarcar fácilmente varias disciplinas, lo que acorta el ciclo de diseño, aumenta la productividad y agiliza la introducción de productos innovadores en el mercado.

SolidWorks es la solución de CAD 3D preferida de toda la industria. Más de dos millones de diseñadores e ingenieros de todo el mundo utilizan SOLIDWORKS para dar vida a sus diseños, desde los aparatos más modernos hasta las innovaciones que permiten mejorar nuestro futuro (Grupo Abstract, [*online*]).

METODOLOGÍA

Después del análisis de la descripción de los pasos y puntos críticos del proceso, lo que se desea es hacer una transferencia del proceso actual estático, a un proceso dinámico, con la adición de la recirculación, temperatura (a través de una chaqueta térmica con aislamiento), y hermeticidad, que mejore el rendimiento del proceso de extracción, y aumente la concentración de los metabolitos secundarios en los extractos, y posteriormente en los

productos. En la tabla 11, se describe la propuesta de mejora del proceso, de acuerdo a los pasos analizados en el proceso actual, y en la tabla 12, se observan las ventajas de la implementación de estas mejoras y algunas observaciones:

Tabla 11. Pasos y Variables de las Propuestas de Mejora del Proceso de Extracción.

PASO	Propuesta de Mejora del Proceso		
	Descripción	SI	NO
Planta Pulverizada	Para este proceso, se plantea disminuir un poco más el tamaño de partícula de la planta pulverizada $D_{p_{prom}} = 200 \mu m.$	X	
Solvente	Para la preparación del solvente hidroalcohólico, se tiene una buena metodología de preparación, por lo cual se plantea dejar la misma.	X	
Primer Contacto (Planta/Solvente)	En este proceso, se plantea añadir la planta y el solvente al percolador, agitar, y ejecutar una primera recirculación, para tener un mayor contacto.	X	
Ajuste del Percolador (filtro)	Para este proceso, se plantea la utilización de dos filtros. Un pre filtro de 20 micras, el cual debe ser específico para cada planta y se debe ajustar en el percolador antes de realizar la extracción, y una segundo antes de la recolección final.	X	
Lixiviación (Extracción S/L)	Después del primer contacto, se deja que ocurra el proceso de extracción con agitación constante, y con la adición de las variables temperatura y recirculación.	X	
Temperatura	Se plantea adicionar esta variable @ 37 °C (la cual es la máxima temperatura recomendada por la USP), a través de una chaqueta de calentamiento con vapor de agua.	X	

Recirculación	Para la mejora del proceso, también se plantea la recirculación del solvente, a través de una bomba de vacío, por cada hora de extracción.	x	
Recolección	Para esta parte del proceso, se plantean dos recolecciones; una primera recolección del producto pasado el tiempo de extracción, y otra después de un tratamiento del bagazo.	x	
Tratamiento del Bagazo	Se plantea la aplicación de un sistema de centrifugación del bagazo a 1200 rpm, según estudios realizados por pasantes anteriores, en una lavadora a estas revoluciones.	x	

Tabla 12. Ventajas y Observaciones de las Propuestas de Mejora con Respecto al Proceso Actual.

PASO	Ventajas	¿Por qué?	Observaciones
Planta Pulverizada	Al tener un menor tamaño de partícula, se aumenta la transferencia de masa de los metabolitos en el solvente.	Se realiza la molienda previa, para aumentar la velocidad de extracción, disminuyendo la distancia entre el soluto a difundirse y el sólido que lo contiene.	Se debe estandarizar el tamaño de partícula de la planta para el proceso de extracción. Cuando más pequeño sea, mayor será el área interfacial entre el sólido y el solvente, y, por lo tanto, mayor transferencia de masa.
Solvente	Se da continuidad a la preparación actual.	El solvente es clave en los procesos de extracción S/L, y trabajar con solventes de baja viscosidad es bueno para la libre circulación. Este, es un solvente polar, por lo cual se extraen los componentes de las familias polares (Ej., Flavonoides).	En caso de necesitar la extracción de los componentes apolares, se hace necesario cambiar el solvente.
Primer Contacto (Planta/Solvente)	Se tendrá un primer contacto más uniforme entre la planta y el solvente.	Esta etapa se hace para asegurar el contacto completo de la planta con el solvente, y una primera penetración del	Es conveniente trabajar en equipos y recipientes preferiblemente de acero inoxidable y cerrados, para evitar

		solvente que ayuda en cierta medida a abrir los poros de la pared celular, para que el solvente posteriormente, ataque directo al soluto.	cualquier pérdida o degradación de los componentes de interés.
Ajuste del Percolador (filtro)	Con estos dos filtros, se garantizará la obtención de un extracto de gran calidad.	Este paso se hace para evitar el flujo de material sólido con la salida del extracto final.	Se debe ajustar un flujo de salida del extracto o la tintura (goteo por segundo), en función de los filtros.
Lixiviación (Extracción S/L)	Se espera aumentar el rendimiento de este proceso de extracción, disminuyendo el tiempo y aumentando la concentración de metabolitos secundarios.	Este es el paso más importante del proceso, acá se tiene la separación y disolución del soluto en el solvente, teniendo en cuenta que la velocidad de extracción es controlada por el fenómeno de <i>difusión</i> .	Se recomienda trabajar en un proceso cerrado y libre de luz; y con la agitación, se incrementará la difusión turbulenta (incremento de la transferencia del soluto desde la superficie de las partículas a la solución en sí).
Temperatura	Aumento de la solubilidad del solvente, y con esto, aumento en el rendimiento del proceso.	La aplicación de esta variable se hace, para aumentar la solubilidad del solvente.	Se recomienda analizar la posibilidad de implementar controles de temperatura y presión en el percolador.
Recirculación	Con esto se favorece la máxima extracción de soluto en este solvente hidroalcohólico.	Esta recirculación de efectúa para garantizar así, que se extrae la máxima cantidad posible de metabolitos, con la utilización de este solvente hidroalcohólico al 36%.	Se recomienda que el percolador y los componentes del diseño, sean herméticos, para evitar cualquier pérdida por evaporación de los componentes de interés.
Recolección	Al tener dos recolecciones, se mejora la obtención de volumen solicitado de extracto, sin tener pérdidas considerables de este.	Se hacen las dos recolecciones, para cumplir la relación inicial, y no tener que ajustar al final el volumen por la adsorción de solvente en la planta.	Se recomienda recoger el líquido en recipientes limpios y desinfectados, para evitar la contaminación del extracto final.
Tratamiento del Bagazo	Con esta centrifugación se recupera el líquido adsorbido por la planta y se obtiene un extracto de mejor calidad.	Este paso es de gran importancia, ya que la planta absorbe aproximadamente el 50% de solvente, y cuando se deja en filtración por gravedad, el líquido queda atrapado en ella.	Se recomienda analizar con que propiedades queda este bagazo después de la centrifugación, para darle una posible aplicación y valor agregado, ya que actualmente se desecha.

- Para el diseño preliminar de este percolador, se tuvo en cuenta los análisis hechos por la compañera María Alejandra Villamizar (2018), que utilizó correlaciones encontradas en la literatura, heurísticas de diseño, posibles limitaciones en la planta de producción, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Selección del Material: Las BPM seguidas en la industria farmacéutica establecen también las generalidades que deben cumplir los equipos que se utilizan en la fabricación de productos, especificando que debe ser en acero inoxidable porque no se altera la calidad, ni la seguridad del producto. Se debe seleccionar el acero inoxidable AISI-316 con un espesor de 5 mm, pues es un acero austenítico por su aleación cromo-níquel y tiene una mayor adición de molibdeno lo que aumenta su resistencia a la corrosión.

Diseño del Cuerpo: Los tanques más utilizados a nivel industrial son de forma cilíndrica, por lo que se decide diseñar un tanque cilíndrico con agitación para que mantenga la mezcla en constante interacción con el solvente.

Diseño del Agitador: Se decidió diseñar un agitador turbina de disco con aspas ya que el flujo, sería mixto. La compañera, también decidió utilizar deflectores y aplicó heurística de diseño para un sistema de agitación en un tanque cilíndrico, utilizando cuatro deflectores, pero este caso no se tuvo en cuenta, ya que estos deflectores me afectarían el pre filtro interno que se plantea en este trabajo.

Se determinó, que se requiere una potencia de 37,87 Watts para el funcionamiento del agitador.

- También, se tuvo en cuenta lo analizado por el compañero Daniel Galeano (2018), donde obtuvo buenos resultados trabajando con una lavadora, para la centrifugación final del bagazo y el aumento del rendimiento del proceso de extracción, a través de un motor de configuración de correa y poleas a 1200 RPM.

En los dos casos de los pasantes anteriores, se estudió la caléndula, por lo cual, se decidió trabajar con un diseño en función de un percolador de capacidad de 150 litros, que, en comparación de los resultados obtenidos, María Alejandra concluyó que la mejor configuración para la caléndula es un percolador de 50 L con un tiempo de extracción de 9 horas; y Daniel, concluyó que la mejor configuración es un percolador de 150 L, con un tiempo de extracción de 3 horas.

RESULTADOS

Se determinó la longitud de un tanque con una capacidad del 20% más del volumen a ocupar, ya que, por heurísticas de diseño, se sugieren que el equipo sea llenado solo hasta

el 80% de su capacidad total. Por lo cual se realizó un diseño en función de una capacidad de extracción de 150 L (*anexos 19 y 20*).

$$V = \pi * r^2 * h$$

$$V = \pi * 300^2 * 700$$

$$V = 197,92 * 10^6 \text{ mm}^3 = 197,92 \text{ Litros} * 0,8 = \mathbf{158,33 \text{ Litros}}$$

Además de la implementación de agitación, con respecto al proceso actual, también se planteó la inclusión de hermeticidad, temperatura (a través de una chaqueta de calentamiento con aislamiento para evitar pérdidas de energía) y recirculación, en este nuevo diseño, disminuyendo las pérdidas, aumentando la solubilidad y la absorción de los metabolitos secundarios en el solvente. En la tabla 13, se muestran las dimensiones propuestas para este percolador:

Tabla 13. Dimensiones del Percolador.

DIMENSIONES DEL PERCOLADOR		
Pre-Filtro	Diámetro (mm)	590
	Altura (mm)	700
	Apertura Orificio (µm)	20
Recipiente Interno	Diámetro (mm)	600
	Altura (mm)	700
	Capacidad (L)	150
Recipiente Externo	Diámetro (mm)	650
	Altura (mm)	900
	Longitud Patas (mm)	550
Chaqueta de Calentamiento	Espesor (mm)	25
	Aislamiento (Fibra Vidrio) (mm)	10
	Temperatura Interna (°C)	37
Recipiente Recolector	Diámetro (mm)	600
	Altura (mm)	700
Servomotor	Potencia (W)	37,87
Motor Centrifugo	RPM	1200
Bomba	HP's	0,5
Filtro	Tamaño de Partícula (µm)	0,5
Tubería	Diámetro Interno (mm)	5

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el incremento de la temperatura, ya que contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta el rendimiento del proceso. Sin embargo, algunos principios activos pueden ser termolábiles y pueden destruirse (Olivo, F, et al., 2017), por lo cual se recomienda analizar el aumento moderado de la temperatura, entre un promedio de 30 a 40°C, en función de la recomendación de trabajar los procesos de extracción con temperaturas por debajo de 60°C según la USP 40.

- ✚ Debido a la aplicación de estas nuevas variables, el método de extracción ya no sería la maceración, sería un proceso de extracción sólido/líquido, o más conocido como lixiviación.

Lixiviación: Que es la disolución preferente de uno o más componentes de una mezcla sólida por contacto con un disolvente líquido. La separación implica la disolución selectiva del soluto por un líquido con el que es miscible. Para los materiales biológicos, los constituyentes solubles suelen estar dentro de las células (*anexo 21*).

Para hojas, tallos y raíces son secados previamente lo cual ayuda a romper las paredes celulares; el disolvente ataca directamente al soluto, por lo cual también es supremamente importante el primer contacto y penetración del solvente con la planta (McCabe, W.L., 2007). En la figura 11, se observan las etapas de lixiviación en una partícula:

Etapas de Lixiviación:

1. Transferencia del solvente de la solución a la superficie del sólido.
2. Difusión del solvente en los poros del sólido.
3. Disolución del soluto en el solvente.
4. Difusión del soluto a la superficie de la partícula.
5. Transferencia del soluto fuera de la superficie de la partícula.

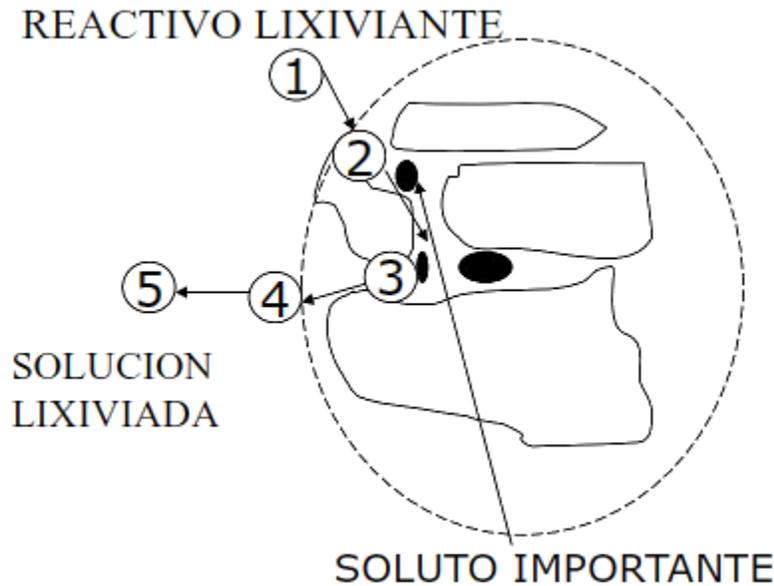


Figura 11. Etapas de Lixiviación.

Cualquiera de las cinco etapas puede ser responsable de limitar la velocidad de extracción. Suelen ser rápidas la transferencia de solvente a la partícula y la disolución del soluto en el disolvente.

El proceso de extracción se subdivide en dos categorías de acuerdo con el mecanismo responsable por la etapa de disolución (McCabe, W.L., 2007):

1. Aquellas operaciones que ocurren debido a la solubilidad del soluto con el solvente. En este caso la velocidad de extracción es controlada por el fenómeno de difusión.
2. Extracciones donde el solvente reacciona con un constituyente del material sólido para producir un compuesto soluble en el solvente. En este caso la cinética de la reacción que produce el soluto juega un papel preponderante.

En nuestro caso, el mecanismo responsable de la etapa de disolución es el primero. Además, si el sólido está constituido por una estructura inerte porosa, con el soluto y el disolvente, localizados en los poros del sólido, la difusión a través del sólido poroso se puede describir como una difusividad efectiva.

La trituración es un proceso importante para la extracción, cuando más pequeño sea el tamaño de partícula, mayor es el área interfacial entre el sólido y el solvente, y, por lo tanto, más alta la transferencia de masa y más pequeña la distancia entre el soluto a difundirse y el sólido que lo contiene. Por lo cual se hace necesario analizar la eficiencia del molino

utilizado en el laboratorio, y si llega a ser muy baja, plantear un nuevo diseño, ya que este es un parámetro importante.

En este trabajo, se realizó el diseño en función de una sola etapa. En la figura 12, se observa el balance de lixiviación en esta etapa:

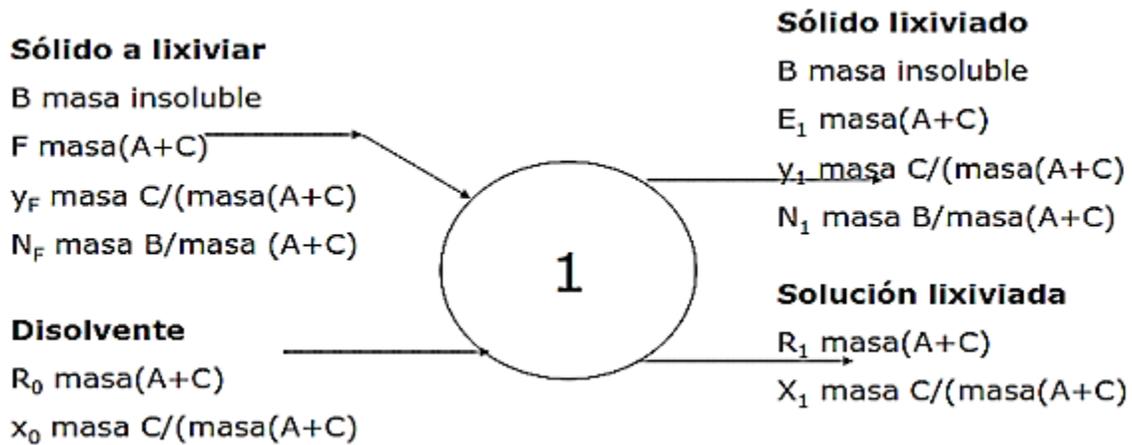


Figura 12. Lixiviación en Una Sola Etapa.

BALANCES DE MATERIA

- Balance de Solute C:

$$F * y_F + R_0 * x_0 = M * y_M$$

- Balance de Solución (Solute + Disolvente):

$$F + R_0 = M$$

$$N_M = \frac{B}{F + R_0} = \frac{B}{M}$$

$$y_M = \frac{y_F * F + R_0 * x_0}{F + R_0}$$

- ✚ En caso de no tener la composición exacta de los metabolitos en los extractos, ni la cantidad retenida, se dejaron los balances planteados.

Se implemento también un pre filtrado, a través de una malla de acero inoxidable de 20 micras, para evitar el paso de material sólido, que se llevara a través de una bomba de vacío a recirculación al percolador, y finalizado el tiempo de extracción, se abre la válvula, para el paso a la primera recolección, que pasara primero por un filtro de 0.5 micras, para asegurarnos de tener un excelente extracto. Se realizará una segunda recolección en el mismo recipiente, a través del centrifugado final del bagazo para obtener el mayor rendimiento del proceso. Además, se plantea la hermeticidad del equipo, para evitar la pérdida de componentes de interés por evaporación, debido a la temperatura.

Después de varios trazos en papel, se planteó un trazo final (*anexo 22*), y el diagrama de bloques del percolador como se observa en la figura 13, que luego se llevó al software SolidWorks, donde se realizó finalmente una simulación de movimiento. En las figuras 14 y 15, se observa el diseño final obtenido a través de SolidWorks - 2018:

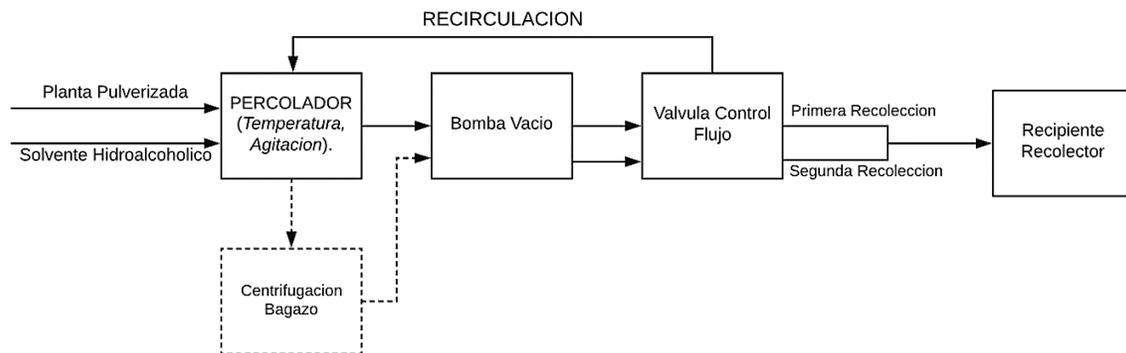


Figura 13. Diagrama de Bloques del Diseño del Percolador.

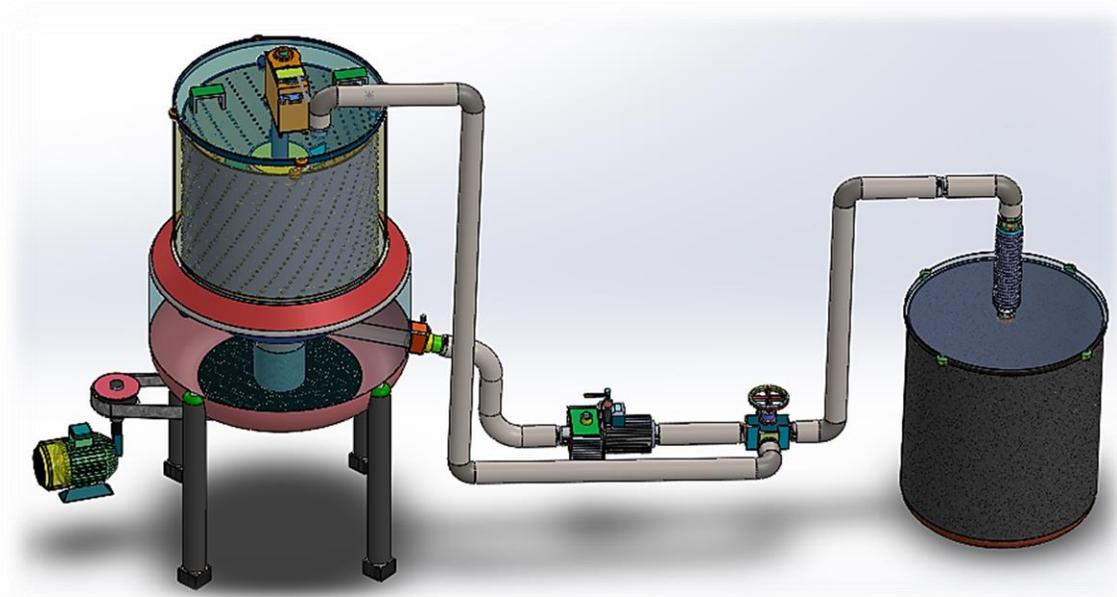


Figura 14. Vista Isométrica del Diseño del Percolador.

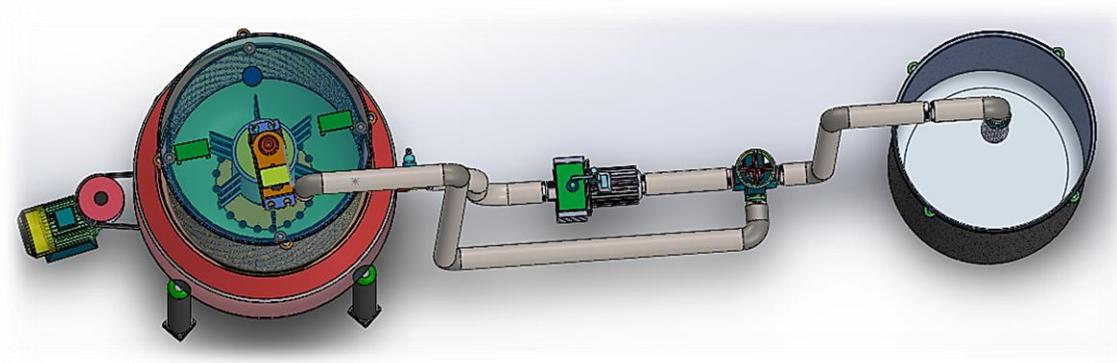


Figura 15. Vista Superior del Diseño del Percolador.

BALANCE DE ENERGÍA EN LA CHAQUETA

Ecuación general de Diseño:

$$Q = U_0 * A_0 * \Delta T_{ln}$$

Primera Suposición:

Para el análisis, se utilizará vapor de agua a razón de 1 kg/cm² absolutos como medio de calentamiento. $C_p = 1$ caloría/g°C, para calentar 230 kg/h de material dentro del percolador, y llevarlo de 18 °C a 37 °C.

Cálculos:

$$\text{Calor Ganado} = \text{Calor Perdido}$$

$$Q_p = M_3 * (H_3 - H_4)$$

$$Q_g = M_1 * C_p * (T_2 - T_1)$$

$$Q_g = 230 * (1) * (37 - 18) = 4370 \text{ kcal/h}$$

- De las tablas de vapor: $H_v = 655,5$ kcal/kg y $H_c = 150,9$ kcal/kg

$$4370 = M_3 * (655,5 - 150,9)$$

$$M_3 = \frac{4370}{(655,5 - 150,9)} = 8,66 \text{ kg/h de Vapor}$$

Diferencias de Temperatura:

$$\Delta T_1 = 132 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$\Delta T_2 = 113 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$\Delta T_M = \frac{132 - 113}{\ln\left(\frac{132}{113}\right)} = 122,25 \text{ }^\circ\text{C}$$

Área de Transferencia de Calor:

Teniendo en cuenta que $U = 730 \text{ kcal/hm}^2\text{°C}$, para el agua como fluido a través de una pared de acero inoxidable (Ingeniería del Calor, 2013):

$$4370 = 730 * A_0 * 122,25$$

$$A_0 = 0,049 \text{ m}^2$$

$$T_{media\text{Agua}} = 0,5 * (18 + 37) = 27,5 \text{ °C}$$

Suponiendo que, $h_o = 3452 \text{ kcal/hm}^2\text{°C}$ y $h_a = 2752 \text{ kcal/hm}^2\text{°C}$:

$$2752 * (T_s - 27,5) = 3452 * (150 - T_s)$$

$$T_s = 95,66 \text{ °C}$$

6.

Conclusiones y Recomendaciones

CONCLUSIONES

- ✓ La extracción es un factor clave para la empresa, ya que esta, es la esencia para obtener excelentes productos que garanticen la acción fitoterapéutica, por lo cual, se debe ratificar la presencia y proporción de estas sustancias en las formas farmacéuticas producidas por el laboratorio, para una mayor calidad y satisfacción final del cliente.
- ✓ Se avanzó en un 70% en la cuantificación de quercetina en el extracto de caléndula, determinando una primera aproximación del valor de la concentración de 5,2180 ppm en los extractos.
- ✓ El resultado encontrado, con respecto a lo reportado por Alina O. Matei (2015) de 49 $\mu\text{g/g}$ para un extracto de caléndula con solvente al 30% de alcohol, es bajo.
- ✓ Aunque se encontró en la literatura, que al aumentar el grado de alcohol aumenta la concentración de quercetina en los extractos de caléndula, no se recomienda trabajar con grados altos de alcohol, debido a la formación de *clorofila* durante el proceso, que posteriormente dificulta la producción.
- ✓ Se integró los trabajos realizados por pasantes anteriores, dando continuidad a la mejora del proceso de extracción que se viene realizando en el laboratorio.
- ✓ Se planteó el diseño del percolador en función de una transferencia del proceso actual estático, a un proceso dinámico que mejore el rendimiento de la extracción, con una forma cilíndrica y cónica en el fondo, para evitar así, posibles zonas muertas.
- ✓ Con la hermeticidad, la recirculación, la temperatura, y la utilización de un pre filtro de 20 micras y otro final de 0,5 micras, se espera optimizar el tiempo de extracción, obtener mayor concentración de los metabolitos en los extractos, y una mejor calidad de este, con respecto a microorganismos y propiedades fisicoquímicas.
- ✓ Por norma, si se desea aplicar este diseño para todos los extractos, se debe comprar un pre filtro de acero inoxidable para cada planta en específico.
- ✓ Se realizó la simulación de movimiento en función de las variables aplicadas al diseño del percolador.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir trabajando en la cuantificación, no solo del extracto de caléndula, si no con todos los extractos utilizados para la producción del laboratorio Labfarve.
- Se recomienda comprar un extracto de caléndula estandarizado, llevarlo a análisis en HPLC con el mismo marcador de quercetina y sistema cromatográfico, para compararlo con los resultados obtenidos.
- Se recomienda complementar el diseño propuesto del percolador, donde se analice más a fondo la mecánica de fluidos (caídas de presión), para definir un diámetro óptimo de la tubería en función del flujo de salida, y la potencia necesaria de una bomba de vacío, con buena eficiencia.
- También se recomienda analizar la forma más adecuada de sacar el bagazo al final del proceso, como, por ejemplo, la implementación de un brazo mecánico que ayude a sacar el pre filtro, y así, poder limpiar el percolador de una manera fácil y rápida, ya que la limpieza es un punto clave en la producción.
- Se debe analizar cuales metabolitos secundarios específicos son los que dan la acción terapéutica a los productos fabricados por el laboratorio, para poder implementar la variable temperatura en otros extractos, y así evitar la pérdida por evaporación de compuestos termolábiles.
- Se propone para un trabajo posterior, realizar un diseño experimental donde se evalúen puntos de cuantificación por HPLC y grados de alcohol, con montajes de extracción a escala laboratorio (*anexo 23*), con temperatura y agitación, para compararlos con la extracción que se hace en el laboratorio, y analizar si efectivamente estas nuevas variables optimizan el tiempo de extracción, y aumentan la concentración en los extractos.
- Se propone también, analizar con que propiedades queda el bagazo después de la extracción, para darle una posible aplicación y valor agregado, ya que este finalmente se desecha.

7.

Referencias Bibliográficas

LISTA DE REFERENCIAS

- Abad-García B, Berrueta LA, Garmon-Lobato S, et al. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1216, 5398-5415.
- Amoian, B.; Moghadamnia, A.A.; Mayandarani, M.; Amoian, M.M.; Mehrmanesh, S.; The effect of Calendula extract toothpaste on the plaque index and bleeding in gingivitis. *Res. J. Med. Plant*, 4(3), 2010, 132-140.
- Attard, A; Cuschieri, A; In vitro immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. *J. Med. Plant. Res.*, 3(6), 2009, 457 461.
- Belager JMR, Pare JRJ, Sigouin M (1997). High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications. In: Instrumental methods in food analysis. Pare JRJ, Belager JMR, Canada, Ed. Elsevier Science.
- Bezakova, L.; Masterova, I.; Paulikova, I.; et al. Inhibitory activity of isorhamnetina glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. *Pharmazie*. 51(2), 1996, 126-127.
- Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Gallori, S.; Mazzi, G.; Vincieri, F.F.; Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LCMS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 2002, 613–624.
- Caballero K., Pino N., Pajaro N., Stashenko E., Olivero J. (2014). Plants cultivated in Choco, Colombia, as source of repellents against *Tribolium castaneum* (Herbst) ELSEVIER, 759. pág 753 - 759.
- CASTILLO García Encarna, MARTÍNEZ Solís Isabel, Manual de Fitoterapia, Elsevier, España, 2007.
- Carrion, A.V., Garcia, C.R. (2010). PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA. UNIVERSIDAD DE CUENCA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. Cuenca, Ecuador.

- Ćetković, G.S.; Djilas, S.M.; Čanadanović-Brunet, J.M.; Tumbas, V.T.; Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res. Int.*, 37, 2004, 643-650.
- Chandran, P.K.; Kuttan, R.; Effect of *Calendula officinalis* flowers extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43, 2008, 58-64.
- Chandran, P.K.; Kuttan, G.; Kuttan, R.; Anti-inflammatory activity of flower extract of *C. Officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Ind. J. Exp. Biol.*, 47, 2009, 113120.
- COMITE DE EXPERTOS DE LA OMS EN ESPECIFICACIONES PARA LAS PREPARACIONES FARMACÉUTICAS. Informe #32. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1992.
- Cragg, G., Newman, D., Snader, K. (1997). Natural products in drug Discovery and development. *J Nat Prod.* 60(1):52-60.
- Decreto N.º 677. Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a Base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza, y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia, Bogotá D.C., Colombia, 26 de abril de 1995.
- Decreto N.º 1156. Por el cual se reglamenta el régimen de registro sanitario de productos fitoterapéuticos y se dictan otras disposiciones, Bogotá D.C., Colombia, 6 de julio de 2018.
- Decreto N. 2266. Por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, de vigilancia y control sanitario, y publicidad de los productos fitoterapéuticos, Bogotá D.C., Colombia, 15 de julio de 2004.
- Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases [online]. Recuperado de: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search/list>.
- Duke, J.A.; Bogenschutz-Godwin, M.J.; Du Celliar, J.; Duke, P.A.K.; Handbook of Medicinal Herbs, Ed. 2, CRC Press, Boca Raton, 2002, 139-140.
- EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), Doc. Ref.:MEA/HMPC/179282/2007, *Calendula officinalis* L., flos, London, March, 2008.

- ESCOP MONOGRAPHS. (European Scientific Cooperative on Phytoteraphy). Calendula flos (Calendula flower). 2nd Ed., 2003, 58-61.
- Fonseca, Y.M.; Catini, C.D.; Vicentini, F.T., Nomizo, A.; Gerlach, R.F.; Fonseca, M.J. Protective effect of *C. officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J. Ethnopharmacol.*, 127, 2010, 596-601.
- Galeano, D. F. Optimización de Proceso de Elaboración de Formas Farmacéuticas Líquidas a base de Caléndula, Pasiflora, Saúco y Valeriana. Fundación Laboratorio de Farmacología Vegetal. Bogota D.C., Colombia, (2018).
- García P., Vázquez S., Escolano C. (2010). *Química farmacéutica*. Barcelona, España. REVERTE.
- Grupo Abstract, Optimizamos su Productividad. Soluciones SolidWorks [online]. Recuperado de: https://www.grupoabstract.com/solidworks?gclid=CjwKCAjwmtDpBRAQEiwAC6lm4_SSN4tw_O9mbUxASRBe_Ee0Wz4Mupl_-g8oT-tEhBZo4tXTfWOBB0CUO0QAvD_BwE.
- Ingeniería del Calor. Capitulo III, Cambiadores de calor de serpentines y chaqueta. (2013). Recuperado de: <https://librosdrvaliente.files.wordpress.com/2015/09/capc3adtulo-3-cambiadores-de-calor-de-serpentin-y-chaqueta.pdf>.
- INVIMA, Consulta Datos de Productos, Fitoterapéutico, caléndula.
- Jaric. S., Kostic. O, Mataruga. Z., Pavlovic. M., Mitrovic. M., Pavlovic. P. (2017). Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). *ELSEVIER*, 211. Pag 311-328.
- Jiménez N., Carrillo L., Pujol A., ÁLZATE f., Osorio E., Lara O. (2015). Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia). *ELSEVIER*, 70. pág 272-279.
- KUKLINSKI Claudia, Farmacognosia, Barcelona, Omega S.A., 2001.
- Laboratorio de Farmacología Vegetal LABFARVE. (online). Historia, Bogota D.C.: LABFARVE.<http://www.labfarve.com/index.php/quienes-somos/#nuestra-historia>(URL).

- Lagarto, A.; Bueno, V.; Guerra, I.; Valdés, O.; Vega, Y.; Torres, L.; Acute and subchronic toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 2011, 387–391.
- Lamuela-Raventos R, Vallverdu-Queralt A, Jauregui O, Martinez-Huelamo M, Quifer-Rada P (2014). Improved Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography. In polyphenols in plants; Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR. Arizona, EEUU. Ed. Elsevier Inc.
- Leach, M.J.; *C. officinalis* and wound healing: A systematic review. *Wounds*, 20(8), 2008, 236-243.
- Leaman. D. Bogers, R, Craker, L. y Lange, D. (eds). (2006). *Medicinal and Aromatic Plants*. Holanda: Springer. pág 97.
- Matysik, G.; Wojciak-Kosior, M.; Paduch, R., The influence of *Calendula Officinalis* flos extracts on cells cultures, and the chromatographic analysis of extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 2005, 285-292.
- McCabe, W.L.; Smith, J.C.; Harriot, P. (2007) *Operaciones unitarias en ingeniería química*. 4ª edición. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Muños, J. A. (2014). CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES, EXPRESADOS COMO QUERCETINA TOTAL, EN ALGUNOS EXTRACTOS Y SOLUCIONES DE USO ORAL A BASE DE *Caléndula Officinalis*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.
- Muños, J. A., Morgan, J. E., Trujillo, M. (2015). Validación de una metodología por HPLC para cuantificar quercetina total en extractos de *Caléndula Officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. 49(1):91-102.
- Norma ISO 22716. Garantía de Calidad en los Procesos de Fabricación de Productos Cosméticos (online). Recuperado de: <https://www.icsa.es/laboratoriosanaliticos/consultoria-de-laboratorios/iso-22716>.
- NTC-ISO/IEC 17025. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. ICONTEC. 2005.
- NUEVA VERSIÓN DE LA NORMA ISO 14644. Corporación Científica Venezolana. Norma ISO 14644 partes 1 y 2 revisadas para mejorar la clasificación de limpieza de aire. Caracas, Venezuela, 2016.

- Olivo, F, H. I., & Parra Pedraza, M. J. (2017). Estandarización fisicoquímica de extractos hidroalcohólicos de Ishpingo, Ocotea quixos (Lam). Koste (Bachelor's thesis).
- Orrego, N. Estudio de absorción y disposición de naringenina y quercetina, estudios preclínicos. Universidad de Barcelona. 2016.
- Ortiz, J. P., EVALUACION DE LA PRODUCCION DE ACIDO OLEANOLICO Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE CULTIVOS ELICITADOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Calendula officinalis*, UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN, 2011.
- Patrick, K.F.; Kumar, S.; P. A. D. Edwardson, P.A.; Hutchinson, J.J.; Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. *Phytomedicine*, 3(1), 1996, 11-18.
- Piñeros, J; Garcia, H; Iregui, A; Prias, E; Perdomo, C; Puerta, H. F. PLANTAS MEDICINALES, compendio de farmacología vegetal, Escuela de Medicina Juan N. Corpas. Bogota, Clombia, 1992.
- Quinn, M.E., Sheskey, P.J., Rowe, R.C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Ed. Pharmaceutical Press, 2009. Italia. Pp. 441-445, 596-598.
- PRATS Gravet Soledad, RODRIGUEZ Galán Inés, ROIG Montblanch Alfredo, SALAZAR Macián Ramón, SALVADO Llados Ma. Angeles, SELLES Flores Eugenio, SANCHEZ Morcillo José, SOLAN Marsa Concepción, SUIÑE Negre Joseph, TICO Grau Joseph, Tratado de Farmacia Galénica, Madrid, 1992.
- Preethi, K.C.; Kuttan, R.; Wound healing activity of flower extract of *Calendula Officinalis*. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.*, 20(1), 2009, 73-79.
- Radioza, S.A.; Iurchak, L.D.; Antimicrobial activity of *Calendula L.* plants. *Mikrobiol. Z.*, 69, 2007, 21-25.
- Ramos, A.; Edreira, A.; Vizoso, A.; Betancourt, J; López, M.; Décalo, M.; Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 1998, 49–55.
- Rawat P., Kumar P., Kumar V. (2016). Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *ELSEVIER*, 6(3). pág 107-118.

- Roopashree, T.S.; Raman, D.; Shobba, R.RH.; Narendra, C.; Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, 1(3), 2008, 20-28.
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, et al. (2013). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581.
- Silva, E.J.; Concalves, E.S.; Aquiar, F.; Evencio, L.B.; Lyra, M.M.; Coelho, M.C.; Fraga, M.C.; Wanderly, A.G.; Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula Officinalis* L. *Phytotherapy Research*, 21, 2007, 332–336.
- Skood DA, Holler FJ, Nieman TA (1992). *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición. España. Ed. Interamericana de España S.A.U.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, (2017), *Farmacopea de los Estados Unidos de América – Formulario Nacional – USP 40 NF 35*, Estados Unidos de América, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Vol I.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, (2017), *Farmacopea de los Estados Unidos de América – Formulario Nacional – USP 40 NF 35*, Estados Unidos de América, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Vol IV.
- Ulbricht, C.; Basch, E.; Bent, S.; Foppa, I.; Haskmi, S; Kroll, D.; Mele, M.; Szapary, P.; Vora, M.; Yong, S., *Marigold (Calendula officinalis L.): An Evidence-Based Systematic Review by the Natural Standard Research Collaboration*, *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, Vol. 6, 2006, 135-159.
- Ukiya, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H.; Suzuki, T.; Kimura, Y.; Antiinflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*C. Officinalis*) flowers. *J. Nat. Prod.*, 69, 2006, 1692-1696.
- Valdes. L, H., \$ Piquet Garcia, R. (1999). *Caléndula Officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia*, 33(3), 188 – 194.
- Villamizar, M. A. REDISEÑO DE LOS EQUIPOS DE MACERACION Y FILTRACION USADOS EN EL PROCESO DE FABRICACION DE FORMAS FARMACEUTICAS LIQUIDAS (GOTAS) EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGIA VEGETAL LABFARVE. Universidad de Pamplona – Fundacion Laboratorio de Farmacologia Vegetal Labfarve. Bogota D.C., Colombia, (2018).

VOIGT Rudolf, Tratado de tecnología Farmacéutica. España: Acriba, 1982.

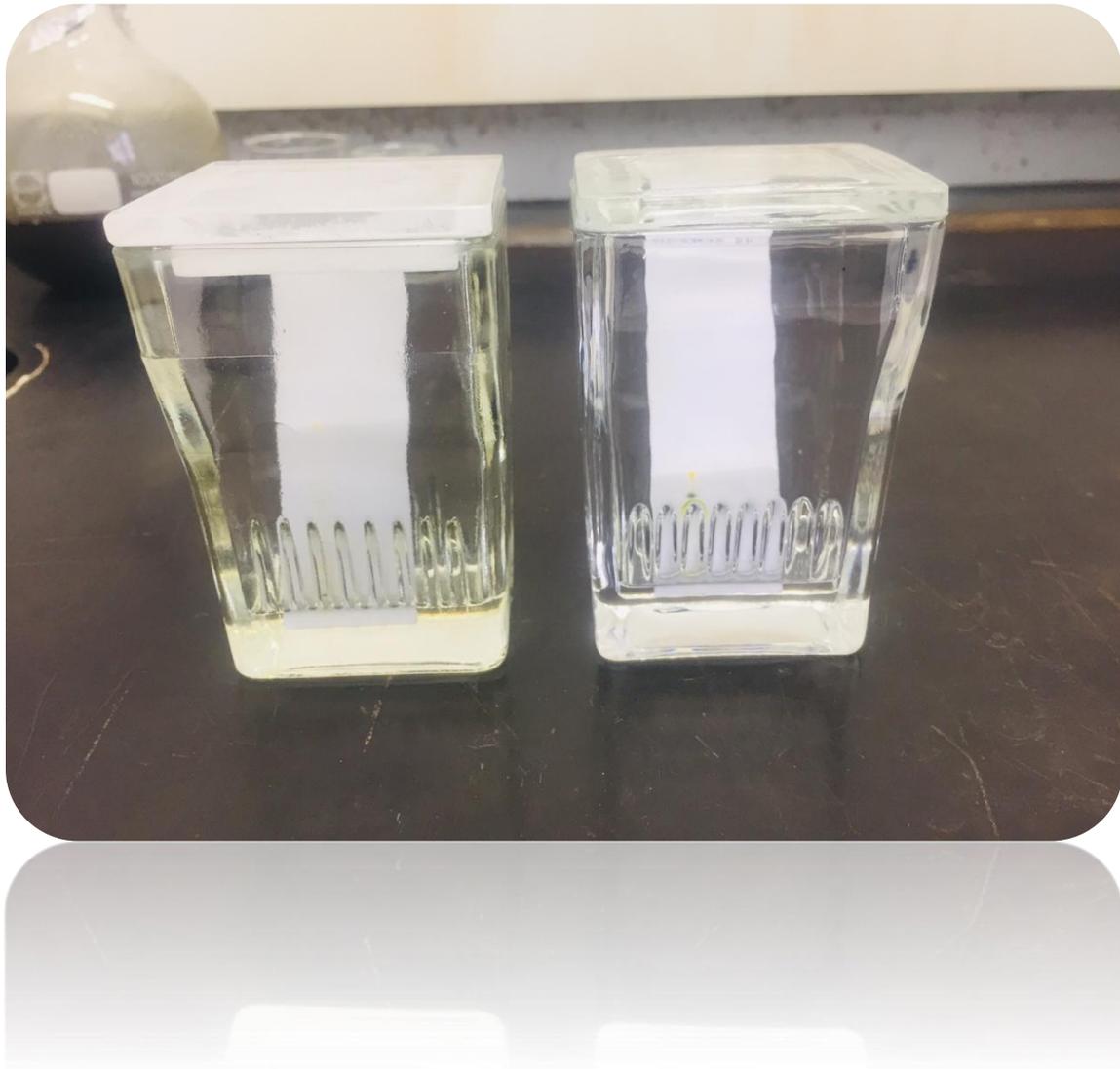
Wagner. H, Blandt. S, Plant Drug Analysis, Springer, 1996. Determinación de Flavonoides. Pags. 195 – 198, 216, 217.

WHO Monographs on selected medicinal plants, Geneva, Vol 2., 2002, 35 - 42.

Zitterl-Eglseer, K.; Sosa, S.; Jurenitsch, J.; et al. Anti-edematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol*, 57(2), 1997, 139 - 144.

ANEXOS

Anexos 1. Cámaras Cromatográficas para la CCD.

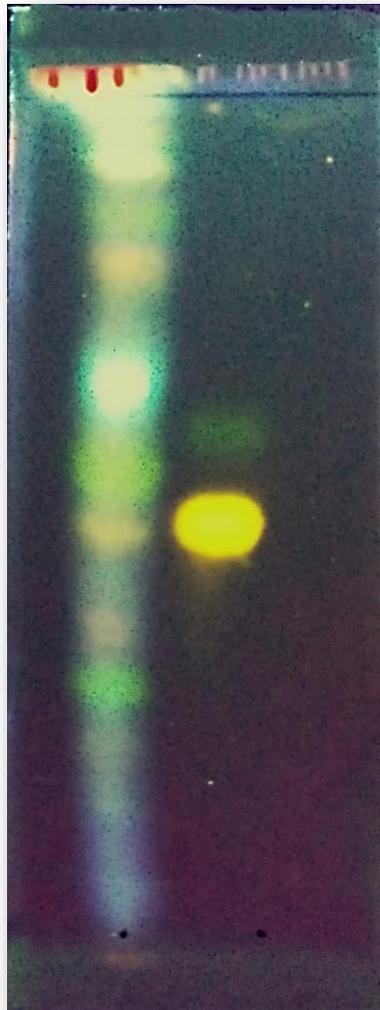


Anexos 2. Apertura de los Tamices Utilizados para la Granulometría.

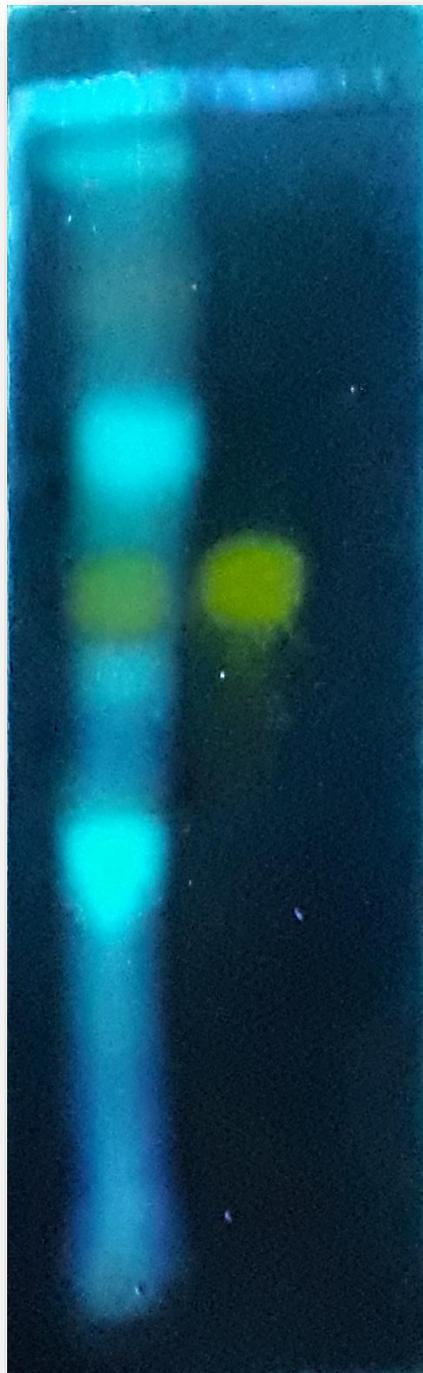
Tamiz	Apertura (in)	Apertura (mm)	Apertura (μm)
20	0,0331	0,84	841
40	0,0165	0,42	419
60	0,0098	0,25	249
80	0,007	0,18	178
100	0,0059	0,15	150

→ Tamaño de Partícula
→ 50 - 70 % de Retención

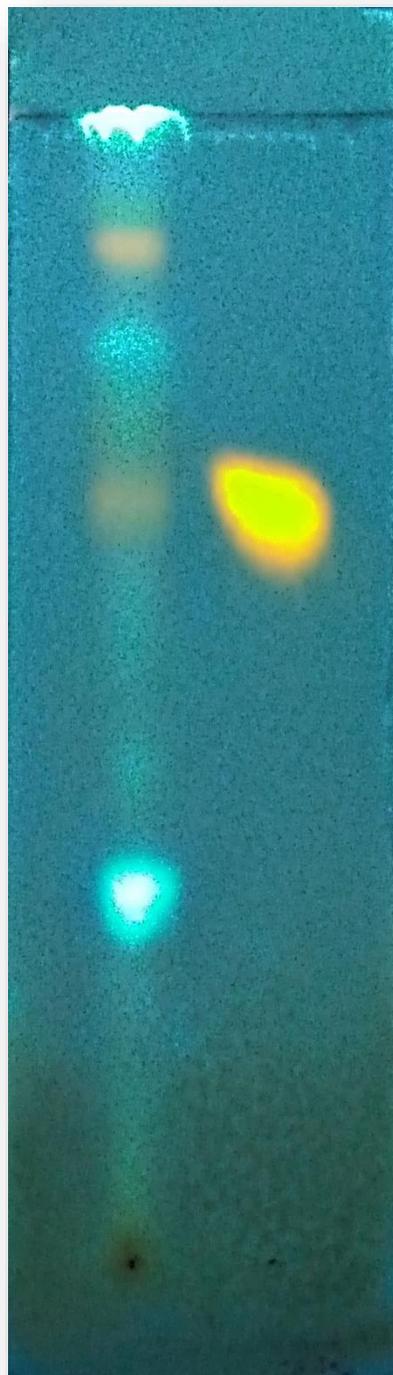
Anexos 3. Placa Cromatográfica de la Planta Pulverizada de Caléndula.



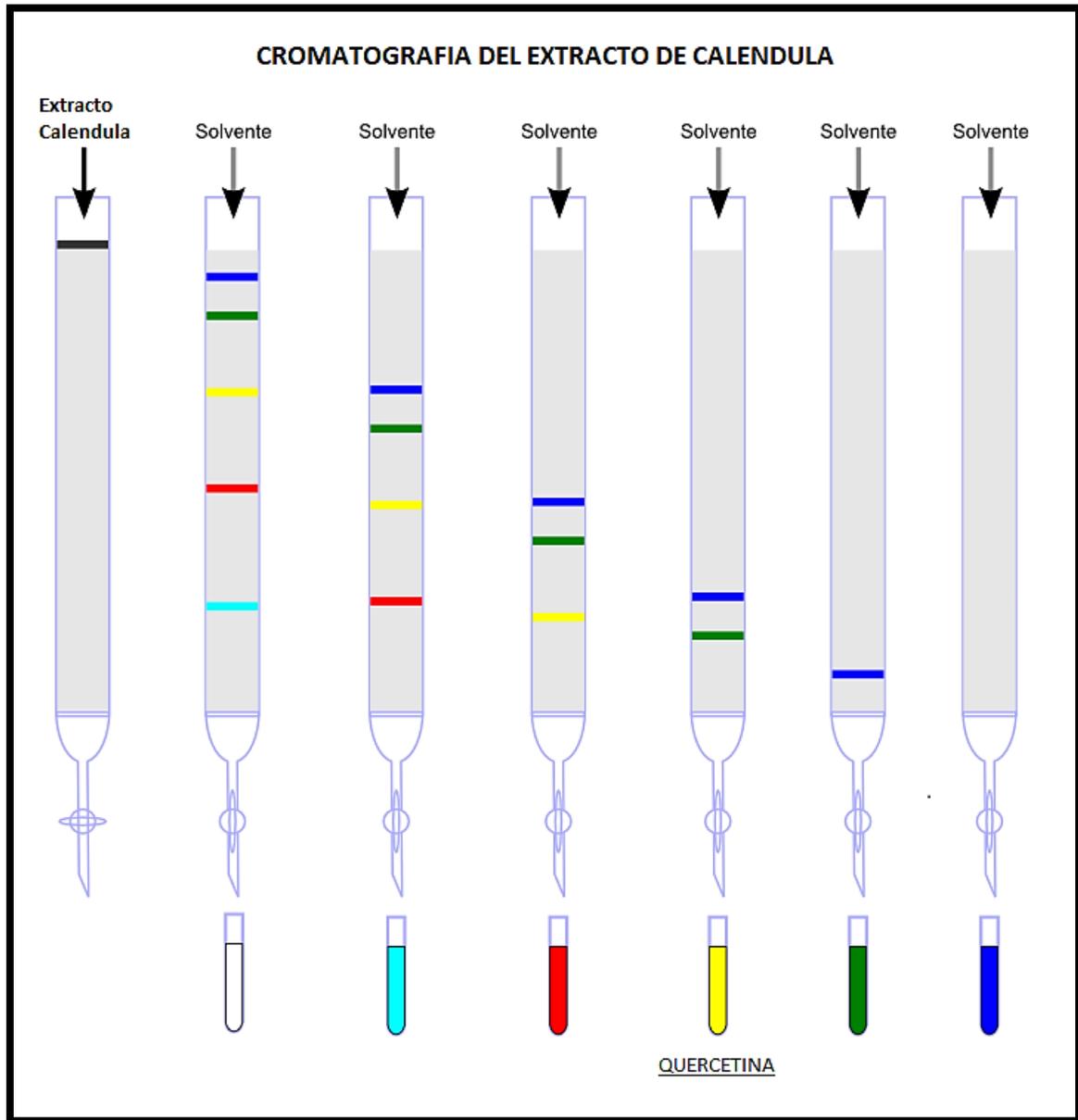
Anexos 4. Placa Cromatográfica de la Tintura de Caléndula.



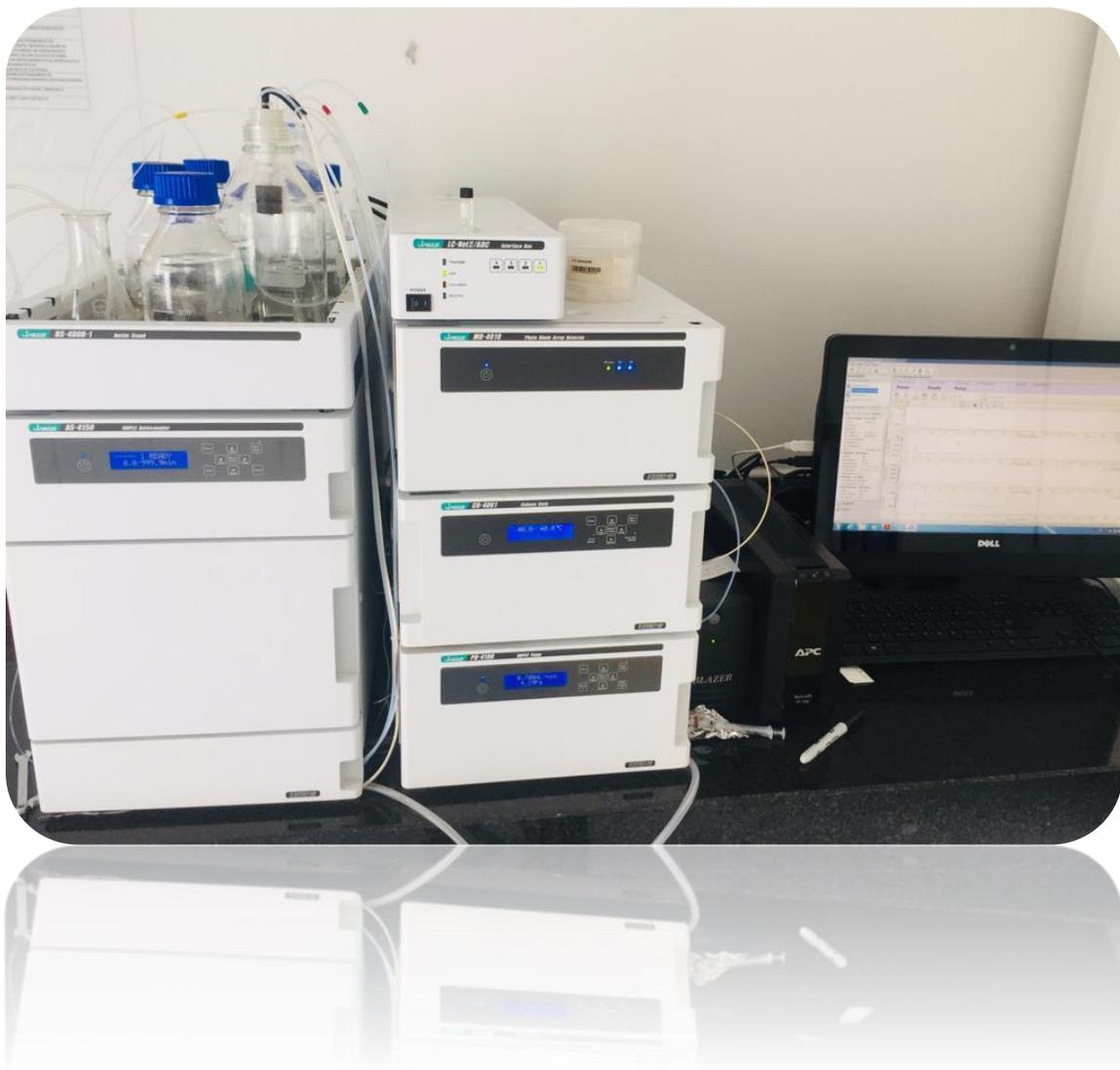
Anexos 5. Placa Cromatográfica del Extracto Fresco de Caléndula.



Anexos 6. Cromatografía del Extracto de Caléndula.



Anexos 7. Cromatógrafo JASCO EXTREMA.



Anexos 8. Rellenos de Columnas (USP 40, NF 35).

Longitud (L, mm)	Diámetro de la Columna (dc, mm)	Tamaño de Partícula (dp, µm)	Valores Relativos				
			L/dp	F	N	Presión	Tiempo de Corrida
250	4,6	10	25 000	0,5	0,8	0,2	3,3
150	4,6	5	30 000	1,0	1,0	1,0	1,0
150	2,1	5	30 000	0,2	1,0	1,0	1,0
100	4,6	3,5	28 600	1,4	1,0	1,9	0,5
100	2,1	3,5	28 600	0,3	1,0	1,9	0,5
75	4,6	2,5	30 000	2,0	1,0	4,0	0,3
75	2,1	2,5	30 000	0,4	1,0	4,0	0,3
50	4,6	1,7	29 400	2,9	1,0	8,5	0,1
50	2,1	1,7	29 400	0,6	1,0	8,5	0,1

Anexos 9. Desgasificación de los Solvente con Ultrasonido.



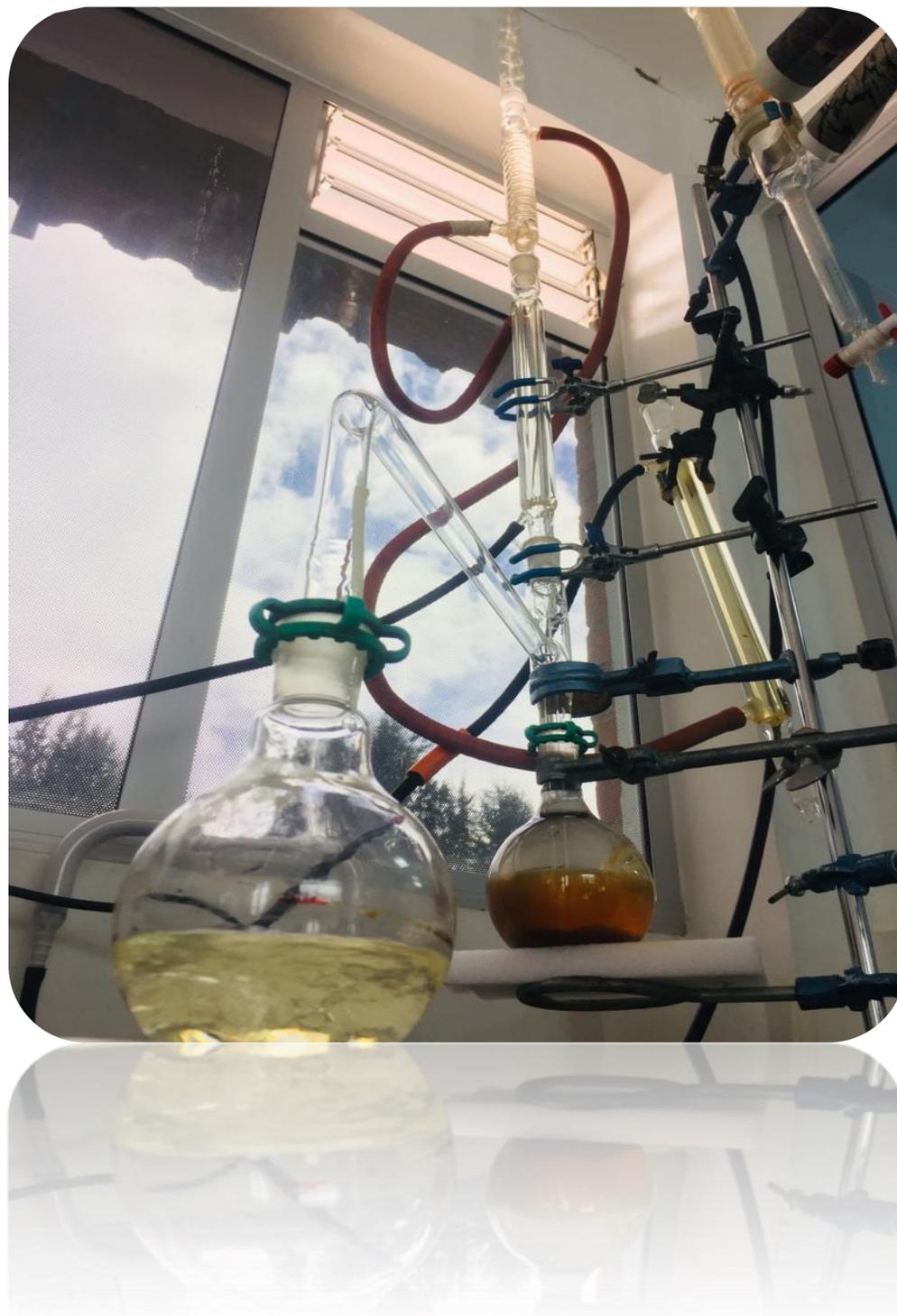
Anexos 10. Sistema de Filtración por Membrana 0,45 μm para Solventes.



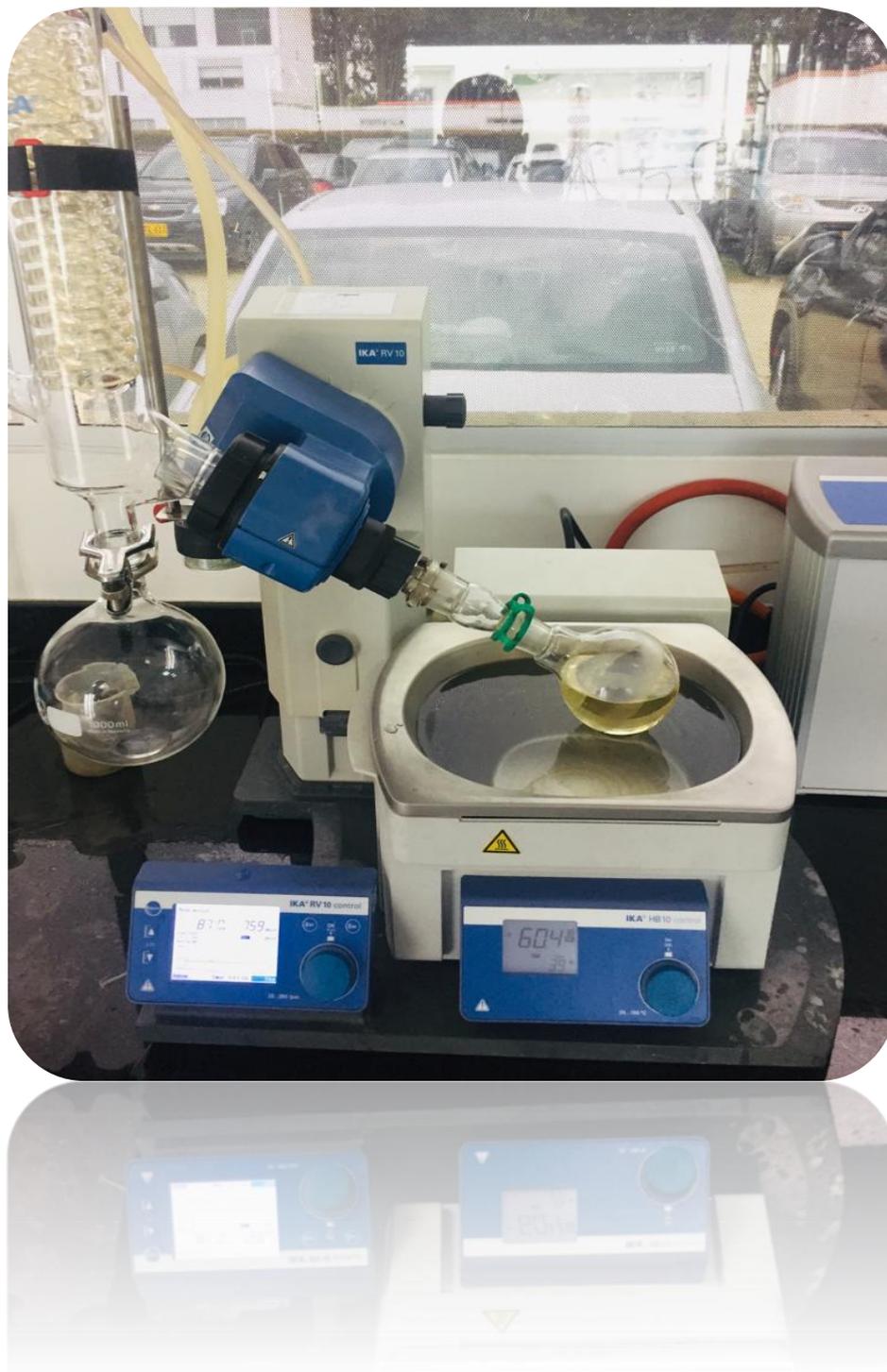
Anexos II. Hidrolisis Acida del Extracto Hidroalcohólico de C. Officinalis.



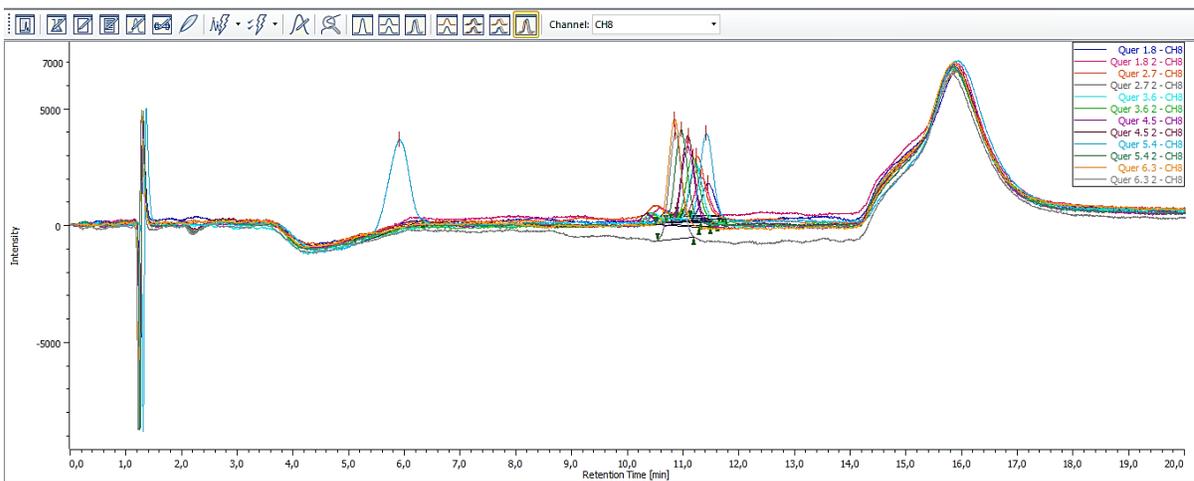
Anexos 12. Fraccionamiento Líquido – Líquido del Extracto de *C. Officinalis* con Éter Etilico.



Anexos 13. Rotaevaporador para la Concentración y Purificación de la Quercetina.



Anexos 14. Cromatogramas de las Soluciones Patrón para la Curva de Calibración.



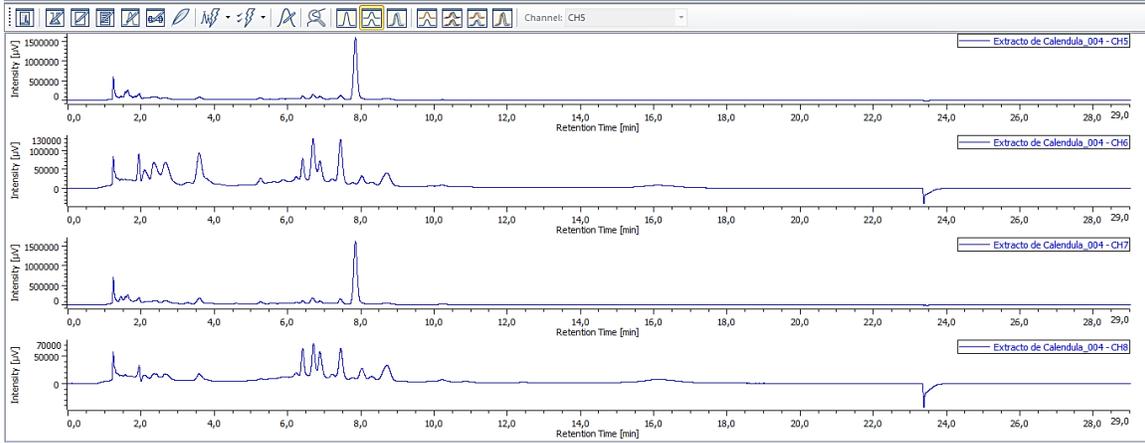
Anexos 15. Datos Obtenidos para la Curva de Calibración.

DATOS CURVA DE CALIBRACION				
Concentraciones (ppm)		Tiempo de Retención (min)	Altura (μUA)	Área (μUA)
1,8	1	11,44	1547	26270
	2	11,312	1668	29336
2,7	1	11,233	2541	45401
	2	11,23	2377	38869
3,6	1	11,232	2564	44100
	2	11,163	2733	44937
4,5	1	11,075	3400	56930
	2	11,082	3688	61659
5,4	1	11,403	3649	59315
	2	10,962	3980	61632
6,3	1	10,842	4568	72064
	2	10,852	4545	71175

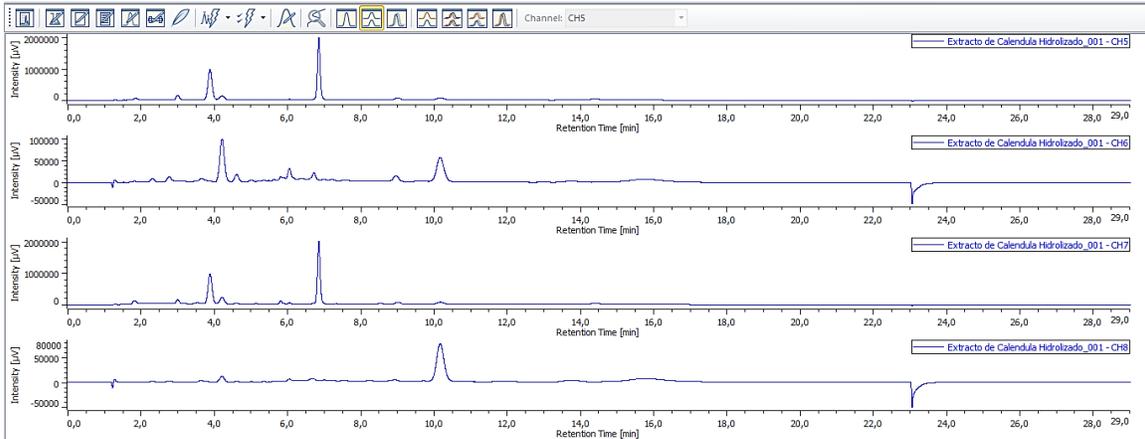
Anexos 16. Datos de la Regresión y Suavidad de la Curva, obtenidos del Software GraphPadPrism.

Best-fit values	
Slope	8391 ± 339,7
Y-intercept when X=0.0	16096 ± 1471
X-intercept when Y=0.0	-1,918
1/slope	0,0001192
95% Confidence Intervals	
Slope	7448 to 9334
Y-intercept when X=0.0	12011 to 20181
X-intercept when Y=0.0	-2,696 to -1,293
Goodness of Fit	
R square	0,9935
Sy.x	1279
Is slope significantly non-zero?	
F	610,2
DFn, DFd	1,000, 4,000
P value	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	6
Number of missing values	0

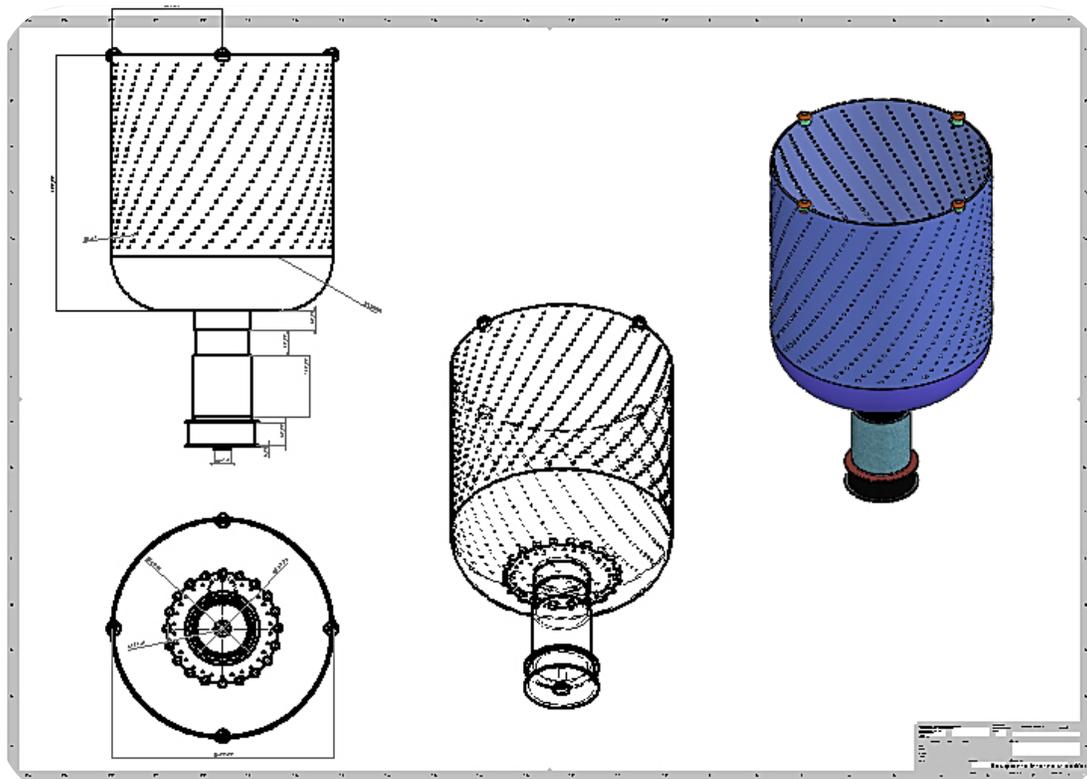
Anexos 17. Cromatogramas del Extracto de Caléndula a Diferentes Longitudes de Onda CH8 = 370 nm “Optima”.



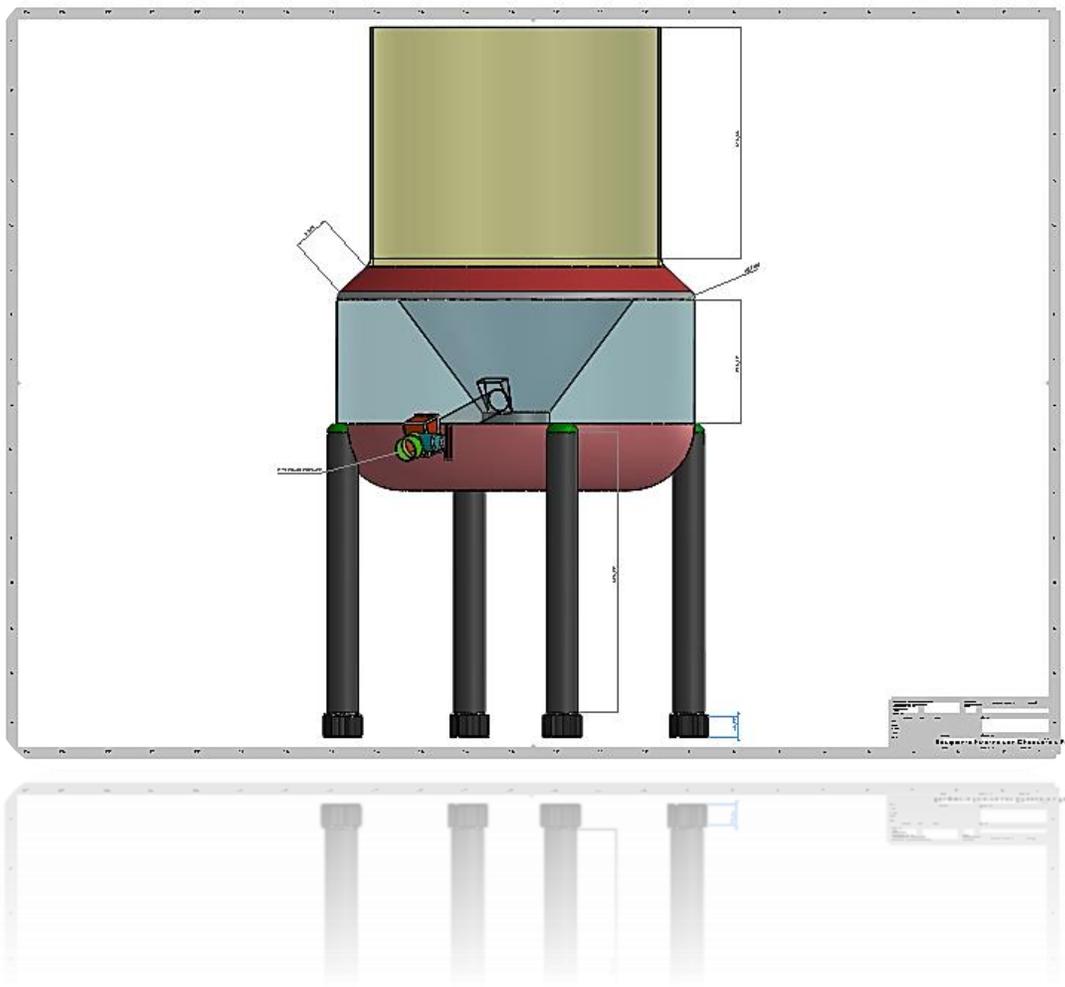
Anexos 18. Cromatogramas del Extracto de Caléndula Hidrolizado a Diferentes Longitudes de Onda CH8 = 370 nm “Optima”.



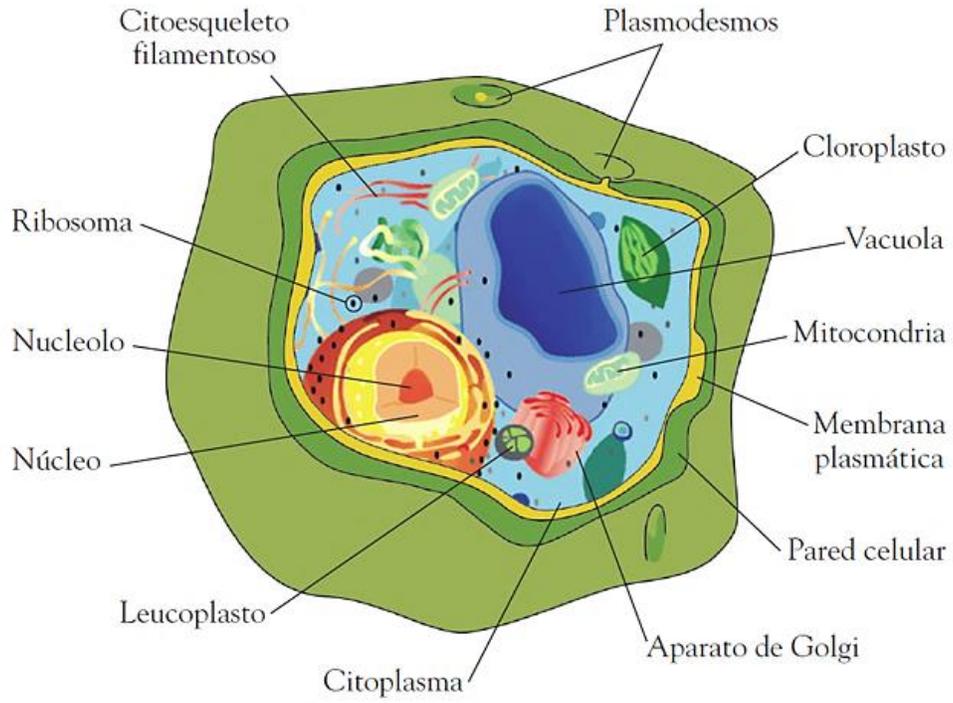
Anexos 19. Medidas Recipiente Interno [mm].



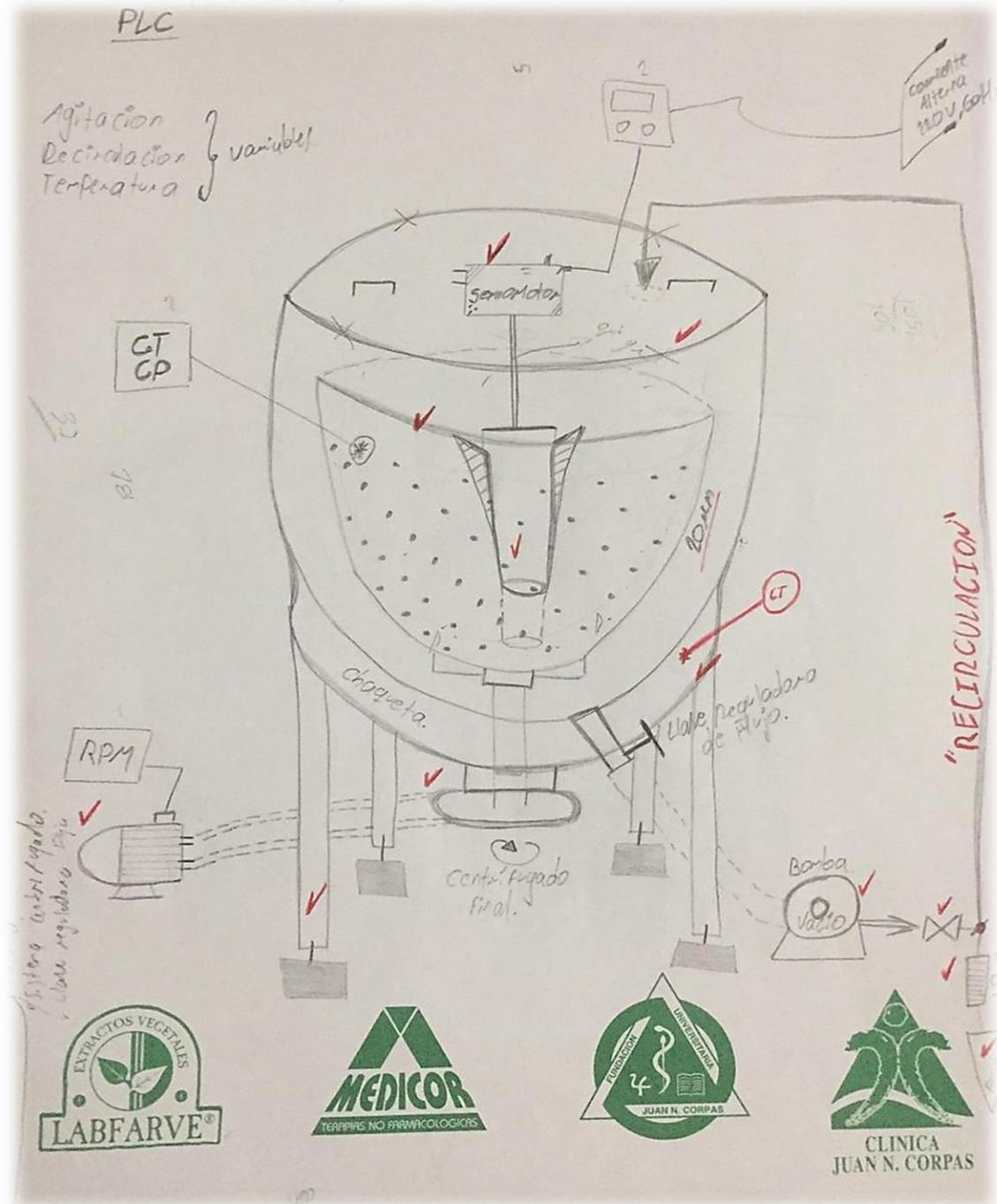
Anexos 20. Medidas Recipiente Externo en [mm].



Anexos 21. Estructura de una Célula Vegetal.



Anexos 22. Trazo Final en Papel del Diseño del Percolador.



Anexos 23. Pruebas de Laboratorio para Diseño Experimental.

