

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**ESTANDARIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO DE CALÉNDULA
(*Calendula officinalis*)**

AUTORAS:

AMAGUAÑA ROJAS FERNANDA JOCELYN

CHURUCHUMBI ROJAS ERIKA FERNANDA

TUTORA:

TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, septiembre del 2018

Cesión de derechos de autor

Nosotras, Fernanda Jocelyn Amaguaña Rojas, con documento de identificación N° 172440049-2, y Erika Fernanda Churuchumbi Rojas con documento de identificación N° 172596027-0 , manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Estandarización fitoquímica del extracto de Caléndula (*Calendula officinalis*)” mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de : Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en forma impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....

Nombre: Fernanda Jocelyn Amaguaña Rojas

Cédula: 172440049-2



.....

Nombre: Erika Fernanda Churuchumbi Rojas

Cédula: 172596027-0

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Estandarización fitoquímica del extracto de Caléndula (*Calendula officinalis*)” realizado por Fernanda Jocelyn Amaguaña Rojas y Erika Fernanda Churuchumbi Rojas, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, agosto del 2018



Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta

Cédula: 171166801-0

Dedicatoria

A mis padres América Rojas y Gustavo Amaguaña, quienes me han brindado su apoyo incondicional, sus enseñanzas, amor, consejos, y me han motivado a ser mejor persona cada día y son parte esencial de este logro.

A mis hermanos Sandra y Joffre, que estuvieron presentes en mi formación académica, brindarme sus consejo y cariño.

A mis sobrinos Francisco y Adrián, por brindarme su apoyo y su amor en los momentos difíciles.

A Marco por ser mi compañero incondicional durante esta etapa de mi vida.

Jocelyn Amaguaña Rojas.

Quiero dedicar este trabajo de titulación primeramente a Dios por las bendiciones recibidas durante toda mi vida.

A mis padres Guillermo Churuchumbi y Blanquita Rojas, por apoyarme para alcanzar con una meta más en mi vida, gracias por sus consejos, ejemplo y ánimos para superar obstáculos que se han presentado.

A mis hermanas, Sisa y Yarina, mi hermano Sumak quienes son mi fortaleza de cada día, gracias por sus ánimos, motivación y cariño incondicional.

A mi mejor amigo Javier, mis amigos y amigas de la Universidad, a toda mi familia, personas importantes en mi vida.

Erika Churuchumbi Rojas

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana, por permitir nuestra formación académica, y otorgarnos las herramientas, conocimientos y valores para alcanzar nuestras anheladas metas.

A nuestra excelente tutora Ing. Tatiana Mosquera M.Sc, por permitirnos ser parte de su proyecto, por compartir su conocimiento con nosotras, su cariño, persistencia, paciencia y guiarnos para la culminación de este trabajo.

A nuestros amigos y familiares que nos prestaron ayuda durante toda nuestra trayectoria universitaria.

Índice

Introducción.....	1
Capítulo I	4
1. Marco Teórico.....	4
1.1 Caléndula (<i>Calendula officinalis</i>).....	4
1.1.1 Descripción botánica.....	5
1.1.2 Condiciones de desarrollo.....	5
1.1.3 Propiedades farmacológicas y usos	6
1.1.4 Propiedades Nutricionales	7
1.2 Metabolitos secundarios	7
1.2.1 Antioxidantes	8
1.2.2 Compuestos fenólicos o polifenólicos	9
1.2.2.1 Propiedades de los compuestos fenólicos	10
1.3 Clasificación de extractos vegetales	11
1.3.1 Métodos de obtención de extractos vegetales.....	12
1.3.2 Parámetros que influyen en la obtención de extractos vegetales.	15
1.4 Estandarización de extractos vegetales.....	15
1.4.1 Importancia	16
1.4.2 Uso de extractos vegetales estandarizados	17
Capítulo II.....	20
2. Materiales y métodos	20
2.1 Recolección del material vegetal.....	20

2.2 Limpieza, desinfección y secado del material vegetal	20
2.3 Control de calidad del material vegetal	21
2.3.1 Control físico-químico	22
2.3.2. Control microbiológico	28
2.4 Obtención de extractos fluidos	30
2.4.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos	30
2.4.2 Obtención de extractos hidroglicéricos.....	32
2.5 Control de calidad de los extractos.....	33
2.5.1 Determinación organoléptica	33
2.5.2 Determinación de pH	35
2.5.3 Determinación de índice de refracción	36
2.5.4 Determinación de densidad relativa.....	37
2.5.5 Determinación de sólidos totales	38
2.6 Determinación microbiológica	40
2.7 Cuantificación de polifenoles totales.....	40
2.7.1 Elaboración de la curva de calibración del ácido gálico.....	41
2.7.2 Cuantificación de fenoles en los extractos.....	42
2.8 Actividad antioxidante.....	43
2.9 Análisis estadístico	43
Capítulo III	45
3. Resultados y discusión	45
3.1 Control de Calidad del Material Vegetal	45

3.1.1 Control Físico- químico	45
3.1.2 Control microbiológico	47
3.2 Diseño experimental	47
3.3 Obtención de extractos fluidos	48
3.4 Control de calidad de los extractos	49
3.4.1 Ensayo organoléptico.....	49
3.4.2 Ensayo físico- químico	51
3.6 Cuantificación de compuestos fenólicos	54
3.7 Análisis Estadístico.....	55
3.8 Análisis de resultados con extracto comercial.....	58
Capítulo IV.....	60
4. Conclusiones y recomendaciones.....	60
4.1 Conclusiones.....	60
4.2 Recomendaciones	62
Bibliografía	63
Anexos	72

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Calendula officinalis</i>	4
Tabla 2 Clasificación de los Compuestos Fenólicos	10
Tabla 3. Parámetros que influyen en la obtención de extractos vegetales	15
Tabla 4. Métodos de Ensayo para material vegetal.....	22
Tabla 5. Método de Ensayo para determinación materia extraña	22
Tabla 6 Método de Ensayo para determinación del contenido de humedad ..	23
Tabla 7 Método de Ensayo para determinación cenizas totales.....	25
Tabla 8 Método para determinación de cenizas insoluble en Ácido Clorhídrico.	26
Tabla 9 Método de Ensayo para determinación de cenizas solubles en agua	27
Tabla 10. Equipos, materiales e insumos para el control microbiológico.....	28
Tabla 11. Materiales y equipos para obtención de extractos hidroalcohólicos.	30
Tabla 12. Equipo y reactivos para determinación de pH	36
Tabla 13. Equipo y reactivos para la determinación de densidad relativa.	38
Tabla 14. Equipos y reactivos para determinación de sólidos totales.....	39
Tabla 15. Equipos, reactivos y materiales para la cuantificación de polifenoles totales.	40
Tabla 16. Control de calidad físico-químico del material vegetal.	45
Tabla 17. Control microbiológico del material vegetal.....	47
Tabla 18. Diseño experimental.....	48
Tabla 19. Ensayo organoléptico de los extractos fluidos de <i>Calendula officinalis</i>	50
Tabla 20. Determinación físico-químico de extractos hidroalcohólico	51

Tabla 21. Determinación físico-químico de los extractos hidroglicéricos.....	52
Tabla 22. Análisis estadístico de pH.....	52
Tabla 23. Análisis microbiológico de los extractos	54
Tabla 24. Curva de calibración para fenoles totales con ácido gálico	54
Tabla 25. Resultados mg ácido gálico/mL de extracto	55
Tabla 26. Análisis de varianza para las variables y sus interacciones.	56
Tabla 27. Estadística descriptiva de tratamientos	56
Tabla 28. Tipo de Material Vegetal	57
Tabla 29. Tipo de extracto.....	57
Tabla 30 Comparación extracto hidroalcohólico vs extracto comercial.	58

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Calendula officinalis</i>	5
Figura 2. Clasificación de los métodos de obtención de extractos vegetales	12
Figura 3. Proceso de Limpieza, desinfección y secado del material vegetal	21
Figura 4. Determinación de materia extraña	23
Figura 5. Determinación del contenido de humedad	24
Figura 6. Determinación de cenizas totales.....	25
Figura 7 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	26
Figura 8 Diagrama de flujo determinación de cenizas en agua	27
Figura 9. Diagrama de flujo para el Control Microbiológico.	29
Figura 10. Diagrama de flujo de obtención del extracto hidroalcohólico....	31
Figura 11. Diagrama de flujo de obtención del extracto hidroglicéricos.....	32
Figura 12. Escala Tonal.....	34
Figura 13. Escala de colores.....	34
Figura 14. Escala de Percepciones olfativas	35
Figura 15. Diagrama de flujo determinación del pH.....	36
Figura 16. Diagrama de flujo determinación el índice de refracción.....	37
Figura 17. Diagrama de flujo densidad relativa	38
Figura 18. Diagrama de flujo determinación sólidos totales.....	39
Figura 19. Diagrama de flujo Curva del ácido gálico	41
Figura 20. Diagrama de flujo Cuantificación Fenoles en los extractos	42
Figura 21. Gráfica de Absorbancia vs la Concentración.....	55

Índice de anexos

Anexo 1. Análisis de control de calidad del material vegetal.....	72
Anexo 2. pH de los extractos de <i>Calendula officinalis</i>	75
Anexo 3. Índice de refracción de los extractos de <i>Calendula officinalis</i>	76
Anexo 4. Densidad (g/cm ³) de los extractos de <i>Calendula officinalis</i>	77
Anexo 5. Porcentaje de sólidos totales de los extractos de <i>Calendula officinalis</i>	78
Anexo 6. Ficha técnica del extracto comercial	79
Anexo 7. Ficha técnica del extracto de <i>Calendula officinalis</i> estandarizado.	80

Resumen

Los extractos naturales elaborados para el uso en la cosmética natural de manera empírica en su mayoría son de venta libre sin ninguna ficha técnica que avale las características del producto. El presente trabajo realizó la estandarización fitoquímica del extracto de Caléndula (*Calendula officinalis*) mediante la evaluación de la concentración de fenoles totales, en los diferentes extractos obtenidos mediante dos técnicas diferentes: percolación y maceración con sus variables relacionadas al tiempo y estado del material vegetal. Se evaluaron 8 extractos, cuatro de maceración y cuatro de percolación. Para la cuantificación de fenoles totales se utilizó el método Folin–Ciocalteu y el análisis de ANOVA conjuntamente con el test de Tukey al 5 % se demostró que existe diferencia significativa entre los 8 extractos evaluados. Resultando que el extracto con mayor contenido de fenoles totales expresados en mg de ácido gálico, corresponde al extracto hidroalcohólico obtenido mediante la técnica de percolación realizada en 24 horas utilizando flores secas, el valor de fenoles de este extracto fue 5,98 mg equivalente de ácido gálico/mL de extracto, mientras el tratamiento con menor contenido de fenoles, corresponde al extracto hidroglicérico obtenido mediante la técnica de maceración por un tiempo de 5 días utilizando flores frescas, el valor de fenoles de este extracto fue 1,29 mg equivalente de ácido gálico /mL de extracto, concluyendo que el contenido fenólico del extracto de *Calendula officinalis* está relacionado con la técnica, el tiempo y el estado del material vegetal.

Palabras claves: *Calendula officinalis*, extractos, fenoles, ácido gálico.

Abstract

The natural extracts elaborated for use in natural cosmetics in an empirical way are for the most part available over the counter without any technical data sheet that supports the characteristics of the product. The present work carried out the phytochemical standardization of the extract of Calendula (*Calendula officinalis*) by means of the evaluation of the concentration of total phenols, in the different extracts obtained by two different techniques: percolation and maceration with its variables related to the time and state of the plant material. 8 extracts were evaluated, four of maceration and four of percolation. For the quantification of total phenols the Folin-Ciocalteu method was used and the analysis of ANOVA together with the Tukey test at 5 % showed that there is a significant difference between the 8 evaluated extracts. As a result, the extract with the highest content of total phenols expressed in mg of gallic acid corresponds to the hydroalcoholic extract obtained by the percolation technique performed in 24 hours using dried flowers, the phenolic value of this extract was 5,98 mg equivalent of acid gallic / mL of extract, while the treatment with lower content of phenols, corresponds to the hydroglyceric extract obtained by the maceration technique for a period of 5 days using fresh flowers, the value of phenols of this extract was 1,29 mg equivalent of acid gallic / mL extract, concluding that the phenolic content of *Calendula officinalis* extract is related to the technique, time and condition of the plant material.

Key words: *Calendula officinalis*, extracts, phenols, gallic acid.

Introducción

En la actualidad la tendencia por el uso o aplicación de productos naturales se encuentra en auge debido a que la mayoría de las empresas industriales están enfocándose en el desarrollo de productos saludables para así satisfacer la demanda del mercado que cada vez se interesa en adquirir productos de origen natural por su enfoque holístico de bienestar.

Ecuador es considerado a nivel mundial como un país con una gran biodiversidad y gracias a esta característica se puede obtener una gran variedad de productos naturales destinados al consumo directo y a la industria, entre estos productos se destacan los extractos naturales a partir de plantas medicinales. Se estima que el 80 % de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales, para la atención primaria de la salud y bienestar (Ansalini & Wilches, 2010).

Con el paso de los años, en el Ecuador se encontró una variedad de productos naturales a partir de plantas medicinales, donde los pueblos aborígenes las utilizaban con fines terapéuticos para todo tipo de enfermedades. Durante siglos los productos naturales han sido utilizadas en forma empírica por sus principios activos (Naranjo & Coba, 2003).

Los extractos naturales elaborados de manera empírica en su mayoría son de venta libre sin ninguna ficha técnica que avale las características del producto. Hasta hace pocos años en el Ecuador el uso, preparación y comercio de las plantas medicinales y sus presentaciones fitofarmacéuticas se establecían esencialmente en recopilaciones botánicas y estudios antropológicos sin fundamento científico, siendo la base para que pequeñas empresas locales se dediquen a envasar plantas trituradas o en polvo, en

muestras únicas o combinadas o en forma de extractos acuosos o alcohólicos (Berdonces, 2009).

En la actualidad la situación ha variado notablemente, en el país se cuenta con una legislación que respalda el uso, preparación y comercio de las plantas medicinales y sus preparaciones farmacéuticas, la misma que está regulada por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA, 2014), establece los requisitos para la inscripción del registro sanitario de productos naturales y procesados de uso medicinal nacional, a fin de obtener extractos naturales estandarizados para definir su calidad constante la cual es necesaria para garantizar los ensayos fitoquímicos y por ello es indispensable certificar mediante una ficha técnica que contenga especificaciones de control de calidad.

Según conocimiento etnobotánico la *Calendula officinalis* es ampliamente utilizada como antiinflamatorio, antiséptico, astringente, estimulante hepático. Las flores se emplean en caso de acné, golpes, torceduras, eczemas, quemaduras, irritaciones cutáneas (Castro, y otros, 2013)

Entre los grupos fitoquímicos más importantes de la especie vegetal mencionada, se encuentran los carotenoides y los flavonoides. El contenido de flavonoides totales en las flores es 0,88 y 0,33 % y un contenido de carotenoides totales en las flores es de 0,078 y 0,017 % (Lastra & Piquet, 2015).

En estudios farmacológicos realizados con extractos a partir de las flores de *Calendula officinalis* se han detectado propiedades antiinflamatorio, antiséptico, astringente que se informan en la medicina tradicional; así tenemos que Dumenil (1980) plantea que los extractos etanólicos al 80 % presentaron actividad antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *S. fecalis*. Omelchuk, Krivut, & Volroshilov (1984) y

Fleischner (1985) realizaron estudios en los que se demostró la propiedad antiinflamatoria de extractos de *Calendula officinalis*. Michel (1977) demostró el poder cicatrizante de los extractos de *Calendula officinalis* en animales de experimentación y en humanos Ubeeveva (1987) plantea el uso de extracto de polifenoles totales, el cual mostró un marcado efecto colagogo en ratas al ser administrado en dosis de 0,05 kg/día y también resultó beneficioso en el tratamiento de hepatitis inducida por tetracloruro de carbono.

En función a lo planteado, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general estandarizar fitoquímicamente extractos de Caléndula (*Calendula officinalis*) y como objetivos específicos: establecer un diseño experimental que combine todas las variables en el proceso de obtención de extractos, obtener extractos a partir de flores de *Calendula officinalis* mediante la combinación de las variables de los tratamientos y cuantificar el contenido de fenoles totales en los extractos *Calendula officinalis* para definirlo como base de la estandarización.

Se plantearon las siguientes hipótesis: La hipótesis de investigación (Hi) existe diferencia significativa en la cantidad de fenoles totales entre tratamientos planteados en la investigación, la hipótesis (Ho) que no existe diferencia significativa en la cantidad de fenoles totales entre tratamientos.

Capítulo I

1. Marco Teórico

1.1 Caléndula (*Calendula officinalis*)

La Caléndula (*Calendula officinalis*) pertenece a la familia Asteraceae, es una especie herbácea la cual podemos encontrar en la región mediterránea, ubicando su centro de origen en Egipto. Es conocida desde la época de los antiguos griegos, y con anterioridad por los hindúes y los árabes por sus cualidades terapéuticas como una hierba medicinal (Moore, Sánchez, & Desmarchelier, 2005).

Otros autores como (Muley, Khadabadi, & Banarase, 2009) mencionan que la *Calendula officinalis* es una especie originaria de Centro y Sur de Europa, Asia occidental y los EE. UU.

Tabla 1

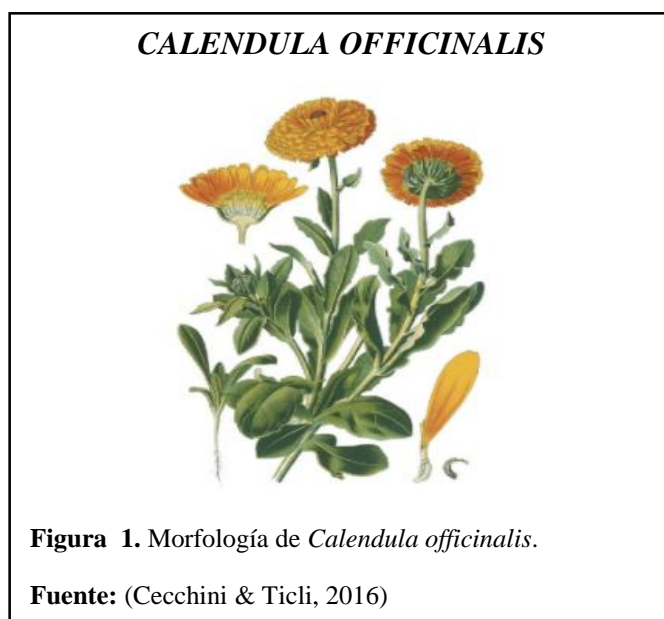
Clasificación taxonómica de *Calendula officinalis*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Calendula</i>
Especie:	<i>Calendula officinalis</i> L.
Nombre Común:	Caléndula, botón de oro, mercadela o maravilla.

Fuente: (Muñoz, 2004).

1.1.1 Descripción botánica

La planta del género *Calendula* (figura 1) presenta un tallo erecto y tubular, de 30 a 50 cm de altura, ramificado en la parte inferior, tiene hojas alternas, con un margen entero o ligeramente dentado, de consistencia suculenta. Sus flores están en capítulos de color amarillento o naranja, con un pedúnculo floral pubescente de hasta 18 cm, mientras que sus frutos son unos aquenios cóncavos y acanalados (Cecchini & Ticli, 2016).



1.1.2 Condiciones de desarrollo

La planta de *Calendula officinalis* florece durante todo el año, se adapta a todos los suelos aunque prefiere terrenos arenosos con un buen drenaje y rico en materia orgánica, soporta altas temperatura como las heladas, aguanta las sequías y su riego es cada cuatro días. Para tener una mejor floración es aconsejable quitar las flores secas, dejando unos pocos copos para tener semillas (Sarmiento, 2012).

Calendula officinalis a pesar de ser una especie medicinal ampliamente difundida en muchos países, en Ecuador existen pocas referencias sobre su cultivo. La siembra de *Calendula officinalis* prefiere climas templados y se recomienda su siembra en el mes

de noviembre; para su óptima germinación prefiere temperaturas que van desde 18 °C hasta 24 °C con un riego diario (Palma , 2014).

1.1.3 Propiedades farmacológicas y usos

La *Calendula officinalis* posee muchas propiedades y usos entre los que se destaca: infusiones, cremas en cosmetología, shampoos, ungüentos, maquillaje, jabones, lociones con las siguientes propiedades:

Antiinflamatoria: Della & Tubaro (1994) menciona que en esta especie se ha identificado su potencial en aplicaciones como: en el tratamiento de la inflamación y las heridas de la piel. Las flores de *Calendula officinalis* son utilizadas en la medicina tradicional para tratamientos: antiinflamatorios, alteraciones inflamatorias bucofaríngeas, tratamiento tópico de inflamaciones de la piel y mucosas (Giraldo & Bernal, 2015).

Cicatrizante: La European Medicines Agency (EMA, 2007) aprueba el uso tradicional de los preparados tópicos de flor de *Calendula officinalis* para el tratamiento en la cicatrización de heridas menores.

Hipolipemiante: Wojeicki (1980) demostró que la aplicación diaria de saponósidos obtenidos de las flores de *Calendula officinalis* normalizaron los niveles de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, lípidos totales en la sangre.

Antioxidante: De las actividades biológicas estudiadas, también es referenciada la actividad antioxidante como comenta Fonseca & Cantini (2011) estudio realizado sobre extractos de flores de *Calendula officinalis* que protegen a las células de la piel frente a radiaciones ultravioleta (UV).

Antimicrobiana: Existen ensayos clínicos realizados con cremas elaborados a base de extractos de flores de *Calendula officinalis* determinando actividad antimicrobiana

mediante la inhibición de los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp. (Cioinac S.E., 2016; Abdullah & Efstratiou, 2012).

Anti fúngica: En el estudio realizado por Gazim, Morales, Fraga, Estiveleti, & García (2008) determinan la actividad anti fúngica de aceites esenciales con flores de *Calendula officinalis* presentando mayor inhibición los siguientes microorganismos: *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *Rhodotorulla* sp.

Antiviral: En ensayos clínicos fitofarmacológicos con extractos de *Calendula officinalis* han mostrado actividad antiviral, propiedades anti-VIH de interés terapéutico y propiedades anti-genotóxicas (Kalvatchev & Walder, 1997).

1.1.4 Propiedades Nutricionales

En la gastronomía las flores de *Calendula officinalis* son utilizadas para dar un sabor penetrante a algunas comidas, como decoración o como tinte natural en productos lácteos y pasteles también han sido utilizadas en salsa para carnes con el fin de incluir las propiedades de la flor como antioxidante natural en un producto alimenticio (Domínguez, 2012) . También las flores de *Calendula officinalis* se utilizan como colorante alimentario, especias y té, así como tintura (Ercetin & Senol, 2012).

1.2 Metabolitos secundarios

En extractos de flores de *Calendula officinalis* se ha identificado 63 compuestos siendo los más sobresalientes en cuanto a su porcentaje: alcaloides de pirrolizidina (41,5 %), derivados de ácido carboxílico (18,1 %), carbohidratos (17,3 %) y terpenoides (16,4 %) fueron las familias químicas más abundantes encontradas en *Calendula officinalis* (Faustino & ML Seca, 2017) .

Se han aislado a partir de flores monoles, diésteres triterpénicos pentacíclicos, especialmente el triterpenoide, faradiol, arnidiol, 3-O-lauroil, -miristoil y -palmitoil ésteres que son cruciales para el potencial antiinflamatorio (Nicolaus, 2016).

En los pétalos y pólenes, los principales carotenoides son: flavoxantina y auroxantina, mientras que el tallo y las hojas contienen principalmente luteína y β -caroteno, los extractos obtenidos de flores secas son rico en flavonoides, especialmente isorhamnetin-3-O-rutinósido que se encuentra en alta concentración y es responsable de las actividades antioxidantes y de curación de heridas (Makó, 2012; Leite & Dominguez, 2016).

En investigaciones realizadas por (Denardi & Bortolin, 2009; Cecchini & Ticli, 2016; Hamburger & Adler, 2003) mencionan que la *Calendula Officinalis* presenta metabolitos biológicamente activos, como carotenoides, aceite esencial (calendulina y licopina), ácido málico, ésteres colesteroilínicos de los ácidos grasos (lauríco, mirístico, palmítico, margárico), mucílagos, resinas, vitamina C, tocoferoles, sesquiterpenos, alcohol, saponinas, flavonoles glucosilados, flavonoides (quercetina, rutina, isorhamnetin y kaempferol), hidroxicumarina, taninos y aceites volátiles (0,1-0,2 %).

1.2.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son componentes protectores que intervienen en arreglos enzimáticos y nutrientes esenciales (como vitaminas, pigmentos) cuya función principal es prevenir la formación de radicales libres e interceptar los que ya se han generado (Shi, 2001).

Los principales compuestos que tienen actividad antioxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, pigmentos, y sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Las vitaminas E, C, carotenos y los cofactores (Cu, Zn, Mn, Fe y Se) son importantes antioxidantes que funcionan de manera sinérgica inhibiendo la formación de radicales libres. Los compuestos fenólicos interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con radicales libres, quelan metales catalíticos y capturan el oxígeno. Estos compuestos se dividen en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Cedillo, 2006).

La capacidad antioxidante ha despertado gran interés en los últimos tiempos, se comercializan extractos con capacidad antioxidante, como ingredientes alimentarios, y algunos alimentos se expenden indicando esta propiedad, como atributo de fundamental interés para contribuir a la conservación de la salud o a la prolongación de la vida útil de los productos (Blasa, Candiaracci, Accorsi, Piacentini, & Piatti, 2007).

1.2.2 Compuestos fenólicos o polifenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad. Debido a su capacidad antioxidante, los ácidos fenólicos suelen actuar como agentes reductores y donantes de hidrógeno (Martínez, Periago, & Ros, 2000; Xu, Zhang, & Shi, 2017).

Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:

Tabla 2**Clasificación de los Compuestos Fenólicos.**

No Flavonoides	Flavonoides
<p>Entre ellos hay dos subgrupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fenoles no carboxílicos: C₆, C₆-C₁, C₆-C₃. - Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C₆-C₁ y derivados del ácido cinámico C₆-C₃. 	<p>Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Subgrupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antocianos. - Flaconas, flavononas, flavanoles y flavanonoles. - Flavanoles, taninos condensados y lignanos.

Fuente: (Creus E. , 2004).

Elaborado por: Las Autoras, 2018

1.2.2.1 Propiedades de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos en las plantas actúan como fitoalexinas, ya que al momento de sufrir heridas las plantas secretan fenoles para poder defenderse de los ataques fúngicos y bacterianos. Además, en el caso de los antocianos, contribuyen a la pigmentación de las partes de las plantas, proporcionando colores como rojo, naranja, azul, púrpura o violeta. La propiedad antioxidante de los fenoles ayuda a prevenir el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares y los fenoles influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, puesto que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor y aromas (Creus E. , 2004).

Los fenoles son reconocidos por presentar propiedades antisépticas, plaguicidas y antiinflamatorias. En el caso de los fenilpropanoides, actúan como inhibidores enzimáticos y se utilizan en la medicina tradicional oriental para tratar enfermedades que causen alergias e inflamación. Muchos de estos compuestos

también se caracterizan por ser antibacterianos y antifúngico (Cumarinas), sobretodo frente a microorganismos patógenos (Montealegre, 2011).

En la última década, se ha demostrado que los ácidos fenólicos poseen una potente actividad antioxidante, desinfectante, antimicrobiana, anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, antimutagénica, antirreumática, antipirética, antiséptica, antihelmíntica, neuroprotectora y hepatoprotectora (Muley, Khadabadi, & Banarase, 2009).

1.3 Clasificación de extractos vegetales

Dependiendo del grado de concentración de solventes extractivos, los extractos pueden clasificarse en:

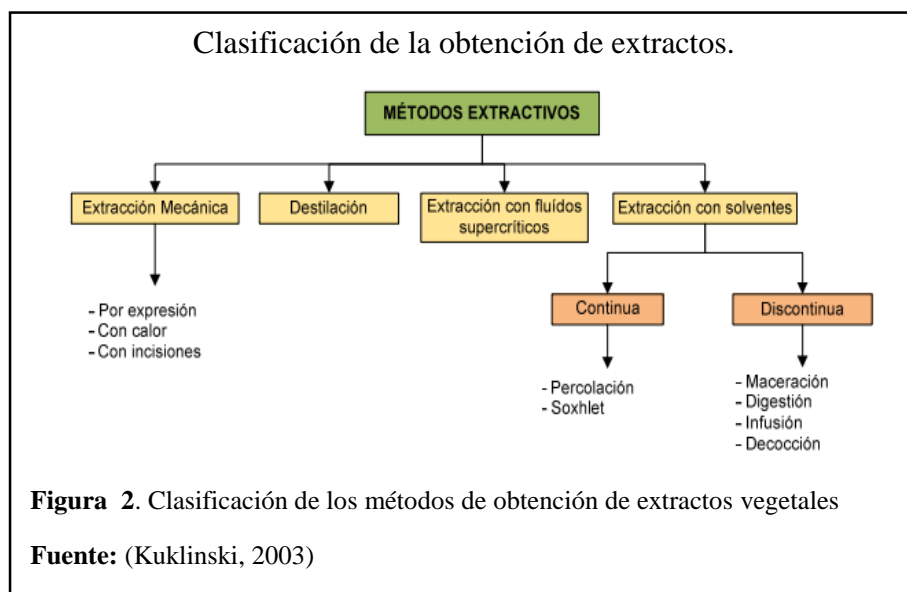
- **Extractos Fluidos o líquidos:** Los extractos fluidos, también conocidos como extractos líquidos, son preparaciones de drogas vegetales que contiene alcohol como disolvente o como preservante, o ambos, preparados de tal manera que cada mililitro contiene los constituyentes extraídos de 1 g del material crudo que representa (Solís, De Solís, Gattuso, & Cáceres, 2003).
- **Extractos Secos:** Los extractos secos se obtienen evaporando todo el solvente hasta que tienen una consistencia en polvo. Son altamente estables aunque en ocasiones resultan ser higroscópicos, además son de fácil manipulación y se les puede utilizar para preparar tinturas de extractos fluidos (Kuklinski, 2003).
- **Extractos Semisólidos o blandos:** Tienen una riqueza superior a la droga de partida, se obtienen evaporando el disolvente hasta obtener un producto de textura semisólida pero que no moja el papel de filtro (Cañigüeral, 2003).
- **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. Son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies (Castillo & Martínez, 2007).

1.3.1 Métodos de obtención de extractos vegetales.

Los extractos vegetales se pueden obtener por procesos físicos, químicos y microbiológicos, a partir de una fuente vegetal y utilizable en cualquier campo de la industria química y médico-farmacéutica (Treybal, 1986).

En el esquema de la figura 2 se muestra la clasificación de los métodos de obtención de los extractos vegetales más importantes.



- **Extracción Mecánica:** Esta técnica se realiza por expresión, que consiste en ejercer presión sobre la droga y así se obtiene un jugo, en el que se encuentra disueltos los principios activos de interés, también se la puede hacer mediante cortes por los que caen los fluidos de la planta (Osorio, 2009).

- **Destilación:** Esta técnica se basa en la diferente volatilidad de los principios activos de la planta, lo cual permite la separación de los componentes volátiles, como son los aceites esenciales, por ejemplo, de otros que son menos o nada volátiles (Santana, 2014).
- **Extracción con fluidos supercríticos:** El proceso consiste en colocar el material vegetal molido en una cámara de acero inoxidable y hacer circular, a través de la muestra, un fluido en estado supercrítico (Sánchez, 2009).
- **Extracción con Solventes:** Este método consiste en la separación de los principios activos de la planta al ponerla en contacto con un solvente o la mezcla de ellos, capas de solubilizar dichos principios (Pérez, 2009).
- **Extracción continua o progresiva:** En la extracción continua, el solvente se va renovando o recirculando y actúa sobre la planta en una sola dirección (Sharapin, 2000). La percolación, la repercolación y el soxhlet son las técnicas que pertenecen a este grupo y se describen a continuación:
 - a) **Percolación:** En este método el menstuo (alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la droga pulverizada en un solo sentido, la droga es bañada por nuevas proporciones de menstuo y cede todos sus componentes solubles (Miranda & Cuéllar, 2001).
 - b) **Repercolación:** Consiste en hacer recircular el mismo solvente a través del material vegetal (Naveda, 2010).

- c) **Soxhlet:** Esta técnica centra en la extracción sólido-líquido mediante un equipo Soxhlet que tiene como función recircular los vapores condensado (Caldas, 2012).
- **Extracción discontinua o simultánea:** La maceración, la infusión, la digestión y la decocción son; métodos que pertenecen a este grupo y se describen a continuación:
- a) **Maceración:** Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente protegido de la luz (Voigt, 1982). Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, etanol o glicerina) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles, tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (Gonzalez A. , 2004).
- b) **Infusión:** Se vierte el agua hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de cierre bien ajustado, a fin de evitar la pérdida de principios activos, y se deja en reposo de 5 a 15 minutos (Guerra, 2005).
- c) **Digestión:** Se aplica normalmente en algunas plantas que presentan principios activos de difícil extracción, por estar contenidos en las partes leñosas de la planta, o bien que requieren un calor prolongado (Vlastegui, 2005).
- d) **Decocción:** 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, Sánchez, Solan, Suiñe, & Tico, 1992).

1.3.2 Parámetros que influyen en la obtención de extractos vegetales.

Es importante establecer parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, el rendimiento y la eficacia del producto medicinal, en la tabla 3 se describen los siguientes parámetros:

Tabla 3.

Parámetros que influyen en la obtención de extractos vegetales

Naturaleza química de la materia vegetal	Es indispensable conocer las propiedades o características del metabolito a extraer.
Solvente	El solvente óptimo es aquel que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto en estudio.
Relación sólido-líquido	La proporción adecuada será la que se alcance extraer la mayor cantidad del principio activo de interés.
Tamaño de la partícula	Tamaños pequeños de partícula favorece mayor contacto entre la droga y el disolvente.
Temperatura	El aumento de la temperatura favorece la extracción sin embargo a temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar solutos indeseables.
Viscosidad del medio	Es recomendable no utilizar solventes con viscosidad relativamente alta.
Velocidad de agitación y tiempo de extracción	Logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, el disolvente tendrá alta capacidad para obtener concentraciones del principio activo.

Fuente: (Carmona, López, González, & Muñoz, 2006).

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

1.4 Estandarización de extractos vegetales

Se ha definido como el establecimiento de la calidad reproducible del extracto estandarizado por medio de la comparación de un producto con sustancias de

referencias establecidas y definiendo las cantidades mínimas de un grupo de componentes. Con ello, se garantiza la potencia de los componentes en el producto final (Metwally & Omar, 2011).

1.4.1 Importancia

Según el (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, 2010)

existen varias razones para estandarizar un extracto, entre ellas tenemos:

- Obtener productos reproducibles y de calidad.
- Productos que pueden cumplir con los estándares básicos requeridos.
- Sólo los extractos estandarizados pueden ser sometidos a ensayos clínicos y probar científicamente sus efectos.
- Los extractos estandarizados ofrecen al consumidor mayor seguridad (objetiva y subjetiva) y así se incrementa el nivel de confianza en los productos.

En la mayoría de los casos, el objetivo de producir un extracto es aumentar la potencia de este mediante la concentración de los componentes biológicamente activos. Aunque no es raro que un componente particular de la planta sea predominantemente el responsable por el beneficio; con frecuencia habrá una serie de compuestos relacionados, o en algunos casos compuestos no relacionados, cada uno de ellos contribuyendo de algún modo a las propiedades benéficas de la planta (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, 2010). La producción de un extracto estandarizado puede ser una nueva alternativa en el desarrollo de la medicina fitoterápica porque garantiza la calidad, la efectividad, seguridad y reproducibilidad de su actividad farmacológica. Para los productos de origen vegetal,

estos requisitos se logran mediante la estandarización de todos los procesos productivos y también la estandarización de los componentes químicos (Chen, 2007).

1.4.2 Uso de extractos vegetales estandarizados

Medicina Tradicional: Desde tiempos antiguos a las plantas se les utiliza para la curación de diferentes enfermedades del ser humano por ejemplo Tanideh et al. (2013) mencionan que los extractos de la *Calendula officinalis* se los utiliza para la cicatrización, como antiinflamatorio e incluso, inhibe la actividad bacteriana. Además se utiliza comúnmente en terapias, como la cicatrización de heridas.

Industria Fito cosmética: En la actualidad la cosmética natural se encuentra en auge y cada vez existe una oferta mayor en el mercado de este tipo de productos que incorporan extractos de plantas entre sus ingredientes. La tendencia del mercado esta direccionada por un consumidor que prefiere cuidarse de forma natural (Kamath, Rahul, & Ashok, 2008).

Las aplicaciones más comunes de los extractos de plantas utilizados como ingredientes cosméticos son: efectos fotoprotectores y antioxidantes como: la silimarina, el resveratrol y flavonoides en general; efecto anti-edad como: el picnogenol, la centella; efecto hidratante como: el extracto de soya, el aloe vera, la caléndula (Lozoya, 1997). Por ello es ampliamente utilizado en formulaciones cosméticas y en productos solares debido a sus propiedades hidratantes, el extracto de las flores *Calendula officinalis* también se usa para promover la cicatrización y como antiinflamatorio (Citadini-Zanette & otros, 2012),

El extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* se emplea como materia prima en las formulaciones para la elaboración de las formas cosméticas como: cremas, emulsiones, lociones, geles, aceites, jabones, desodorantes entre otras (Arraiza, 2009; Schmididiger, 1987).

Existe poco mercado que ofrece como materia prima al extracto de *Calendula officinalis* hidrosoluble, por lo general se utiliza para añadir como ingrediente en cremas, geles o tónicos faciales y en fragancias (Gran Velada, 2018; Gottschalck & Bailey, 2008). Por su parte Coello (1988) plantea el uso de las flores de *Calendula officinalis* en el tratamiento del acné no grave y resalta las propiedades antisépticas de su aceite esencial.

Según datos del programa (VCRP) de la (FDA, 2006) se utilizan a los extractos y aceites de *Calendula officinalis* como ingredientes de los siguientes productos fito cosméticos: productos de fragancias, productos para el cuidado del cabello no colorantes, maquillaje, barras de labios, productos de higiene personal, productos para el cuidado de la piel, cremas hidratantes, cremas nocturnas, cremas limpiadoras de la piel, lociones, polvos y sprays.

En cosmética o cuidado personal preparaciones de extractos de *Calendula officinalis*, se utilizan como acondicionador de la piel, en concentraciones que van hasta 1 % pero generalmente la concentración más utilizada está por debajo 0,1 % (Anonymous, 2008).

Calendula officinalis presenta una amplia variedad de tendencias de patentes en productos del área cosmético-farmacéutica, en evaluación de su actividad antioxidante, como antibiótico, de uso tópico o ingerido, de uso agrícola, en mezclas industriales y transformación en todas las áreas de la cadena de la especie, incluyendo el área genética (Tofiño-Rivera, Ortega-Cuadros, Melo-Ríos, & Mier-Giraldo, 2017).

En la actualidad no se comercializan productos que contengan *Calendula officinalis* como medicamento. Se puede adquirir en formulaciones simples o junto con otras plantas (Castillo C. , 2016).

Capítulo II

2. Materiales y métodos

2.1 Recolección del material vegetal

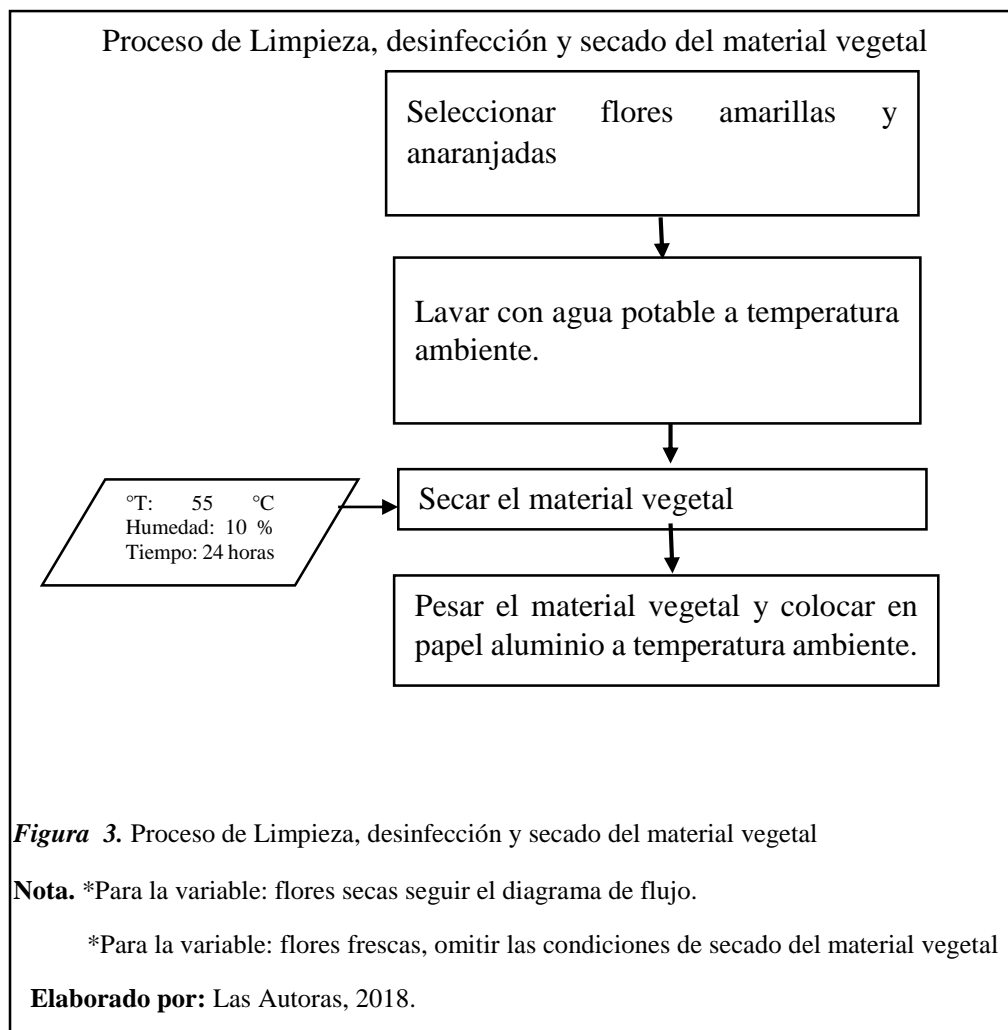
Calendula officinalis fue recolectada en el pueblo de Chibuleo, ubicado al sur-oeste del cantón Ambato de la provincia de Tungurahua, parroquia Juan Benigno Vela, a 16 Km. vía a la ciudad de Guaranda, Latitud: -1.308053 y Longitud: -78.716538, con una altitud de 2800 a 4480 m.s.n.m, su temperatura que oscila entre los 2 °C mínima y máxima de 14 °C (Caluña-Espin, Tisalema-Caluña, & Caluña-Til, 2008). Se recolecto en los meses de noviembre y diciembre del 2017.

Según investigación bibliográfica la parte de la planta con mayor contenido de flavonoides, grupo fotoquímico de interés en esta investigación son las flores de *Calendula officinalis* por su contenido de 0,88 y 0,33 % de flavonoides totales en las flores y receptáculos respectivamente Ociosziynska (1977), en función de lo mencionado la identificación física fue la siguiente: se tomaron las plantas sanas, sin presencia de gusanos, ni con alguna alteración visible y evitando plantas con signos de enfermedad o coloración café.

El material vegetal se colocó en un saco de yute y fueron transportadas al Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Girón-Quito.

2.2 Limpieza, desinfección y secado del material vegetal

En el siguiente diagrama de flujo de la figura 3, se muestra el proceso que se llevó a cabo para: la limpieza, desinfección y secado de la muestra vegetal.



2.3 Control de calidad del material vegetal

- La Norma Ecuatoriana (Obligatoria) “Fitoterápicos: Droga Cruda. Métodos de ensayo”: establece los parámetros para el control de calidad de la droga de origen vegetal antes de emplearse en la elaboración de fitoterápicos. Teniendo en cuenta lo establecido en la literatura internacional (World Health Organization, 1992; Norma Cubana NRSP 309, 1991; Norma Cubana NRSP 310, 1991) y la Norma Ecuatoriana se establecen los siguientes métodos de ensayo, siendo los principales los que se mencionan en la tabla 4.

Tabla 4.

Métodos de Ensayo para material vegetal

Ensayos:
✓ Porcentaje de materia extraña
✓ Cenizas totales
✓ Cenizas solubles en agua
✓ Cenizas insolubles en ácido clorhídrico
✓ Contenido de humedad
✓ Determinación de microorganismos

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

2.3.1 Control físico-químico

a) Determinación de materia extraña

En la tabla 5, se describe el equipo y el fundamento del método de ensayo para la determinación de materia extraña.

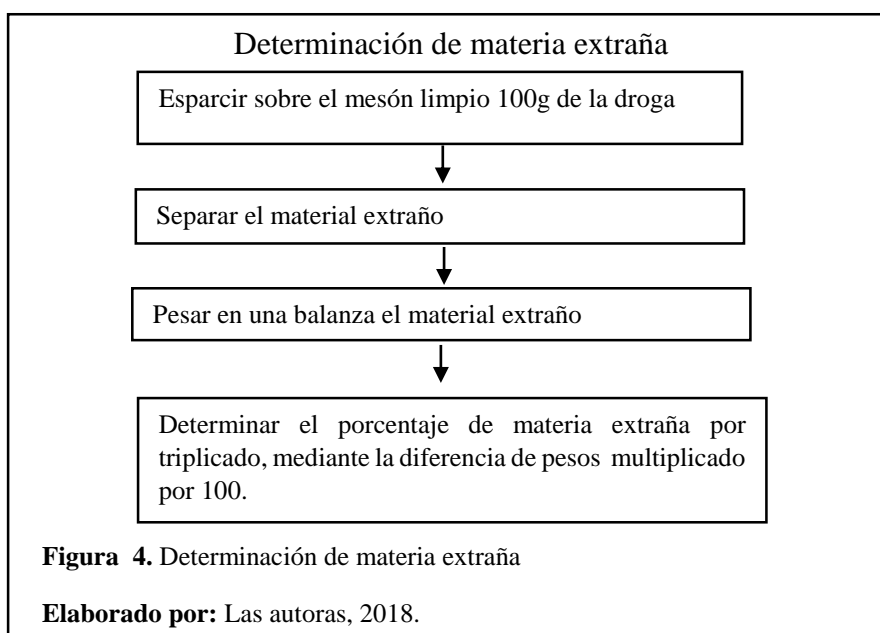
Tabla 5.

Método de Ensayo para determinación materia extraña

Equipo	Principio del Método
Balanza analítica-Modelo BLC (500)	Se considera materia extraña al material orgánico o inorgánico, ligero o pesado, cuya presencia en el producto no es deseable y que por arriba de un límite máximo se estima contaminante, considerándose entre otros: excretas, pelos de cualquier especie, fragmentos de insectos, material plástico y otros objetos (NORMA Oficial Mexicana , 2008; Bruneton, 2001).

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

El procedimiento se realizó según el diagrama de flujo de la figura 4:



b) **Determinación del contenido de humedad**

Para la determinación del contenido de humedad en las flores de *Calendula officinalis* se utiliza el equipo y el principio del método de ensayo que se describe en la Tabla 6.

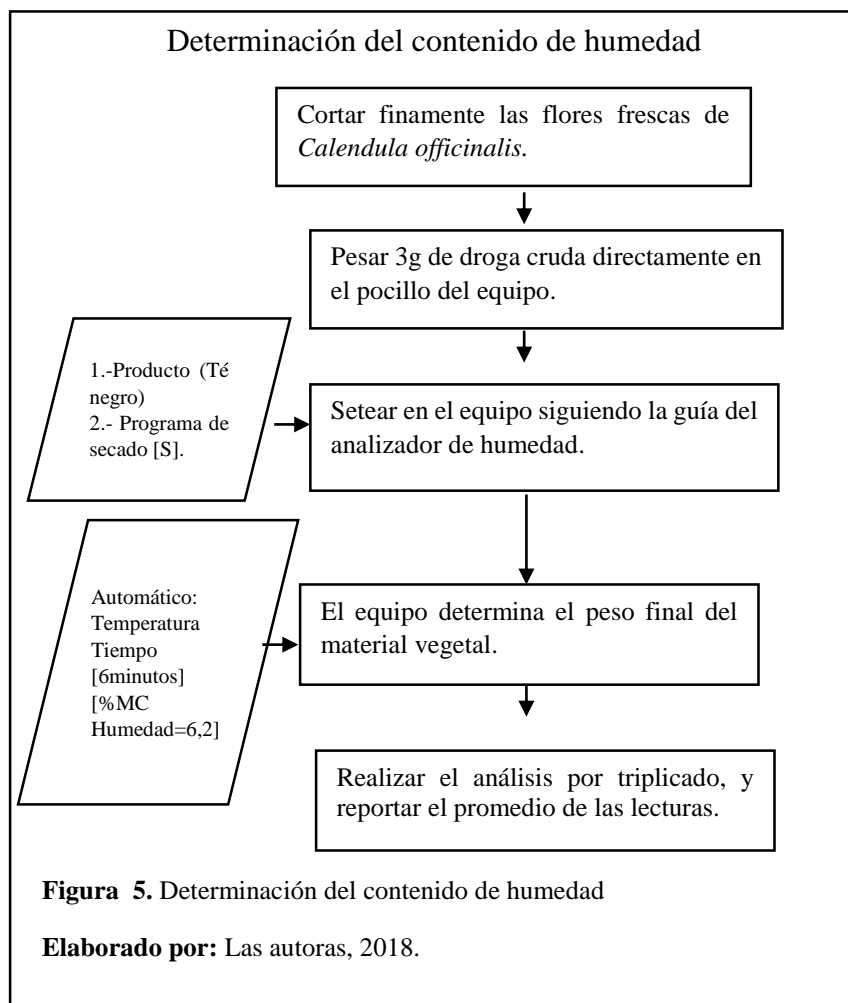
Tabla 6

Método de Ensayo para determinación del contenido de humedad

Equipo	Principio del Método
Mettler Toledo (HB43-S)	El equipo es un analizador de humedad que utiliza una fuente calorífica halógena, la determinación se basa en el principio termogravimétrico, que consiste en medir los cambios de masa en función de la variación de temperatura a la que se somete el material (Tirado , Montero , & Acevedo, 2015; Rodríguez & Villegas, 2012).

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

El procedimiento se realizó según el diagrama de flujo de la figura 5:



c) Determinación de cenizas totales

Para la determinación del contenido de cenizas totales en las flores de *Calendula officinalis*, el principio del método de ensayo y los equipos utilizados se describen en la tabla.

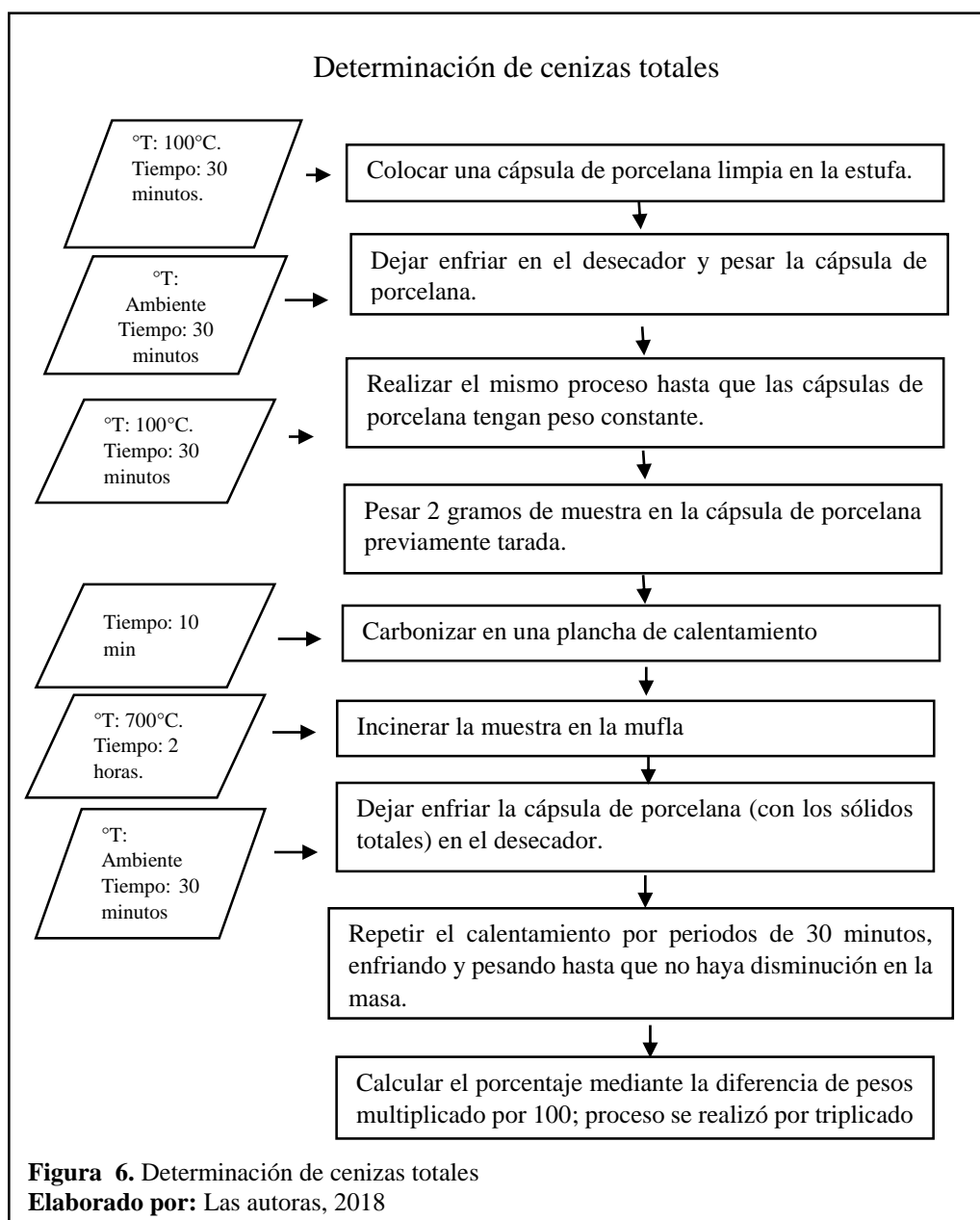
Tabla 7

Método de Ensayo para determinación cenizas totales

Equipos utilizado	Principio del Método
1. Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo-ML204/01, 2.- plancha de calentamiento VLP SCIENTIFICA (HSC), 3.- horno mufla THERMOLYNE modelo-F48010.	Método gravimétrico que determina el residuo total de materia que queda después de la ignición a condiciones de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C y 90 minutos a 600 °C) (Palomino, 2001; Farmacopea MERCOSUR, 2008).

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

El procedimiento se realizó según el diagrama de flujo de la figura 6:



d) Determinación de cenizas insolubles en Ácido Clorhídrico

En la tabla 8, se describen los equipos y el fundamento del método de ensayo para la determinación del contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

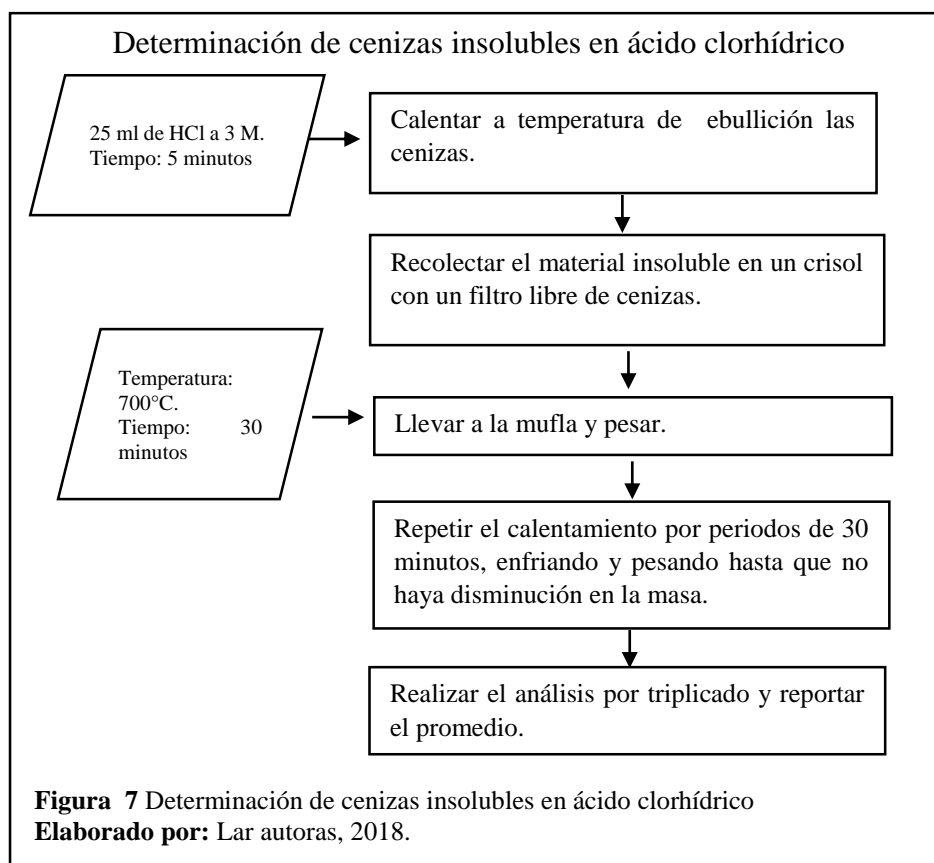
Tabla 8

Método para determinación de cenizas insoluble en Ácido Clorhídrico.

Equipos utilizados	Principio del Método
1.-Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo-ML204/01, 2.-horno mufla THERMOLYNE modelo F48010, 3.- baño de agua SHEL- LAB modelo-W14M – 2.	El método se basa en medir la cantidad de sílice presente, especialmente como arena y tierra silíceas, las cenizas insolubles en ácido son el residuo obtenido después de hervir las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido y llevar a la ignición el material insoluble restante (Guzman & Chevez, 2007).

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

El procedimiento se realizó según el diagrama de flujo de la figura 7:



d) Determinación de cenizas solubles en agua

En la tabla 9, se describen los equipos y el fundamento del método de ensayo para la determinación del contenido de cenizas solubles en agua.

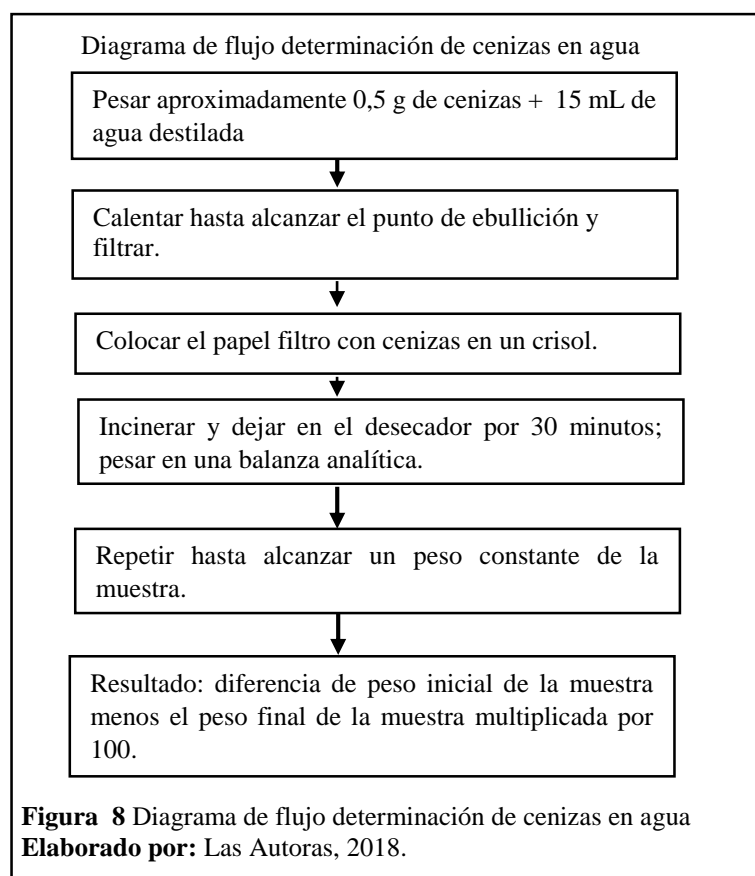
Tabla 9

Método de Ensayo para determinación de cenizas solubles en agua

Equipos utilizados	Principio del Método
1. Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo-ML204/01,	Consiste en la cuantificación de elementos hidrosolubles en agua; se basa en el hecho de que algunos agentes blanqueadores ó bien conservadores son insolubles en agua.
2. horno mufla THERMOLYNE modelo- F48010.	

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

La figura 8, se indica el diagrama de flujo para la determinación de cenizas solubles en agua y coincide el procedimiento con la (Norma Ramal, 1992; Medina, 2006):



2.3.2. Control microbiológico

En el Control microbiológico se utilizó placas de Petrifilm™ 3M son láminas delgadas que contienen un medio de cultivo, un agente solidificante soluble en agua y también tiene incorporado indicadores de pH que colorean las colonias para facilitar la identificación y el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC).

En la tabla 10, se describen los Equipos, materiales e insumos utilizados en el ensayo de determinación de cenizas en agua.

Tabla 10.

Equipos, materiales e insumos para el control microbiológico.

Material	Equipo Utilizado
Placas petrifilm 3M para conteo de: aerobios mesófilos totales, E. coli/coliformes totales y mohos/levaduras.	1.- Incubadora MEMMERT (BE-400), 2.- Autoclave, 3.- cámara de flujo laminar ESCO-modelo-ACB4A2

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

Fundamento:

- a) Método de conteo de aerobios mesófilos totales en placa

Se utilizan las Placas Petrifilm^{AT} de Areobios mesófilos totales (AT) para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias del material en análisis.

- b) Método de conteo de *E. coli* y coliformes totales en placa

Este método abarca dos ensayos en uno, incluye nutrientes de Bilis y Rojo Violeta (agente gelificante), un indicador de la actividad glucoronidasa, y un colorante que facilita el conteo de colonias.

La mayoría de las *E.coli* (cerca del 97 %) producen β - glucoronidasa, por lo que a su vez produce un precipitado azul asociado a las enzimas de la colonia. El film superior

atrapa el gas producido por la lactosa que fermentan *E. coli* y Coliformes; el 95 % de *E. coli* produce un gas, este gas es atrapado por el film y se tiñen las colonias azules y rojo-azules, mientras que los coliformes son colonias rojas (PETRIFILM 3M, 2014).

c) Método de conteo de mohos- levaduras en placa

La placa Petrifilm^{AT} para el recuento de Mohos y Levaduras (CML) es un medio de cultivo que contiene nutrientes enriquecido con antibióticos, un agente gelificante y un indicador de color.

El pigmento indicador reacciona con las enzimas de la pared celular y se tiñen las colonias de levadura que son colonias típicamente pequeñas de color verde azulado y los mohos son colonias más grandes de diversos colores (PETRIFILM 3M, 2014).

En el laboratorio se realizó el procedimiento de la figura 9, siembras de la muestra vegetal en Placas Petrifilm^{AT} de Aerobios mesófilos totales, *E. coli* y coliformes totales (CT) y por último el recuento de Mohos y Levaduras (CML) según especificaciones del fabricante y el posterior recuento de las colonias:

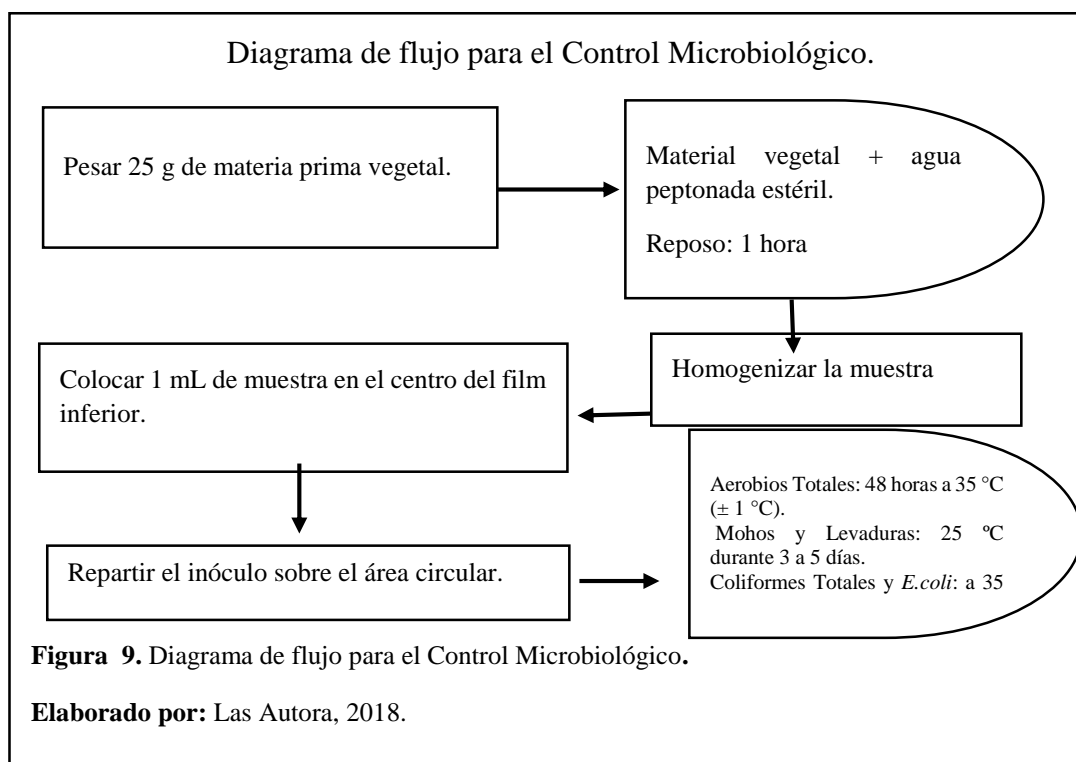


Figura 9. Diagrama de flujo para el Control Microbiológico.

Elaborado por: Las Autora, 2018.

2.4 Obtención de extractos fluidos

2.4.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos

Se realiza mediante el método de Percolación que se fundamenta en la obtención de líquidos concentrados, obtenidos al hacer pasar lentamente el disolvente por un material poroso en contacto directo y permanente con la droga vegetal, hasta lograr una extracción completa de metabolitos biológicamente activos; previamente se requiere humedecimiento de la droga vegetal, que aumente la porosidad de la pared celular y facilite la difusión de sustancias extraíbles hacia el exterior de las células (Gonzalez A. , 2004; Flores, 1998; Sharapin, 2000).

Para llevar a cabo la técnica de percolación se sigue la (UPS30-NF25, 2007); en la tabla 11 se describe los materiales y equipos utilizados.

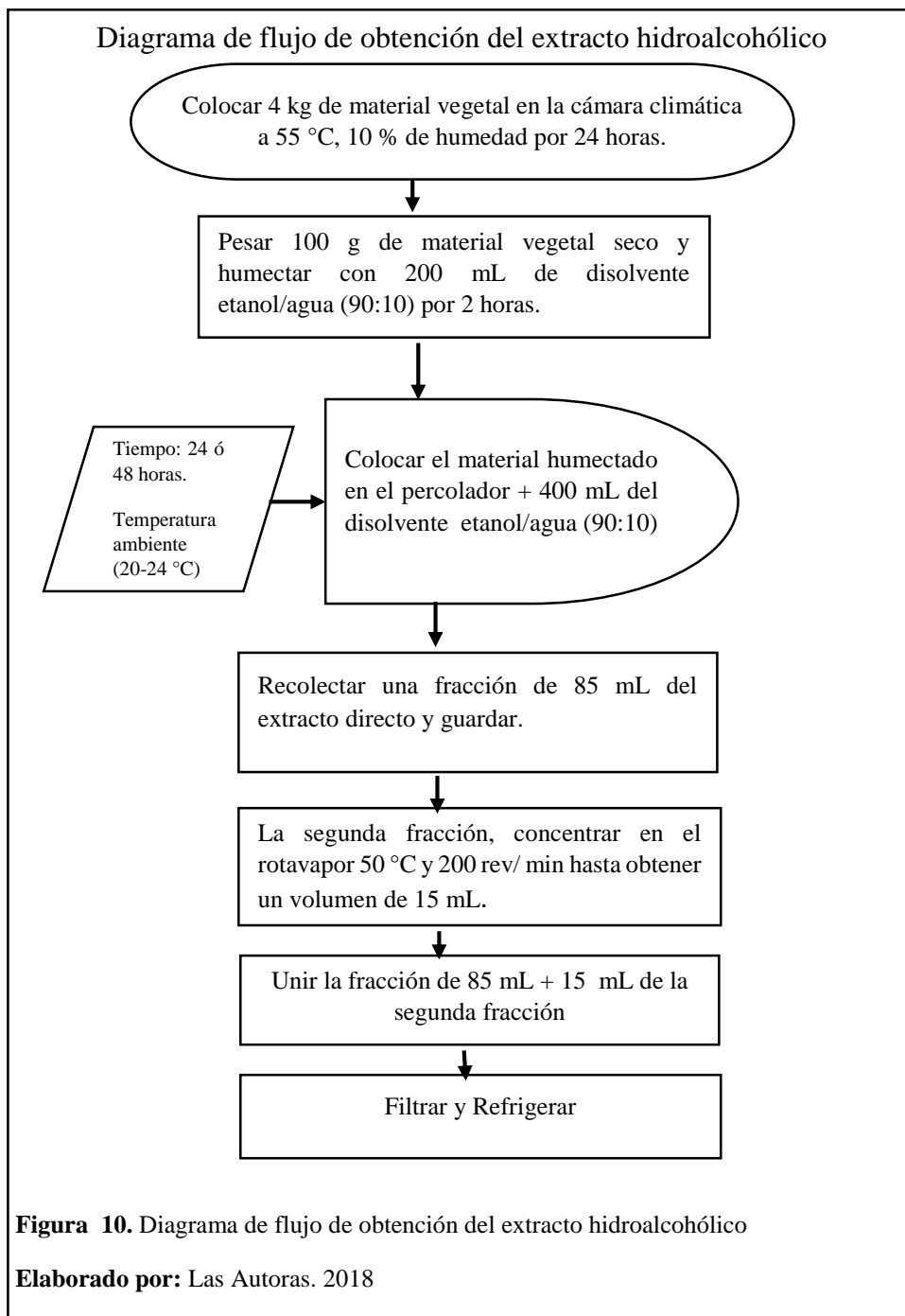
Tabla 11.

Materiales y equipos para obtención de extractos hidroalcohólicos.

Materiales	Equipo Utilizados
Flores de <i>Calendula officinalis</i> , alcohol al 96 %, agua destilada, percolador de vidrio y frascos color ámbar.	1.- Balanza semianalítica OHAUS-Scout Pro-SP2001, 2.- cámara climática BRINDER-KBF 240, 3.- rotavapor IKA (RV-10 Basic), 4.- un refrigerador marca-INDURAMA.

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

En la figura 10, se describe el diagrama de flujo para la obtención de un extracto hidroalcohólico.

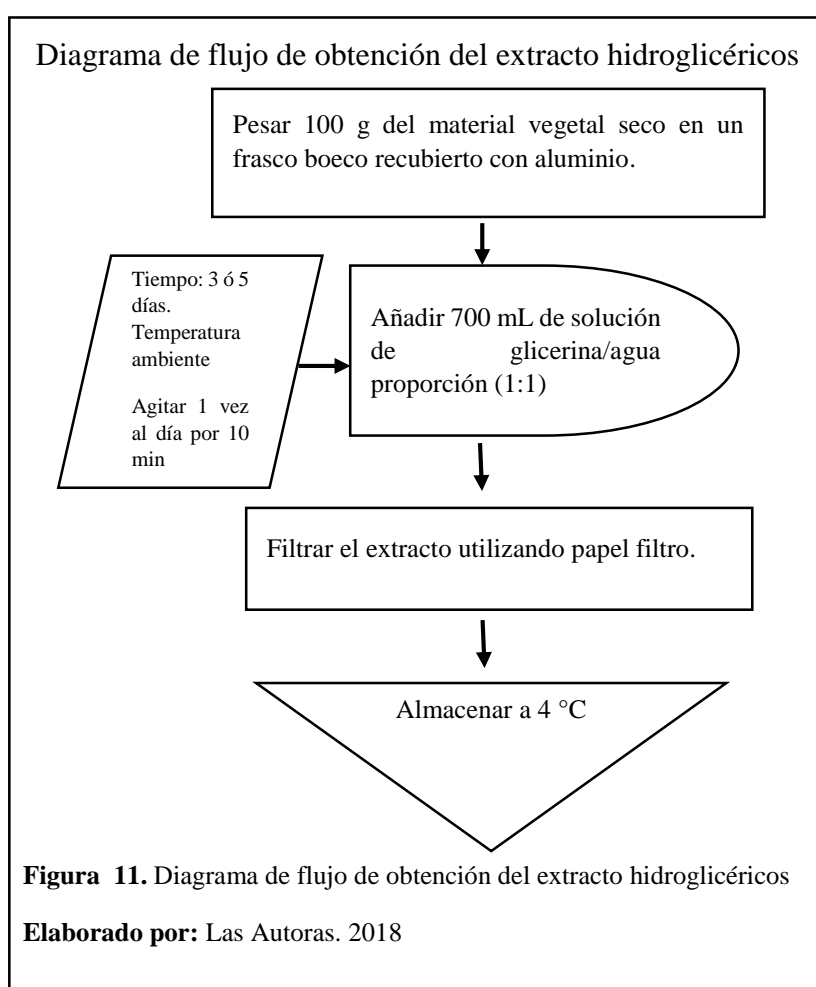


Nota: El material vegetal fresco se realiza el mismo procedimiento con tiempos y concentraciones iguales.

2.4.2 Obtención de extractos hidroglicéricos

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido a temperatura ambiente donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el solvente con el cual se pretende extraer los metabolitos secundarios; por un tiempo prolongado (promedio de 3 a 10 días) protegido de la luz (Tona, Kambu , Ngimbi , Cimanga , & Vlietinck , 1998; Fenaroli's , 1975).

Figura 11 se describe el Diagrama de flujo para la obtención de un extracto hidroglicérico.



Nota: Realizar el mismo procedimiento con tiempos y concentraciones iguales para el material vegetal fresco.

2.5 Control de calidad de los extractos

En la Norma Ecuatoriana “Fitoterápicos: Extractos vegetales: describe los métodos de ensayo para el control de calidad de extractos y tinturas de origen vegetal, que se emplearán en la elaboración de los fitoterápicos. Teniendo en cuenta lo establecido en la literatura internacional (Norma Cubana NRSP 309, 1991) y coincide con la (Norma Ecuatoriana, 1999) en los siguientes métodos de ensayo:

- ❖ Determinación organoléptica.
- ❖ Determinación del pH.
- ❖ Determinación del índice de refracción.
- ❖ Determinación de la densidad relativa.
- ❖ Determinación de sólidos totales
- ❖ Control microbiológico.
- ❖ Determinación de fenoles totales: Variable cuantificable para la estandarización fitoquímica de los extractos.

Para cumplir el objetivo de estandarización fitoquímica de los extractos de *Calendula officinalis* se considera como variable cuantificable la concentración de Fenoles totales.

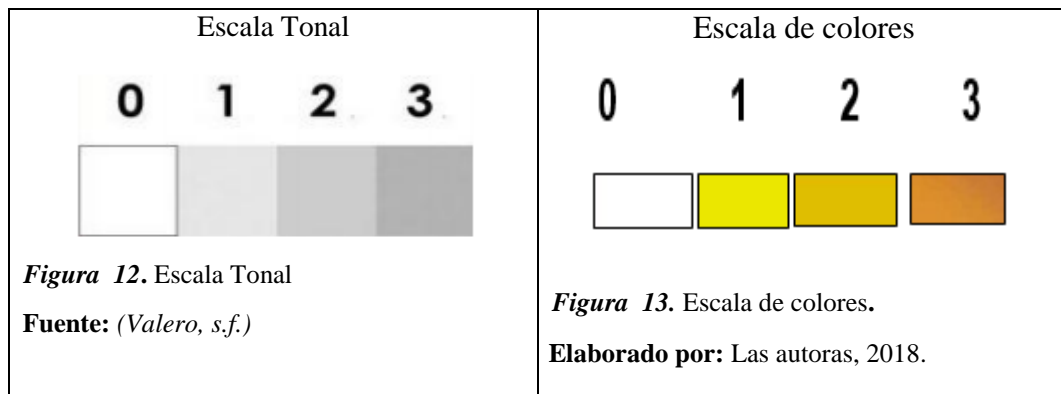
2.5.1 Determinación organoléptica

El análisis sensorial se refiere a la medición y cuantificación de las características de los productos evaluables por los sentidos humanos. En este contexto, el control de calidad del extracto se realiza considerando los atributos de color, olor y sabor (Piaña, y otros, 2004).

- **Parámetros organolépticos**

Color: La determinación del color para cada extracto se realizó en base a una escala propia de colores (color blanco a color ámbar) a partir de parámetros establecidos en la escala tonal; diagrama graduado de colores, intensidades o texturas en orden creciente o decreciente, desde el más claro al más oscuro.

En la figura 12, se observa la escala tonal y en la figura 13 la escala de colores propia para la evaluación, se identifica a: 0= blanco, 1= amarillo verdoso, 2= café claro (combinación de amarillo verdoso y café) y 3= ámbar (combinación café claro y café).



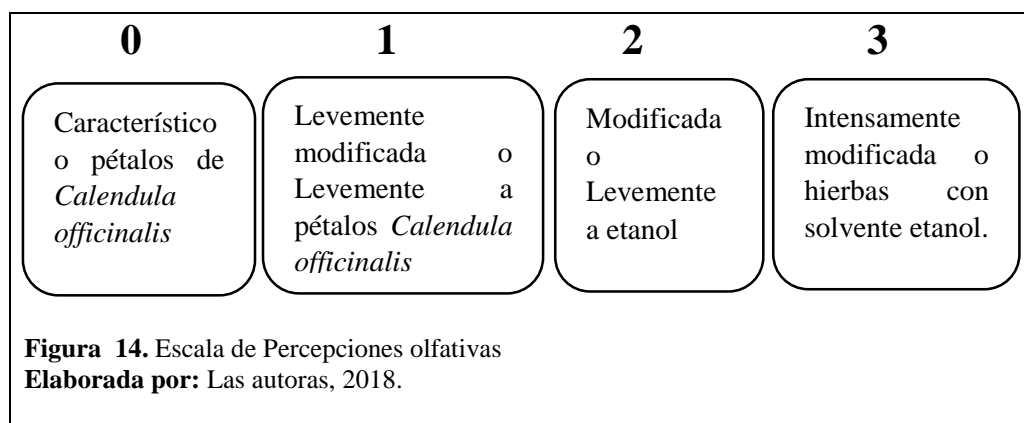
Olor: Se basa en una escala de percepciones olfativas; utiliza ítems sobre los cuales se obtiene una respuesta por parte del sujeto (Ospina, Sandoval, Aristizábal, & Ramírez, 2003).

Los extractos se evalúan al final del ensayo y a partir de la escala de percepciones olfativas básicas se elabora una escala de valoración propia:

- Característico= pétalos de *Calendula officinalis*
- Levemente modificada= Levemente a pétalos de *Calendula officinalis*
- Modificada= Levente a etanol
- Intensamente modificada= hierbas con solvente etanol

Las percepciones olfativas mencionadas se identifican en una escala numérica con valores de 0, 1, 2, 3 respectivamente.

En la figura 14, se aprecia la valoración de acuerdo a las percepciones olfativas.



Sabor: La mayoría de extractos provenientes de plantas vegetales contienen polifenoles totales como: flavonas y taninos condensados compuestos responsables del sabor amargo y astringente respectivamente (Grosch & Belitz, 1988; Haslam & Lilley, 1988) . Según Dominguez (2009) la flor de *Calendula officinalis* posee un sabor amargo por contener compuestos antioxidantes como: flavonoides y carotenoides; el extracto está dirigido a ser utilizado en un producto cosmético, por tanto no es necesario realizar un análisis organoléptico de sabor.

2.5.2 Determinación de pH

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución, se basa en el hecho de que los ácidos, bases y sales experimentan una disociación electrolítica (concentración de iones hidronio) en solución acuosa (Bartales, 1980). En la tabla 12, se describen los materiales y equipo utilizado para la determinación de pH.

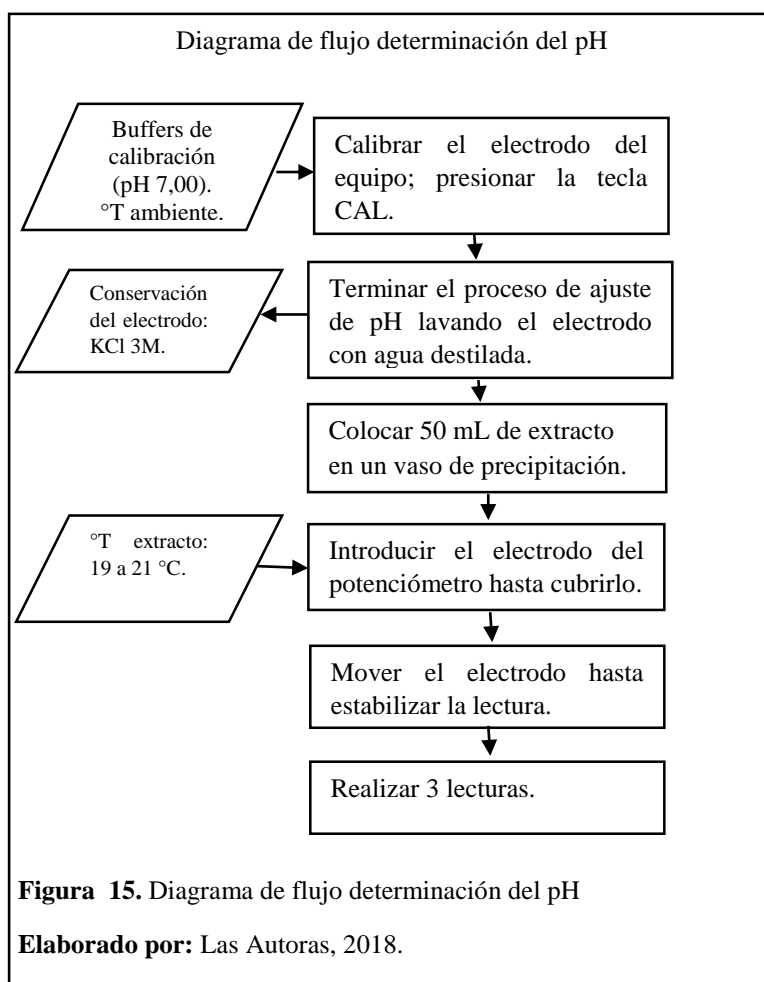
Tabla 12.

Equipo y reactivos para determinación de pH

Reactivos	Equipos
Extracto hidroalcohólico e hidroglicéricos de <i>Calendula officinalis</i> .	Potenciómetro METTLER TOLEDO modelo-Seven Multi

Elaborado por: Las autoras, 2018.

La determinación de pH se realizó siguiendo el manual instructivo del equipo; en la figura 15, se describe el diagrama de flujo de la determinación del pH:

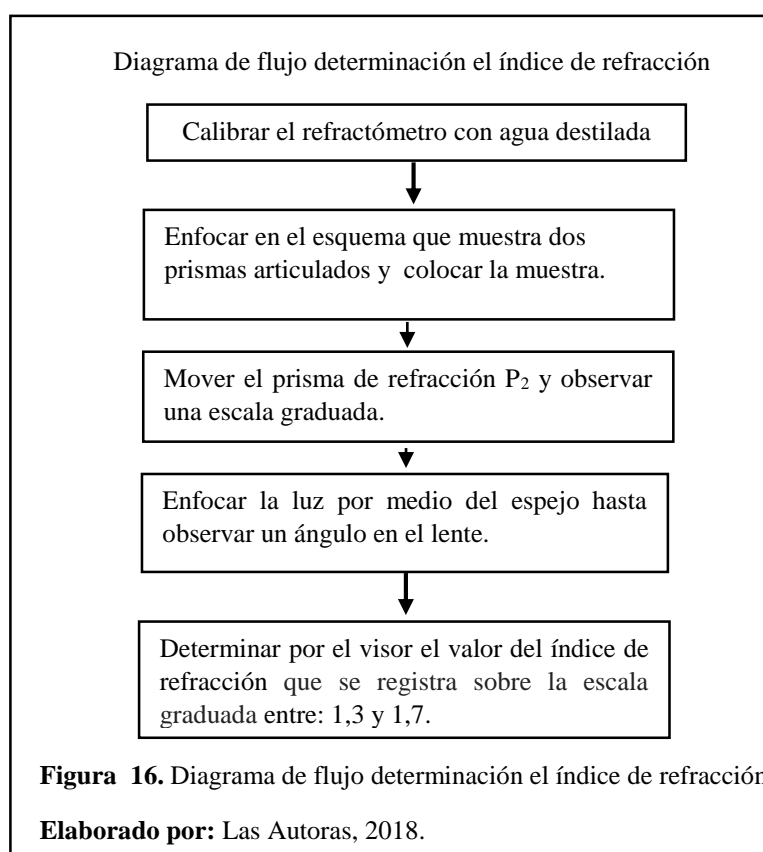


2.5.3 Determinación de índice de refracción

El índice de refracción permite caracterizar una solución y está directamente relacionado con el contenido sólido total y, por lo tanto, con la densidad de

preparación, debido a que son indicadores de la cantidad y naturaleza de las partículas extraídas del material vegetal (Carmona, López, & González, 2009).

Usar un refractómetro modelo ATAGO-NaQR-1T según UPS30-NF25 (2007, pág. 831). En la figura 16 se indica el diagrama de flujo para el índice de refracción.



2.5.4 Determinación de densidad relativa

La densidad relativa es un método gravimétrico que consiste en la variación entre la masa de un cuerpo y la masa de agua que tienen el mismo volumen para la comprobación del grado de pureza de una sustancia líquida (Gil, 2010).

En la tabla 13, se describe el equipo y los reactivos para realizar el ensayo de densidad relativa.

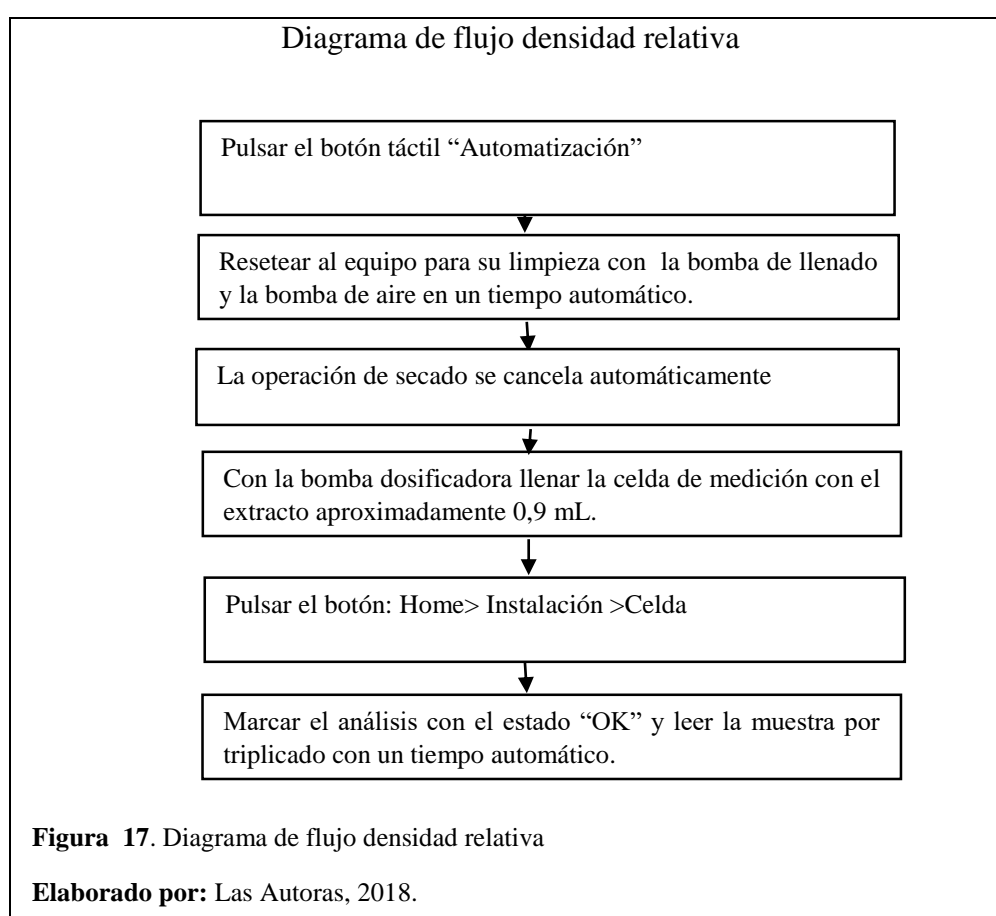
Tabla 13.

Equipo y reactivos para la determinación de densidad relativa.

Equipo	Reactivos
Densímetro METTLER TOLEDO (DM40)	Extracto hidroalcohólico e hidroglicéricos de <i>Calendula officinalis</i>

Elaborado por: Las autoras, 2018.

En la figura 17, se describe el diagrama de flujo de la densidad relativa según las instrucciones del equipo densitómetro DM40.



2.5.5 Determinación de sólidos totales

Los sólidos totales son los residuos (incluyen sales inorgánicas) de la muestra que quedan en un recipiente después de su evaporación y su consecutivo secado en la mufla a temperatura definida. Realizar el procedimiento mediante la (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0014, 1984) para la determinación de sólidos totales.

En la tabla 14 se describen los equipos y reactivos utilizados para la determinación de sólidos totales.

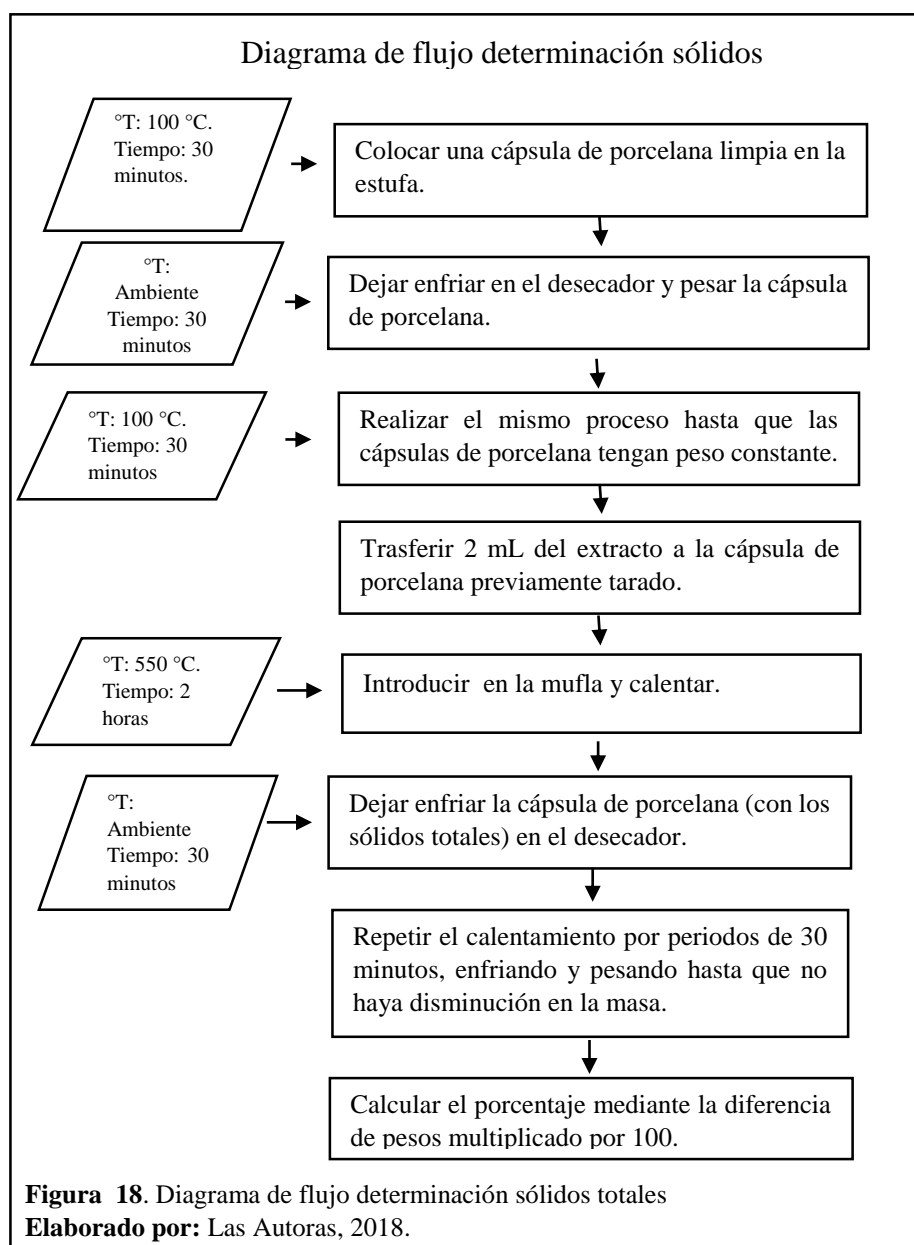
Tabla 14.

Equipos y reactivos para determinación de sólidos totales.

Equipos	Reactivos
1.- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo-ML204/01, 2.-horno mufla THERMOLYNE modelo-F48010.	Extractos hidroalcohólicos e hidroglicéricos de <i>Calendula officinalis</i>

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

En la figura 18, se describe el diagrama de flujo de la determinación de sólidos totales.



2.6 Determinación microbiológica

La determinación microbiológica se procede de igual forma de acuerdo a la sección 3.3.2. Control microbiológico; consiste en determinar la presencia de aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras por medio de placas Petrifilm™.

2.7 Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación de polifenoles totales se empleó el método de Folin Ciocalteu, según, (Vinson, Hao, Su, & Zubik, 1998; Singleton, Orthofer, & Lamuela, 1999) se basa en la reacción de los compuestos fenólicos del extracto vegetal con el reactivo de Folin- Ciocalteu (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico), mediante un mecanismo redox; que oxida lo polifenoles a fenolatos presentes en la muestra con la aparición de una coloración azulada (complejo molibdeno-tungsteno) y cuantificar por espectrofotometría a una longitud de onda de 765 nm en base a una curva patrón de Ácido Gálico.

En la tabla 15, se describen los equipos, reactivos y materiales para realizar la cuantificación de polifenoles totales.

Tabla 15.

Equipos, reactivos y materiales para la cuantificación de polifenoles totales.

Materiales	Equipos	Reactivos
Micropipetas (0,5-10 µL y 100-1000 µL), frascos color ámbar, piceta, 2 vasos de precipitación de 50 mL, papel aluminio, toallas de papel.	Ultrasonido BRANDON-1510, Equipo de reflujo, espectrofotómetro. UV-VIS(Jasco V-730) Lectura por triplicado.	Solución madre de ácido gálico (5 mg/mL), agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio al 20 %, Extracto hidroalcohólico e hidroglicéricos de <i>Calendula officinalis</i>

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

2.7.1 Elaboración de la curva de calibración del ácido gálico.

El ácido gálico es un ácido fenólico y es utilizado como molécula de referencia para la cuantificación de polifenoles de una muestra, a partir de una solución madre de ácido gálico se realizan diluciones para elaborar una curva patrón de ácido gálico para su posterior lectura por espectrofotometría (Huang, Ou, & Prior, 2005). En la figura 19 se describe el diagrama de flujo la elaboración de una curva de calibración del ácido gálico.

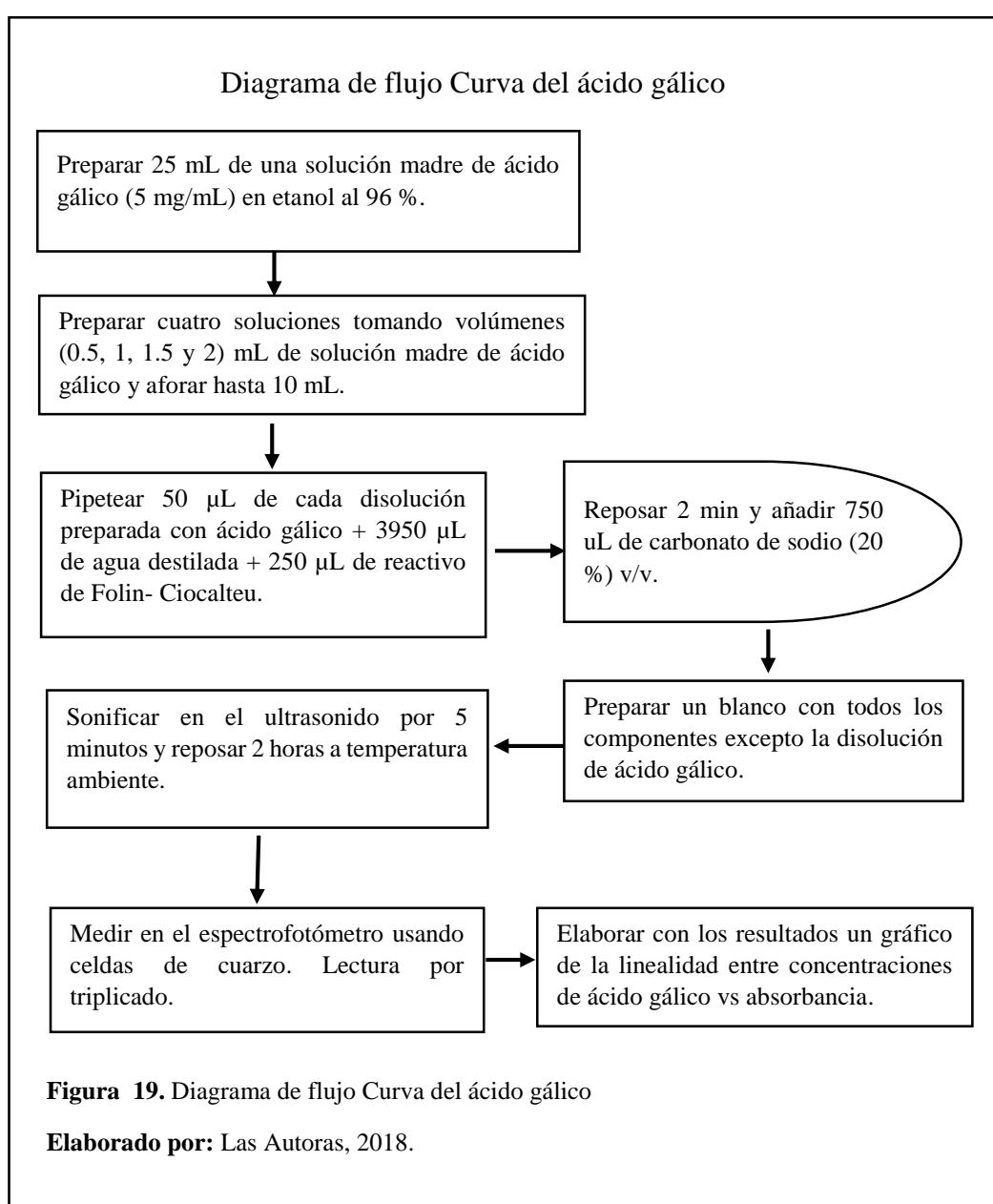
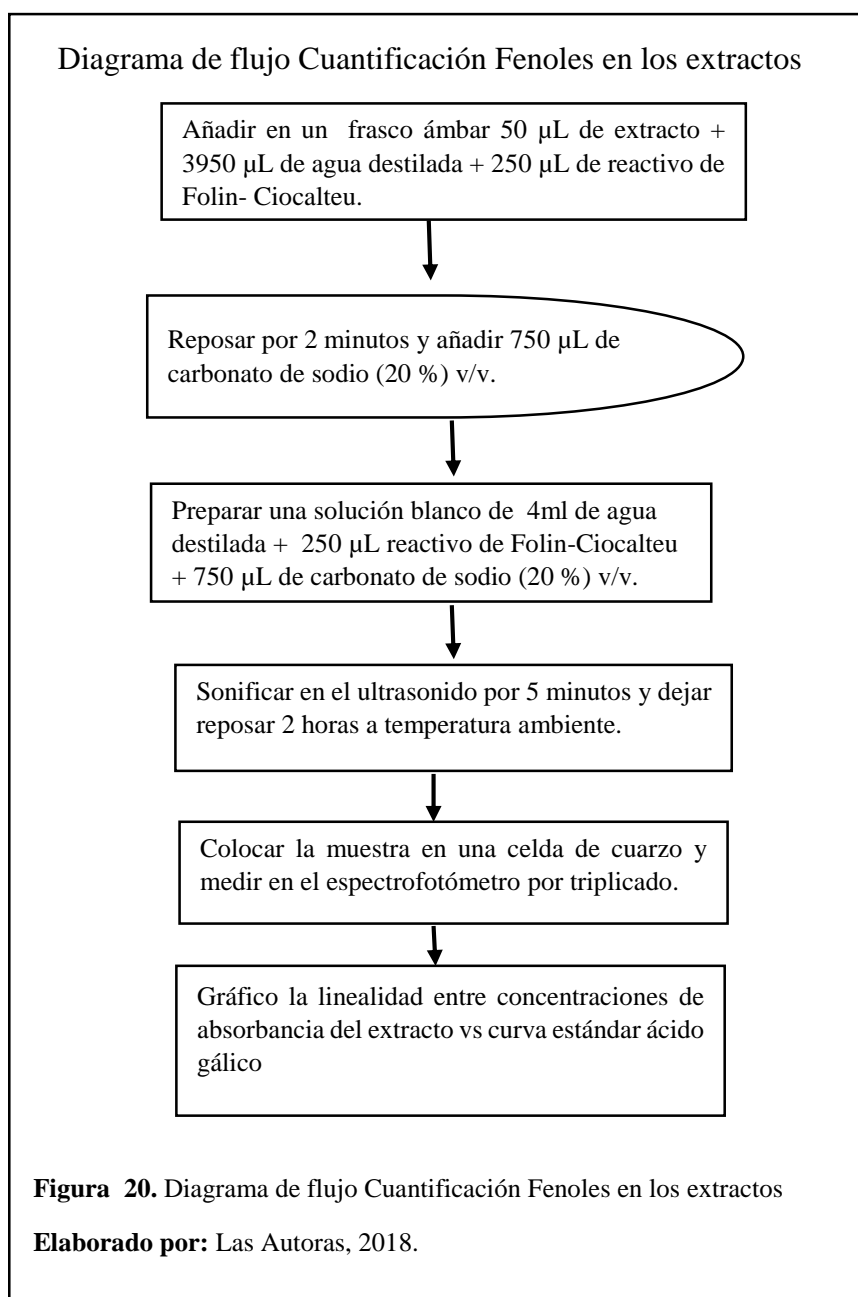


Figura 19. Diagrama de flujo Curva del ácido gálico

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

2.7.2 Cuantificación de fenoles en los extractos

La concentración de polifenoles en los extracto fue determinada por espectrofotometría utilizando como agente oxidante el reactivo de Folin-Ciocalteu vs una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico (Dastmalchi, Dorman, Kosarb, & Hiltunen, 2007). En la figura 20, se encuentra el diagrama de flujo para la cuantificación de fenoles de cada extracto.



2.8 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante total o capacidad antioxidante total es la medición analítica de concentraciones de radicales con diferente naturaleza, en un sistema oxidativo controlado. En productos de origen vegetal y en pétalos de la mayoría de plantas, se atribuye esta capacidad a la presencia de compuestos fenólicos, porque poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, importantes para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres (Ciappini, Stoppani, Martinet, & Alvarez, 2013; Shindo, Saito, & Sekiya, 2007).

Es importante recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático del compuesto fenólico aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos (Dziedzic & Hudson, 1984).

Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien con ellas mismas para formar un polímero. Por lo tanto la concentración de compuestos fenólicos, relacionada con la actividad antioxidante, es fundamental en el campo nutricional, medicinal y farmacológico (Shindo, Saito, & Sekiya, 2007; Vidal, y otros, 2006; Vanderjagt, Ghattas, Vanderjagt, Crossey, & Glew, 2002).

Por lo tanto un resultado alto en la cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría en extractos naturales, podría ser relacionado con una mayor actividad antioxidante total.

2.9 Análisis estadístico

Con la ayuda del software estadístico InfoStat se realizó un análisis estadístico para determinar diferencia significativa de los extractos de *Calendula officinalis* con las

siguientes variables en la técnica de percolación hidroalcohólico “Tiempo de percolación” (24 horas, 48 horas) y “Tipo de material vegetal” (flores frescas, flores secas) mientras que para la técnica de maceración hidroglicérica se combinó las siguientes variables “Tiempo de maceración” (3 días, 5 días) y “Tipo de material vegetal” (flores frescas, flores secas). Conjuntamente se aplicó un Test de Tukey con un alfa de 0,05 ($p=0,005$).

Capítulo III

3. Resultados y discusión

3.1 Control de Calidad del Material Vegetal

3.1.1 Control Físico- químico

Tabla 16.

Control de calidad físico-químico del material vegetal.

Parámetros	Valores reportados (%)	Valores limites*(%)
Material extraño	1,036 ± 0,310	2
Humedad	81,67 ± 1,75
Cenizas Totales	1,50 ± 0,125	6
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	1,42 ± 0,160	5
Cenizas solubles en agua	0,97 ± 0,040	7

Nota. * Límites de material extraño según la (Farmacopea Argentina, 2003).

* Límites de cenizas totales según la (Real Farmacopea Española, 2005).

* Límites de cenizas insolubles en ácido clorhídrico y solubles en agua según la (Pharmacopeia National Formulary, 1985)

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

Los resultados de los parámetros de calidad se presentan en la tabla 16; se observó que las flores de *Calendula officinalis* presentaron un porcentaje de material extraño de 1,036 % valor que se encuentra por debajo del 2 % del límite establecido por la (Farmacopea Argentina, 2003), este porcentaje representa una baja contaminación física del material vegetal, resultado de un proceso de recolección realizado de forma completamente específica. En el Anexo 1 se observa las tablas completas de los valores obtenidos para el análisis de control de calidad.

En la determinación de humedad los resultados reflejan que las flores frescas de *Calendula officinalis* contiene una alta cantidad de agua de 81,67 % ; un exceso de

agua en una droga vegetal puede provocar el crecimiento de microorganismo, micotoxinas producidas por hongos y el posterior deterioro de la droga vegetal disminuyendo el contenido de compuestos químicos (Salgueiro, Martins, & Correia, 2010), por lo que será necesario un proceso de secado inmediato y controlado para asegurar la estabilidad, un mayor rendimiento, disminución de microorganismos y preservación de los principios activos en la droga vegetal (Omelchuk, Krivut, & Voroshilov, 1999; Torres & Gil, 2004).

El porcentaje de cenizas totales en las flores de *Calendula officinalis*, reportó un valor inferior a lo establecido por la Real Farmacopea Española (2005) menciona que el valor de cenizas totales no debe exceder del 6 %. El valor de 1,50 % de cenizas totales de las flores de *Calendula officinalis* pretende establecer el bajo contenido de impurezas inorgánicas; tanto ceniza fisiológica, derivada de los tejidos de la planta (potasio, calcio, hierro etc.), como la ceniza no fisiológica (plaguicidas inorgánicos) que contiene la droga vegetal (Fonseca, Silva, & LK, 2010).

Mientras que para las cenizas solubles en agua (0,97 %), representa el contenido de sustancias orgánicas en la muestra vegetal y cenizas solubles en ácido clorhídrico (1,42 %), representa la concentración de componentes inorgánico como el sílice componente natural que se encuentra en rocas, suelo y arena; los dos valores mencionados se encuentran dentro del límite aceptado por (Pharmacopeia National Formulary, 1985).

3.1.2 Control microbiológico

Tabla 17.

Control microbiológico del material vegetal

Test	Valores reportados	Valores Límites *
Aerobios totales	< 10 UFC/g	100 UFC/g
Coliformes totales	0	100-400 UFC/g
Mohos y levadura	1 NMP/g	< 10 NMP/g

Nota. * Límites de control microbiológico del material vegetal según la (OMS, 1998).

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

En base a los resultados obtenidos en la tabla 17, el recuento macroscópico del crecimiento de aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras en placas Petrifilm 3M, no exceden los límites según (OMS, 1998).

El recuento de bacterias aerobias totales <10 UFC/g indica una baja o nula contaminación microbiana, en coliformes totales no se presenta crecimiento alguno por lo que se puede decir que hubo ausencia de colonias fermentadores fuertes típicas de la lactosa en las muestras vegetales, refleja la calidad sanitaria de la muestra, las condiciones higiénicas de manipulación, los valores de mohos y levaduras tampoco excedieron los límites antes mencionados, determinando una calidad microbiológica del material vegetal.

3.2 Diseño experimental

El diseño experimental se basó en dos variables tanto para la técnica de extracción por percolación como para la técnica de extracción por maceración obteniendo un diseño factorial de 2x2. La técnica de percolación con el solvente etanol combina las variables “Tiempo de percolación” (24 horas-48 horas) y “tipo de material vegetal” (flores

frescas- flores secas) obteniendo 4 tratamientos con 3 repeticiones mientas que para la técnica de maceración con el solvente glicerina combina las siguientes variables “Tiempo de maceración” (3 días- 5 días) y “tipo de material vegetal” (flores frescas- flores secas) obteniendo 4 tratamientos con 3 repeticiones con un total de 24 extractos para analizar.

En la tabla 18, se describe el diseño experimental de la investigación.

Tabla 18.

Diseño experimental

	Tiempo	Tipo de solvente	Tipo de material vegetal	Tratamiento
Técnica de percolación	24 horas	Etanol - Agua (90-10 %)	Flores frescas	H1F2
		Etanol - Agua (90-10 %)	Flores secas	H1F1
	48 horas	Etanol - Agua (90-10 %)	Flores frescas	H2F2
		Etanol - Agua (90-10 %)	Flores secas	H2F1
Técnica de maceración	3 días	Glicerina - Agua (50-50 %)	Flores frescas	D3F2
		Glicerina - Agua (50-50 %)	Flores secas	D3F1
	5 días	Glicerina - Agua (50-50 %)	Flores frescas	D4F2
		Glicerina - Agua (50-50 %)	Flores secas	D4F1
Total: 3 repeticiones por cada tratamiento con un total de 24 extractos.				

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

3.3 Obtención de extractos fluidos

El total de observaciones fueron 24 extractos con sus respectivas variables: “tipo de extracto” (extracto hidroalcohólico 24 horas, extracto hidroalcohólico 48 horas,

extracto glicérico 3 días, extracto glicérico 5 días) y “tipo de material vegetal” (seco y fresco), con tres repeticiones para cada uno.

Se identifica a los extracto por la siguiente codificación:

Tiempo de extracción /Tipo de material vegetal

Tiempo: Extracto hidroalcohólico percolación 24 horas (H1), extracto hidroalcohólico percolación 48 horas (H2), extracto hidroglicérico 3 días maceración (D3), extracto hidroglicérico 5 días maceración (D4).

Tipo de material vegetal: Seco (f1) y fresco (f2)

Numero de repetición: 1, 2,3

3.4 Control de calidad de los extractos

3.4.1 Ensayo organoléptico

Para realizar el ensayo organoléptico se evaluaron a los 8 tratamientos, 8 extractos (4 extractos hidroalcohólicos y 4 extractos hidroglicéricos) dentro de cada tratamiento se realiza tres repeticiones pero no existe variación organoléptica entre repeticiones debido a que contenían las mismas variables (flores secas y frescas; tiempo 24 y 48 horas). Todos los extractos presentaban un estado líquido composición característica de los extractos fluidos.

Tabla 19.**Ensayo organoléptico de los extractos fluidos de *Calendula officinalis*.**

Tratamiento	Color		Olor	
	Descripción	Escala numérica	Descripción	Escala numérica
H1f2	Amarillo verdoso	1	Intensamente modificada o hierbas con solvente etanol.	3
H2f2	Amarillo verdoso	1	Intensamente modificada o hierbas con solvente etanol.	3
H1f1	Ámbar	3	Intensamente modificada o hierbas con solvente etanol.	3
H2f1	Ámbar	3	Intensamente modificada o hierbas con solvente etanol.	3
D3f2	Café claro	2	Pétalos de caléndula	0
D4f2	Café claro	2	Pétalos de caléndula	0
D3f1	Ámbar	3	Pétalos de caléndula	0
D4f1	Ámbar	3	Pétalos de caléndula	0

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

Los resultados de la tabla 19, según la valoración mediante una escala propia de tonalidades de colores; los extractos hidroalcohólicos (4 extractos con las variables: flores secas y frescas; tiempo 24 y 48 horas) presentan colores desde amarillo verdoso=1 hasta ámbar=3 tanto en extractos con flores secas a 24 y 48 horas como extractos con flores frescas a 24 y 48 horas, lo que se puede decir que la coloración se debe a un alteración fisiológica relacionada con el ennegrecimiento de los pétalos se presenta por oxidaciones enzimáticas de compuestos fenólicos y la actividad de la polifenol oxidasa (PPO), que forman polímeros de color ámbar (Franck, y otros, 2007).

De la misma manera los extractos hidroglicéricos (4 extractos con las variables: flores secas y frescas; tiempo 3 días y 5 días) presentan colores de café claro=2 a ámbar=3, debido al ennegrecimiento de las flores.

Según Confalonieri (2007) la presencia de antocianinas, son indicadores ácido-base ya que presentan distinto color en medio ácido (colores claros) y en medio alcalino (colores oscuros). Estos colorantes se pueden extraer de los pétalos fácilmente con alcohol.

En cuanto al olor fue característico para los extractos hidroalcohólico (4 extractos con las variables: flores secas y frescas; tiempo 24 y 48 horas) olor intensamente modificada o hierbas con solvente etanol sin embargo en los extractos hidroglicéricos (4 extractos con las variables: flores secas y frescas; tiempo 3 días y 5 días) se apreció más el olor a pétalos de *Calendula officinalis*.

3.4.2 Ensayo físico- químico

Para los parámetros físico-químicos de los extractos, se realizó el promedio de los 4 extractos hidroalcohólicos y el promedio de los 4 extractos hidroglicéricos de *Calendula officinalis* con sus respectivas variables establecidas en el estudio, se determinó el pH, índice de refracción, densidad y sólidos totales.

Tabla 20.

Determinación físico-químico de extractos hidroalcohólico

Parámetros	Extractos hidroalcohólico			
	H1f2	H2f2	H1f1	H2f1
pH	5,69 ± 0,11	5,99 ± 0,08	5,75 ± 0,12	5,92 ± 0,09
Índice de refracción	1,36 ± 0,003	1,36 ± 0,002	1,38 ± 0,001	1,37 ± 0,001
Densidad (g/cm³)	0,93 ± 0,012	0,91 ± 0,015	0,89 ± 0,095	0,9 ± 0,004
Sólidos Totales (g)	2,0275 ± 0,0247	1,7 ± 0,13	2,4 ± 1,42	2,2 ± 0,397

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

Tabla 21.**Determinación físico-químico de los extractos hidroglicéricos**

Parámetros	Extractos hidroglicéricos			
	D3f2	D4f2	D3f1	D4f1
pH	5,29 ± 0,06	4,77 ± 0,49	5,75 ± 0,01	5,79 ± 0,05
Índice de refracción	1,38 ± 0,001	1,37 ± 0,001	1,4 ± 0,001	1,41 ± 0,001
Densidad (g/cm ³)	1,09 ± 0,0004	1,07 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,15 ± 0,004
Sólidos Totales (g)	2,26 ± 1,385	1,7 ± 0,99	2,21 ± 1,93	1,28 ± 1,018

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

Los resultados físico-químicos de los extractos hidroalcohólicos e hidroglicéricos que presentan las tablas 20 y 21 con respecto al promedio del pH (Anexo 2) son valores ácidos (ácido < pH=7).

Además el manto ácido de una piel sana tiene un pH que está entre 5,4 y 5,9 cuya acidez beneficia al crecimiento de flora bacteriana saludable que protege a la piel de microorganismos patógenos (Orlandi, 2004).

El análisis estadístico realizado con los valores del pH de los extractos, define que existe diferencia significativa de uno de ellos, el extracto H4F2 (extracto hidroglicérico 5 días flores secas) con un valor de pH de 4,77 se separa del resto de los extractos que se encuentran en el mismo rango de significancia. Tabla 22.

Tabla 22.**Análisis estadístico de pH**

Tipo de extracto	Tipo de material vegetal	Medias	Rangos de significancia
H2	F2	5,99	A
H2	F1	5,92	A
H4	F1	5,79	A
H1	F1	5,75	A
H3	F1	5,75	A
H1	F2	5,69	A
H3	F2	5,29	AB
H4	F2	4,77	B

Elaborado por: Las Autoras, 2018.

En el caso del índice de refracción (Anexo 3) para el extracto hidroalcohólico presenta valores de 1,36-1,38 siendo valores mayores al índice de refracción del agua 1,33 en cuanto el índice de refracción del extracto hidroglicéricos van de 1,37-1,41 siendo inferior al índice de refracción de la glicerina de 1,47. El índice de refracción está influenciado por el tipo de disolvente utilizado según (López, 2016) a medida que disminuye el tiempo del proceso extractivo, se incrementa la concentración alcohólica del menstuo, aumentando el índice de refracción, en los dos casos los rangos de índice de refracción denotan una mezcla del solvente puro, que corresponde a las mezclas utilizadas como solventes de extracción.

El agua disuelve fácilmente los compuestos con funciones hidroxilo, amino, sulfhidrilo, los ésteres, cetonas y una gran variedad de otros compuestos orgánicos siendo un disolvente excelente para los compuestos iónicos (Mathews, 2002).

En cuanto a la densidad obtenida en los extractos hidroalcohólico son menores a la densidad del agua (1 g/cm^3) pero superior a la densidad de etanol ($0,78 \text{ g/cm}^3$) esto se debe a la mezcla agua y etanol al momento de la percolación, mientras que la densidad de los extractos hidroglicéricos presentan valores inferiores a la densidad de la glicerina $1,26 \text{ g/cm}^3$ y mayores a la densidad del agua. La tabla completa se encuentra en el (Anexo 4).

En el caso de sólidos totales de los extractos hidroalcohólico se obtuvo un valor de 1,7-2,4 mientras que los valores para los extractos hidroglicéricos van de 1,28-2,26 valores que hacen referencia al contenido de materia disuelta y suspendida presentes en los extractos. En el Anexo 5 se observa la tabla completa de los extractos para la determinación de sólidos totales.

De forma general los parámetros físico químicos de los extractos no permiten diferenciarlos, aunque se utilizan diferentes condiciones de extracciones las características físicas químicas son parecidas.

3.5 Determinación microbiológica

Al determinar la presencia de microorganismos (aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras) como se muestra en la tabla 23 los extractos presentan la ausencia total en todos los tratamientos.

Según (Benites, y otros, 2011) indica que el contenido de fenoles totales o polifenoles están relacionado con la inhibición en la actividad bacteriana y fúngica.

Tabla 23.

Análisis microbiológico de los extractos

Test	Aerobios totales	Coliformes totales	Mohos y levadura
UFC/ml	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
UFC/ml limite *	100	100	100

Nota. * Límites para productos de uso fitoterápico establecido por la (OMS, 1998).

Elaborado por: Las autoras, 2018

3.6 Cuantificación de compuestos fenólicos

Tabla 24.

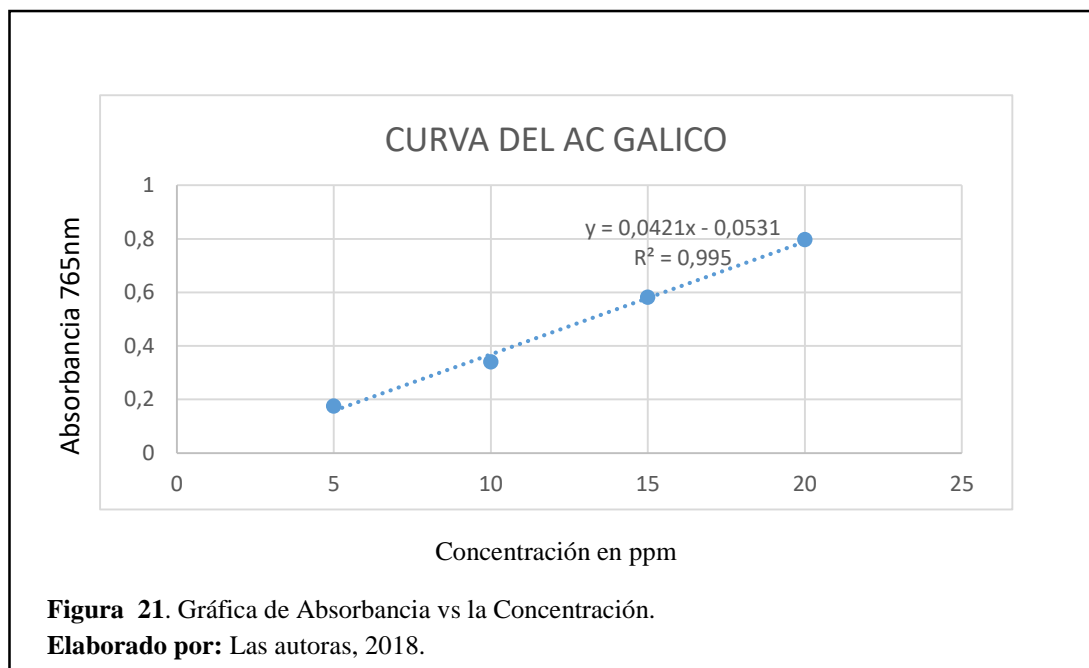
Curva de calibración para fenoles totales con ácido gálico

Estándar	Concentración de ácido gálico (ppm)	Absorbancia 765nm
Blanco	0	0
C1	5	0,175
C2	10	0,3408
C3	15	0,5817
C4	20	0,7969

Elaborado por: Las autoras, 2018

Para la cuantificación de fenoles se realizó una curva de calibración con ácido gálico con estándares que sirve para calcular las concentraciones de fenoles totales presentes en cada extracto.

Las absorbancias se reportan en la tabla 24 con estos valores se realizó la gráfica de Absorbancia vs la Concentración (Figura 21) la curva presenta un R de 0,995 que es



3.7 Análisis Estadístico

Tabla 25.

Resultados mg ácido gálico/mL de extracto

Extractos	Concentración 1 de fenoles (mg GAE / mL)	Concentración 2 de fenoles (mg GAE / mL)	Concentración 3 de fenoles (mg GAE / mL)	Total de compuestos fenólicos (mg GAE / mL)
H1F2	2,684	2,710	3,078	2,824
H2F2	2,014	2,752	2,213	2,326
H1F1	5,434	5,693	6,828	5,985
H2F1	4,643	5,023	6,033	5,233
D3F2	4,340	3,800	4,064	4,068
D4F2	1,370	1,268	1,261	1,300
D3F1	3,071	2,477	2,472	2,673
D4F1	4,218	3,686	4,817	4,240

Elaborado por: Las autoras, 2018.

El test ANOVA revela que si existe diferencia significativa entre las medias de la concentración de ácido gálico, tipo de extracto y tipo de material vegetal. También el

análisis de Tukey de la interacción entre las 2 variables presentan diferencia significativa ($p < 0,005$) tal como se observa en la Tabla 25 y 26.

Tabla 26.

Análisis de varianza para las variables y sus interacciones.

Origen	Tipo III Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig
Modelo	51,72	7	7,39	33,69	<0,0001
Tipo de Extracto	8,46	3	2,82	12,85	0,0002
Tipo de material vegetal	22,10	1	22,10	100,73	<0,0001
Extracto*Material vegetal	21,17	3	7,06	32,17	<0,0001
Error	3,51	16	0,22		
Total	55,23	23			

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Tabla 27.

Estadística descriptiva de tratamientos

Tipo de extracto	Tipo de material vegetal	Medias	N	Rangos de significancia
H1	F1	5,98	3	A
H2	F1	5,23	3	AB
D4	F1	4,24	3	B
D3	F2	4,07	3	BC
H1	F2	2,82	3	CD
D3	F1	2,74	3	D
H2	F2	2,32	3	DE
D4	F2	1,30	3	E

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Como se muestra en la tabla 27, la estadística descriptiva de tratamientos del análisis de Tukey, permite identificar la formación de 8 rangos de significancia siendo el tratamiento con mayor concentración de ácido gálico, el tratamiento H1F1 (Extracto hidroalcohólico percolación 24 horas flores secas). Según Coello R (2012) el etanol ayuda a solubilizar principios activos parcialmente solubles en agua y además es un

estupendo conservante, mientras que el tratamiento con menor concentración de ácido gálico corresponde a D4F2 (extracto hidroglicérico 5 días maceración flores frescas); es importante resaltar que de acuerdo al valor de fenoles totales y al análisis estadístico la formación de 8 rangos de significancia determina interacción interna entre cada variable dentro de las técnicas utilizadas.

Tabla 28.

Tipo de Material Vegetal

Tipo de material vegetal	Medias	N	Rango de significancia
F1	4,55	12	A
F2	2,63	12	B

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Para el caso de tipo de material vegetal si existe diferencia significativa siendo mejor el uso de flores secas para una mayor extracción de fenoles totales. Tal como menciona Lastra & Piquet (2015) el secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de los principios activos como se observa en los resultados obtenidos.

Según Omelchuk & Voroshilov (1984) y Amiot, Tacchini & Aubert (1992) la necesidad del secado de las flores de *Calendula officinalis* es importante y se debe realizar inmediatamente a partir de su colecta ya que su almacenamiento por 3,5 horas en sacos de polietileno conlleva una pérdida del 28-30 % de los carotenoides y del 24-26 % de los flavonoides. En general, el secado a temperaturas menores de 20 °C tiene menores rendimientos en la conservación de principios activos, debido a una mayor actuación de la enzima polifenol oxidasa y temperaturas mayores de 100 °C tienden a reducir la cantidad de principios activos (Lastra & Piquet, 2015).

Tabla 29.

Tipo de extracto

Tipo de extracto	Medias	N	Rango de significancia
H1	4,40	6	A
H2	3,78	6	AB
D3	3,40	6	BC
D4	2,77	6	C

Elaborado por: Las autoras, 2018

Como se indica en la tabla 29 la mejor técnica de extracción fue H1 (Extracto hidroalcohólico percolación 24h) González Villa (2004) menciona que la percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, mejora notablemente la calidad del producto o principio activo deseado.

Mientras que la técnica con menor concentración de fenoles fue D4 (extracto hidroglicérico 5 días maceración). Según Kuklinski (2003) en el proceso de maceración no es posible alcanzar una extracción completa de metabolitos secundarios en el material vegetal debido a la lentitud del proceso, además Sharapin (2000) menciona que existen factores determinantes que influyen en la extracción de bioactivos por maceración como son: humedad del material vegetal, la cantidad, solvente y la agitación mecánica.

3.8 Análisis de resultados con extracto comercial.

Tabla 30

Comparación extracto hidroalcohólico vs extracto comercial.

Extractos	mg GAE /mL de extracto
Extracto H1f1	5,985
Extracto comercial	4,396

Elaborado por: Las autoras, 2018.

De los 8 tratamientos obtenidos la concentración con mejor resultado de fenoles totales fue H1F1 (Extracto hidroalcohólico percolación 24 horas flores secas) que se comparó

con un extracto comercial (Anexo 6) este presenta un valor de 4,39 mg GAE / mL de extracto siendo la concentración menor al extracto estandarizado. Por esta razón se realiza una ficha técnica (Anexo 7) utilizando como especificación los valores del mejor extracto identificado en esta investigación con una desviación del 5 % atribuida al error de análisis, de esta forma se establecen las condiciones y parámetros que garanticen la reproducibilidad y la estandarización de un extracto de *Calendula officinalis*, que se puede emplear en futuras formulaciones cosméticas.

Capítulo IV

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Se confirmó la hipótesis que menciona: existe diferencia significativa en la cantidad de fenoles totales entre tratamientos planteados en la investigación.
- Los 8 extractos preparados de *Calendula officinalis*, 4 por el método de percolación y 4 por el método de maceración presentaron cantidades significativas de fenoles totales. Al realizar el análisis estadístico de los tratamientos se determinó que la interacción entre las variables dentro de cada Técnica: En percolación, “tiempo de percolación” (24 horas-48 horas) y maceración (3 días- 5 días) “tipo de material vegetal” (flores frescas- flores secas) influye en el resultado final de fenoles totales, analizando todos los tratamientos, H1F1 (Extracto hidroalcohólico percolación 24 horas flores secas) representa el tratamiento con mayor valor de fenoles con 5,98 mg de ácido gálico/mL de extracto, mientras que el tratamiento con menor concentración de fenoles totales fue D4F2 (extracto hidroglicérico 5 días maceración flores frescas) el cual obtuvo 1,30 mg de GAE/mL de extracto.
- Es importante mencionar que si existe diferencia significativa al analizar las variables de forma independiente, material vegetal, interacción material vegetal – tipo de extracción.

- Mediante el análisis cuantitativo el método de extracción por percolación registra mayor contenido de fenoles totales en las muestras analizadas y el proceso de secado de las mismas favorece al desarrollo de estructuras fenólicas.
- El extracto estandarizado de flores de *Calendula officinalis* se comparó con un extracto comercial, el contenido de fenoles totales del extracto de este estudio fue superior al extracto comercial.
- El parámetro de interés fue el contenido de fenoles totales en los extractos, el cual nos permitió establecer una ficha técnica que establece las condiciones adecuadas para la obtención del extracto (técnica, solvente, material vegetal y tiempo) de esta manera garantizar la reproducibilidad del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* llegando a la estandarización del mismo.

4.2 Recomendaciones

- Evaluar en futuras investigaciones el tiempo de vida útil del extracto estandarizado para garantizar la estabilidad de los principios activos en estudio, además almacenar el extracto en un frasco ámbar y en refrigeración.
- Tener en cuenta que ciertos fenoles totales o polifenoles son fotosensibles, por lo que es recomendable realizar la cuantificación en espacios con poca luz visible para obtener la concentración de los fenoles totales o polifenoles por espectrofotometría.

Bibliografía

- Abdullah , H., & Efstratiou, E. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 173-176.
- Amiot, M., Tacchini, M., & Aubert, S. a. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science* , 57(4), 958-962.
- Anonymous. (2008). Tentative amended safety assessment of *Calendula officinalis* extract, *Calendula officinalis* flower, *Calendula officinalis* flower extract, *Calendula officinalis* flower oil and *Calendula officinalis* seed oil. *Cosmetic Ingredient Review*.
- Ansalini, R., & Wilches, I. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en algunas Comunidades de la Provincia del Azuay, Cañar y Loja para afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 89-97.
- ARCSA. (2014). *Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria*. Disponible en: <http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/10/inscripciones-productos-naturales-nacional.pdf>
- Arraiza, M. (2009). *Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales: Universidad Politécnica de Valencia*. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema11.pdf>
- Barteles, H. (1980). *Inspección veterinaria de las carnes*. España: Acribia.
- Benites, J., Díaz, R., López, J., Gajardo, S., Kusch, F., & Rojas, M. (2011). Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *BIOFARBO*, 1-7.
- Berdonces, J. (2009). *Gran Enciclopedia de Plantas Medicinales: el Dioscórides del Tercer Milenio*. España: Tikal Ediciones.
- Blasa, M., Candiaracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M., & Piatti, E. (2007). Honey flavonoids es protection agents against oxidative damage to human red cells. *Food Chemistry*, 104.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia.Fitoquímica. Plantas medicinales (Segunda ed.)*. España: Acribia.
- Caldas, A. (2012). *Optimización, Escalamiento y Diseño de una planta piloto de extracción sólido-líquido*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Caluña-Espin, N., Tisalema-Caluña, M., & Caluña-Til, T. (2008). *Los Chibuleos: origen, identidad, desarrollo y justicia de un pueblo indígena en los andes ecuatorianos*. Ecuador: William F. Somers.

- Cañigüeral, S. (2003). *Identidad y pureza de drogas vegetales y extractos*. Cartagena: Seminario Taller sobre Estandarización de Extractos vegetales y Garantía de Calidad de Productos Fitoterápicos.
- Carmona, R., López, O., & González, M. (2009). Relación entre índice de refracción y sólidos totales en extractos acuosos de *Calendula officinalis* L. (caléndula) y *Ocimum sanctum* L. (albahaca morada). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14, 23-28.
- Carmona, R., López, O., González, M., & Muñoz, A. (2006). Optimización del proceso de obtención de extracto acuoso de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 11, 3-4.
- Castillo, C. (2016). *Medicamentos a base de plantas en dermatología: últimos avances*. Madrid: Universidad Complutense.
- Castillo, E., & Martínez, I. (2007). *Manual de Fitoterapia*. España: Elsevier.
- Castro, D., Díaz García, J., Serna Betancur, R., Martíñez Tobón, M. D., Urrea, P. A., Muñoz Durango, K., & Osorio Durango, E. J. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales*. Medellín: ISBN.
- Cecchini, T., & Ticli, B. (2016). *El libro de las Hierbas Medicinales*. USA: De Vecchi.
- Chen, J. (2007). Extractos estandarizados de hierbas medicinales chinas: estudio de caso del danshen (*Salvia miltiorrhiza Bunge*). *J. Food Drug Anal.*, 347 - 364.
- Ciappini, M., Stoppani, F., Martinet, R., & Alvarez, M. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 46.
- Cioinac S.E. (2016). Use of calendula cream balm to medicate the feet of diabetic patients: Case series. *International Journal of Nursing Sciences*, 102-112.
- Citadini-Zanette, V., & otros, y. (2012). *Calendula officinalis* L. (Asteracea) : Aspectos botânicos, ecológicos e usos. *Visão Acadêmica*, 13, 6-23.
- Coello, R. (2012). "E laboración y control de calidad de gel cicatrizante a base de Sabila (*aloe vera*) y Calendula (*calendula officinalis*)". *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 36.
- Coello, T. (1988). Plantas medicinales y acné. *Farm Professor*, 2, 46-49.
- Confalonieri, A. (2007). Extracción de indicadores ácido-base. In *Las flores como reactivos quimicos*. Buenos Aires: educ.ar.
- Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 24, 80-84.
- Dastmalchi, K., Dorman, D., Kosarb, M., & Hiltunen, R. (2007). Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Journal of Food Science and Technology*, 240, 239–248.

- Della, L., & Tubaro, A. (1994). El papel de los triperpenoides en la actividad antiinflamatoria tópica de las flores de *Calendula officinalis*. *Plant Med*, 516-520.
- Denardi, L., & Bortolin, K. (2009). Topical *Calendula officinalis* L. successfully treated exfoliative cheilitis: a case report. *JD Cases Journal*.
- Dominguez, L. (2009). Utilización de flores de calendula (calendulae flos) en salsa. *Universidad Nacional de Colombia*, 17.
- Domínguez, L. (2012). Efecto de la aplicación del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula (*Calendula officinalis*) en la estabilización de color y vida útil en pulpa de frutas. *Universidad Nacional de Colombia*, 19.
- Dumenil, G. (1980). Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* Lin. flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis*. *Ann Pharm Fr*, 493.
- Dziedzic, S., & Hudson, B. (1984). Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*, 14, 45-51.
- EMA. (2007). *Informe Anual de la Agencia correspondiente a 2007*. Londres: EMA.
- Ercetin, T., & Senol, F. (2012). Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 203-208.
- Farmacopea Argentina. (2003). *Métodos de Análisis: Cenizas insolubles en ácido*. Argentina: Ministerio de Salud de la Nación .
- Farmacopea Argentina. (2003). *Métodos de Análisis* (7ma ed., Vol. 1). Buenos Aires: ANMAT.
- Farmacopea MERCOSUR. (2008). *Métodos Generales de Farmacognosia*. Buenos Aires: MERCOSUR/XLII SGT N° 11/P.RES. N° 08/14.
- FDA. (2006). *Cosmetic ingredient use as a function of product category*. VCRP - FDA Database. Silver Spring, MD: US Food and Drug.
- Fenaroli's , G. (1975). *Handbook of Flavor Ingredients*. New York: CRC Press.
- Fleischner, A. (1985). Plants extract to accelerate healing and reduce inflammation. *Cosmet Toilet*, 100, 45-58.
- Flores , R. (1998). *Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas* (Segunda ed.). Madrid: Cultural.
- Fonseca, F., Silva, A., & LK, L. (2010). Justicia Pectoralis Jacq., Acanthaceae: Preparation and Characterisation of the Plant Drug Including Chromatographic Analysis by HPLC-PDA. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 871-877.

- Fonseca, Y., & Cantini, C. (2011). Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. *Journal Farm Scient*, 2182-2193.
- Franck, C., Lammertyn, J., HO, Q., Ververon, P., Verliden, B., & Nicolai, B. (2007). Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 1-13.
- Gazim , Z., Moraes, C., Fraga, S., Estivaleti, T., & García, D. (2008). Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 61–63.
- Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. España: Médica Panamericana.
- Giraldo , S., & Bernal, M. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C. . *Universidad Nacional Abierta y a Distancia*, 73-80.
- Gonzalez , A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas Amazónicas* . Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Gottschalck, T., & Bailey, J. (2008). International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook. *CTFA*.
- Gran Velada. (2018, Mayo 5). *Gran Velada: Materiales para tu Creatividad*. Disponible en: <https://www.granvelada.com/es/extractos-de-plantas/441-venta-propiedades-de-donde-comprar-extractos-de-calendula-para-jabones-cremas-unguentos-artesanales-naturales-2004410000009.html>
- Grosch, & Belitz. (1988). *Química de los alimentos*. España: Acribia.
- Guerra, E. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio* . Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala .
- Guzman, D., & Chevez, J. (2007). Estudio bromatológico de cladolio de nopal (*Opuntia ficus indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73, 41-45.
- Hamburger, M., & Adler, S. (2003). Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 328-338 .
- Haslam, E., & Lilley, T. (1988). Natural astringency in foodstuffs. Molecular Interpretation CRC. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27, 1-25.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841.

- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. (2010). Sala especializada de productos fitoterapéuticos y suplementos dietarios. *Acta No. 13*, (pp. 30-32). Bogotá.
- Kalvatchev , Z., & Walder, R. (1997). Actividad anti-VIH de extractos de flores de *Calendula officinalis*. . *Biomed Pharmacother*, 176-180.
- Kamath, J., Rahul, N., & Ashok, C. (2008). *Psidium guajava* L: A review. *International Journal of Green Pharmacy*, 9-12.
- Kuklinski, K. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lastra , H., & Piquet, R. (2015). *Calendula officinalis* L. *Centro de Investigacion y Desarrollo de Medicamentos*, 189.
- Leite, M., & Dominguez, H. (2016). Optimization of chemometric approaches for the extraction of isorhamnetin-3-O-rutinoside from *Calendula officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 408-414.
- López, A. (2016). Quality parameters for plant and extracts used in the preparation of an expectorant formulation. *Revista Cubana de Farmacia*, 50(2).
- Lozoya, X. (1997). I. Quercetine glycosides. *Archives of Medical Research*, 11-15.
- Makó, E. (2012). HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 241-250.
- Martínez, I., Periago, M., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Ciencia*, 1-7.
- Mathews, C. K. (2002). *Bioquímica*. Madrid, España: Pearson Addison Wesley.
- Medina, M. (2006). *Análisis de las Cenizas: Alcalinidad y Solubilidad de las Cenizas en Ácido y Agua. Determinación de Calcio, Hierro y Fósforo*. (U. C. Venezuela, Ed.) Recuperado mayo 6, 2018, Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/mmedina/archivos/Practica7cenizas.pdf>
- Metwally, A., & Omar, A. (2011). Monograph of *Psidium guajava* L. *Pharmacognosy Journal*, 89-104.
- Michel, F. (1977). *Apis mellifica* and *Calendula officinalis* Lin. combination active against sunburn. *Ger offen*.
- Montealegre, C. (2011). *Etnotánica preliminar del Espíngo (Occotea quixos) en la medicina tradicional indígena Inga, pruebas fitoquímicas y actividad antimicrobiana*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Moore , T., Sánchez , L., & Desmarchelier, C. (2005). *Proyecto de atención primaria de la salud con plantas medicinales y fitomedicamentos “cultivando la salud”*. Buenos Aires: Municipio de Malvinas Argentinas.

- Muley , B., Khadabadi, S., & Banarase, N. (2009). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 455-465.
- Muñoz, L. (2004). Plantas Medicinales Españolas *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Medicina Naturista*, 257-261.
- Naranjo, P., & Coba, J. (2003). *Etnomedicina en el Ecuador* (Vol. 3). Quito: Corporación Editora Nacional.
- Naveda, G. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (Ruta graveolens), con alto contenido de Polifenoles*. Quito: Escuela Politécnica Naciona.
- Nicolaus, C. (2016). Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono- and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non-aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 116.
- Norma Cubana NRSP 309. (1991). *Medicamentos de origen vegetal: Droga Cruda. Métodos de ensayo*. La Habana: MINSAP.
- Norma Cubana NRSP 310. (1991). *Medicamentos de origen vegetal: Droga Cruda. Especificaciones generales*. La Habana: Ministerio de Salud Pública (MINSAP).
- Norma Ecuatoriana. (1999). *Fitoterapicos. Droga Cruda. Especificaciones Generales*. Quito-Ecuador: INEN.
- NORMA Oficial Mexicana . (2008). *Alimentos a base de: Cereales, semillas comestibles, de harinas,semolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación.Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutricionales. Métodos de Prueba.* . México: Estados Unidos Mexicanos.Secretaría de Salud.
- Norma Ramal. (1992). *Medicamentos de origen vegetal. Droga vegetal. Métodos de ensayo*. Cuba.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0014. (1984). *Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas*. Ecuador: INEN. Disponible en: <https://archive.org/stream/ec.nte.0014.1984#page/n1/mode/2up>
- Ociosziynska , Y. (1977). Study of the chemistry of C. officinalis fluorescences. *Herba Polonica Journal*, 23.
- Omelchuk, M., Krivut, B., & Voroshilov, A. (1984). Efectos de las condiciones de secado en la calidad de *Calendula officinalis* Lin. como materia prima para medicamentos. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 18, 329-331.
- OMS. (1998). *Quality control methods for medicinal*. Geneva: World Health Organization (WHO).
- Orlandi, M. (2004). Piel sana y manto ácido. *Folia dermatol*, 122.

Osorio, E. (2009). *Aspectos Básicos de Farmacognosia. Antioquia.* Universidad de Antioquia aspectos básicos de farmacognosia

Ospina, B., Sandoval, J., Aristizábal, C., & Ramírez, M. (2003). La escala de Likert en la valoración de los conocimientos y las actitudes de los profesionales de enfermería en el cuidado de la salud. *Revista de Investigación y Educación en Enfermería*, 18(1), 14-29.

Palma, M. (2014). Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de caléndula (*Calendula officinalis* L.) y descriptores varietales. *Montecillo*, 55.

Palomino, O. (2001). *Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales*. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).

Pérez, T. (2009). *Obtención de extractos vegetales a partir de plantas medicinales*. Cuba: Academia.

PETRIFILM 3M. (2014). *Guía de Interpretación 3MTM PertrifilmTM*. EE.UU.: Microbiology Products Laboratoires 3M.

Pharmacopeia National Formulary. (1985). Normas de Estándar Internacional UPS XXVIII NF 18. 1267-1477.

Piaña, M., Persano, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanovd, S., & Declerck, C. (2004). Sensory analysis applied to honey: State of the Art. *Apidologie*, 35, 26-37.

Real Farmacopea Española. (2005). Madrid: RFE.

Rodríguez, E., & Villegas, E. (2012). Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Revista de la Universidad de Costa Rica*, 2, 25-32.

Salgueiro, L., Martins, A., & Correia, H. (2010). Raw materials: the importance of quality and safety. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 253-271.

Sánchez, F. (2009, Octubre). *II Congreso Nacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia-Palmira*. Extracción de Aceites Esenciales. Disponible en: http://sisav.valledelcauca.gov.co/CADENAS_PDF/AROMATICAS/c05.pdf

Santana, R. (2014). *Evaluación de Métodos de Extracción y Dosis de Aplicación de cola de caballo (Equisetum arvense) para el Control Ecológico de roya (Puccinia sp.) en el cultivo de cebolla blanca (Allium fistulosum)*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Schmididiger, O. (1987). Plants extracts Phytocosmetics and phytopharmac. New research is leading. *Drug and Cosmetics Industrial*, 28, 30, 32, 90 y 100.

Selles, E., Sánchez, J., Solan, C., Suiñe, J., & Tico, J. (1992). *Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid.

- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá: Convenio Andrés Bello; RIPROFITO del subprograma X del CYTED.
- Shindo, K., Saito, E., & Sekiya, M. (2007). Antioxidative activity of the flower of *Torenia fournieri*. *Revista de Medicinas Naturales*, 62(10), 247-258.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.
- Solís, P., De Solís, N., Gattuso, S., & Cáceres, A. (2003). *Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos*. 43-91: Organización de los Estados Americanos.
- Tanideh, N., Tavakoli, P., Saghiri, M., García, F., Amanat, D., Tadbir, A., . . . Tamadon, A. (2013). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Journal Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 115, 332-338.
- Tirado, D., Montero, P., & Acevedo, D. (2015). Estudio Comparativo de Métodos Empleados para la Determinación de Humedad de Varias Matrices Alimentarias. *Información Tecnológica*, 3-10.
- Tofiño-Rivera, A., Ortega-Cuadros, M., Melo-Ríos, A., & Mier-Giraldo, H. (2017). Vigilancia tecnológica de plantas aromáticas: de la investigación a la consolidación de la agrocadena colombiana. *Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18, 353-377.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., & Vlietinck, A. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 57-65.
- Torres, A., & Gil, M. (2004). *Estabilidad de medicamentos. Requisitos de los estudios según la normativa actual*. España: Monografías de AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de Industria).
- Treybal, R. (1986). *Operaciones con Transferencia de masa*. La Habana: Revolucionaria.
- Ubeeva, I. (1987). Effect of Calephlones on the course of experimental hepatitis. *Farmacol Toksikol*, 50, 66-71.
- UPS30-NF25. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. (30, Ed.) Convention Knoxville.
- Valero. (n.d.). *Webnode*. Recuperado el Junio 6, 2018, Disponible en: <https://valero7.webnode.es/tecnicas/a3-escala-tonal/>
- Vanderjagt, T., Ghattas, R., Vanderjagt, D., Crossey, M., & Glew, R. (2002). Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New México. *Journal Life Sci*, 70(9), 1035-1040.

- Velastegui, J. (2005). *Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario en los cultivos*. Quito: Agro Express.
- Vidal, A., Fallarero, A., Silva, E., Mara, A., De Lima, A., & Pavan, R. &. (2006). Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas*, 42(4), 589-600.
- Vinson, J., Hao, Y., Su, X., & Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quantity in foods: Vegetables. *Journal Agriculture Food Chemical*, 46, 3630-3643.
- Voigt, R. (1982). *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España: Acriba.
- Wojeicki, J. (1980). Comparative evaluation of the effect of *Aralia mandchurica* and *Calendula officinalis*. Saponosides of the level in blood serum. *Herba Polonica Journal*, 26, 233-237.
- World Health Organization. (1992). *Quality Control Methods for Medicinal Plant Material*. Switzerland.
- Xu, C., Zhang, H., & Shi, J. (2017). Ultrasound irradiation promoted enzymatic alcoholysis for synthesis of monoglyceryl phenolic acids in a solvent-free system. *Ultrasonidos Sonochemistry*, 120-126.

Anexos

Anexo 1. Análisis de control de calidad del material vegetal

Porcentaje de material extraño

Peso de la Muestras (g)	Material Extraño	Material Extraño
	(g)	(%)
1886,3	14,7	0,7793
1911,3	18,8	0,9836
1010,2	13,6	1,346
	Promedio total	1,0363 ± 0,310

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Porcentaje de humedad

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Humedad (%)
1	3,03	1,04	83,42
2	3,02	0,98	81,52
3	3,03	1,01	80,06
		Promedio total	81,67 ± 1,75

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Porcentaje de cenizas totales

Peso crisol (g)	Cápsula + Muestra (g)	Peso cenizas (g)	Cenizas totales (%)
23,5584	25,2514	23,5841	1,51801536
23,3778	25,1846	23,4047	1,48882001
22,4848	24,3312	22,5108	1,40814558
21,2605	22,849	21,2837	1,46049732
20,6063	22,3961	20,6354	1,62587999
22,8496	24,5862	22,8763	1,53748704
		Total	1,50 ± 0,125

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Porcentaje de cenizas solubles en Ácido clorhídrico.

Peso cenizas (g)	Peso cenizas + Agua (g)	Cápsula + Cenizas solubles (g)	Cenizas solubles en agua (%)
21,2837	21,2697	21,268	0,98835379
20,6354	20,6192	20,6187	0,93306515
22,8763	22,8603	22,8587	1,01347461
		Total	0,97 ± 0,040

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Porcentaje de cenizas solubles en Ácido clorhídrico.

Peso cenizas (g)	Peso cenizas + ácido clorhídrico (g)	Cápsulas + cenizas solubles (g)	Cenizas solubles en ácido clorhídrico (%)
23,5841	23,5603	23,5613	1,3467218
23,4047	23,376	23,376	1,58844366
22,5108	22,4856	22,4859	1,34857019
		Total	1,42 ± 0,160

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Anexo 2. pH de los extractos de *Calendula officinalis*.

Extractos			Extractos		
Percolación	pH	Promedio	Maceración	pH	Promedio
H1F2 (1)	5,66		D3F2 (1)	5,33	
H1F2 (2)	5,58	5,69 ± 0,11	D3F2 (2)	5,19	5,29 ± 0,06
H1F2 (3)	5,83		D3F2 (3)	5,35	
H2F2 (1)	5,92		D4F2 (1)	5,02	
H2F2 (2)	6,07	5,99 ± 0,08	D4F2 (2)	5,26	4,77 ± 0,49
H2F2(3)	5,97		D4F2 (3)	4,02	
H1F1 (1)	5,73		D3F1(1)	5,74	
H1F1(2)	5,87	5,75 ± 0,120	D3F1(2)	5,75	5,75 ± 0,01
H1F1(3)	5,66		D3F1(3)	5,75	
H2F1(1)	5,79		D4F2 (1)	5,84	
H2F1(2)	5,96	5,92 ± 0,09	D4F2 (2)	5,78	5,79 ± 0,05
H1F1(3)	6,01		D4F2 (3)	5,75	

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Anexo 3. Índice de refracción de los extractos de *Calendula officinalis*.

Extractos			Extractos		
Percolación	IR	Promedio	Maceración	IR	Promedio
H1F2 (1)	1,365		D3F2 (1)	1,38	
H1F2 (2)	1,363	1,36 ± 0,003	D3F2 (2)	1,379	1,38 ± 0,001
H1F2 (3)	1,364		D3F2 (3)	1,379	
H2F2 (1)	1,365		D4F2 (1)	1,37	
H2F2 (2)	1,365	1,36 ± 0,002	D4F2 (2)	1,381	1,37 ± 0,001
H2F2 (3)	1,363		D4F2 (3)	1,358	
H1F1 (1)	1,375		D3F1(1)	1,399	
H1F1 (2)	1,375	1,38 ± 0,001	D3F1(2)	1,396	1,40 ± 0,001
H1F1 (3)	1,375		D3F1(3)	1,395	
H2F1 (1)	1,371		D4F2 (1)	1,407	
H2F1 (2)	1,367	1,37 ± 0,001	D4F2 (2)	1,409	1,41 ± 0,001
H1F1 (3)	1,367		D4F2 (3)	1,412	

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Anexo 4. Densidad (g/cm³) de los extractos de *Calendula officinalis*.

Extractos	d1 (g/cm ³)	d2 (g/cm ³)	d3 (g/cm ³)	Promedio
H1F2 (1)	0,9219	0,9218	0,9219	
H1F2 (2)	0,9396	0,9396	0,9396	0,927 ± 0,012
H1F2 (3)	0,9203	0,92	0,92	
H2F2 (1)	0,9032	0,9028	0,9029	0,907 ± 0,015
H2F2 (2)	0,9075	0,9075	0,9077	
H2F2 (3)	0,9096	0,9095	0,9095	
H1F1 (1)	0,8963	0,8958	0,8955	0,888 ± 0,095
H1F1 (2)	0,871	0,8705	0,8701	
H1F1 (3)	0,897	0,898	0,8979	
H2F1 (1)	0,9044	0,9045	0,9047	0,900 ± 0,004
H2F1 (2)	0,8943	0,8939	0,8938	
H1F1 (3)	0,901	0,9012	0,9013	
D3F2 (1)	1,0862	1,0891	1,0914	1,090 ± 0,0004
D3F2 (2)	1,0893	1,0892	1,0891	
D3F2 (3)	1,0882	1,0882	1,0882	
D4F2 (1)	1,0743	1,0741	1,0737	1,073 ± 0,02
D4F2 (2)	1,0949	1,0954	1,0953	
D4F2 (3)	1,0501	1,05	1,0499	
D3F1 (1)	1,13	1,13	1,13	1,12 ± 0,02
D3F1 (2)	1,1256	1,1256	1,1259	
D3F1 (3)	1,1282	1,1282	1,1282	
D4F2 (1)	1,146	1,146	1,1462	1,150 ± 0,004
D4F2 (2)	1,1496	1,1496	1,1497	
D4F2 (3)	1,1546	1,1547	1,1548	

Elaborado por: Las autoras, 2018.

Anexo 5. Porcentaje de sólidos totales de los extractos de *Calendula officinalis*.

Extractos	Cápsula (g)	C+M (g)	P1 (g)	Sólidos totales (%)
H1F2 (1)	21,4404	23,2509	21,4813	
H1F2 (2)	21,3198	23,2814	21,36	20,02 ± 0,024
H1F2 (3)	21,6528	23,3987	21,6887	
H2F2 (1)	23,106	24,841	23,1402	
H2F2 (2)	23,7203	25,4742	23,7524	1,72 ± 0,13
H2F2(3)	24,0355	25,8501	24,0721	
H1F1 (1)	23,4312	25,1595	23,5068	
H1F1 (2)	24,1012	26,1595	24,1041	2,35 ± 1,42
H1F1 (3)	23,8471	25,566	23,9098	
H2F1 (1)	23,9455	25,6259	24,0043	
H2F1 (2)	14,0816	15,8113	14,1173	2,17 ± 0,397
H1F1 (3)	14,3053	15,6417	14,3408	
D3F2 (1)	13,13	15,2195	13,189	
D3F2 (2)	13,9055	16,038	13,909	2,26 ± 1,385
D3F2 (3)	13,1252	15,7081	13,198	
D4F2 (1)	13,5054	15,6301	13,508	
D4F2 (2)	14,304	16,5814	14,3578	1,7 ± 0,99
D4F2 (3)	14,7815	16,8421	14,827	
D3F1 (1)	14,9936	17,1483	15,01	
D3F1 (2)	12,3128	14,456	12,346	2,21 ± 1,93
D3F1 (3)	13,6077	15,6615	13,6904	
D4F2 (1)	14,4978	16,653	14,5035	
D4F2 (2)	15,2541	17,4316	15,3	1,28 ± 1,018
D4F2 (3)	13,0228	15,1666	13,0478	

Elaborado por: Las autoras, 2018.

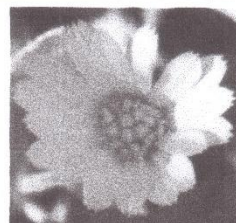
Anexo 6. Ficha técnica extracto comercial

 LABORATORIOS PHITOTHER E.U.	FICHA TECNICA	FT-090
	CALENDULA <i>Calendula officinalis L.</i>	v. 00

NOMBRE INCI: Calendula officinalis Flower Extract

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Planta herbácea, vivaz, de 0.50 a 0.80 m. de altura, con el tallo y las ramas raras veces bien erguidos. Tiene hojas enteras o con algunos dientes inconspicuos y callosos; las inferiores atenuadas para formar a modo de un raballo. Flores radiadas desde blanco-amarillentas hasta amarillo-anaranjado, femeninas, fértiles; cáliz y corola 4 mm. de largo, lígulas enteras o dentadas, amarillas, 1.5 cm. De largo, 3 mm. De ancho; las flores centrales hermafroditas, corola tubular con 5 lóbulos, antenas obtusas en la base, brácteas de estilo largas, subtruncadas.



COMPOSICIÓN: Aceite esencial (0,1-0,4%): gamma-terpineno, mu-uroleno, cadineno, cariofileno, mentona, isomentona, carvona, geranilacetona, cariofilenocetona, sesquiterpenos (epicubebol, aloaromadendrol). Flavonoides: rutósido, neosesperidósido. Saponósidos (2-5%). Alcoholes triterpénicos (aminirina, taraxasterol, amidiol, faradiol. Esteroles, carotenoides, pigmentos xantofílicos; ácidos fenólicarboxílicos; principio amargo (calendina); taninos polisacáridos (galactanas).

PARTE USADA: Las Flores

ESPECIFICACIONES DE CALIDAD

PRUEBA	PHITOX- WOH
Organoléptico	
Aspecto	Líquido fluido
Color	Café-amarillento o café-rojizo
Olor	Característico
Sabor	Ligeramente amargo
Físicoquímico	
Densidad (g/ml)	0.9100 g/ml – 0.9550 g/ml
Índice de refracción	1.3500 – 1.3750
pH	5.0 – 7.5
Solubilidad	Muy soluble o soluble en agua, etanol 96% y soluciones ácida y alcalina diluidas. Insoluble en Cloroformo
Sólidos Totales (%)	1.0% - 6.0%
Concentración	1/1
Microbiológico	Aerobios ≤100 UFC/ml; Hongos y Levaduras ≤10 UFC/ml y Ausencia de Coliformes totales y patógenos

ACCIÓN: Se afirma que la caléndula tiene propiedades antiespasmódica, ligeramente diaforética, antiinflamatoria, antihemorrágica, emenagoga, vulneraria, estípica y antiséptica.

INDICACIONES: Se ha usado tradicionalmente para tratar úlcera gástrica y duodenal, amenorrea, dismenorrea y epistaxis, úlcera crural, venas varicosas, hemorroides, eccema anal, proctitis, linfoadema, inflamación de lesiones cutáneas (administración tópica) y conjuntivitis (en forma de colirio). La comisión E aprobó su ingestión y su uso externo para el tratamiento de la inflamación de la mucosa bucofaringea, y su uso externo para el tratamiento de úlceras con mala cicatrización.

CONTRAINDICACIONES: Embarazo. No se recomienda el empleo oral de caléndula durante la lactancia hasta que existan datos suficientes que certifiquen su inocuidad.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: Ambientes frescos y secos, de temperatura máxima 25°C, humedad relativa máxima de 75% y protegida de la luz directa

PRESENTACIONES: Frasco de vidrio o plástico por 1kg y garrafa plástica por 5, 10, 20 kg

DOSIS: Extracto fluido (1:1): 20 a 30 gotas, tres veces al día.

Elaboró y Revisó: BIOLOGA (Erika Gutiérrez)	Aprobó: DIRECTOR TECNICO (Luz Helena Núñez)	Fecha 2006 / 10 / 06
------------------------------------------------	------------------------------------------------	-------------------------

Elaborado por: Casa de los Químicos, 2018.

Anexo 7. Ficha técnica del extracto de Caléndula estandarizado.

Nombre Botánico	<i>Calendula officinalis L.</i>		
Descripción	Extracto fluido de caléndula, hidroalcohólico con flores secas. Los capítulos florales son los que contienen principios activos como (alfa-bisabolol), flavonoides derivados del quercetol y del isoramnetol, carotenoides muy abundantes, mucílagos, taninos, principios amargos, y saponinas triterpénicas.		
Técnica	Percolación (solvente etanol/agua 90:10, tiempo 24 horas)		
Características organolépticas	Especificación		
Apariencia	Líquido fluido		
Color	Amarillo verdoso		
Olor	Intensamente modificada o hierbas con solvente etanol.		
Propiedades físicas	Mínimo	Máximo	Cumple
Densidad	0,89 g/cm ³	0,93g/cm ³	*
Índice de refracción	1,36	1,38	*
pH	5,69	5,99	*
Sólidos totales	1,7%	2,4%	*
Solubilidad	Soluble en agua, soluciones acidas y alcalinas		
Microbiológico	UFC/mL	UFC/mL limite *	Cumple
Aerobios totales	< 10 UFC/g	100	*
Coliformes totales	< 10 UFC/g	100	*
Mohos y levadura	< 10 UFC/g	100	*
Fenoles totales	Mínimo	Máximo	Cumple
mg de ácido gálico/ml de extracto	4,6	5,9	*
Almacenamiento	Refrigeración. Proteger de la luz.		
Presentación	Frasco de vidrio ámbar 100 mL.		

Elaborado: Amaguaña Rojas Fernanda Jocelyn, Churuchumbi Rojas Erika Fernanda, 20 de Mayo

2018.