

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA CONSERVANTE DEL ACEITE
ESENCIAL Y EXTRACTO DE ISHPINGO (*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm) EN
CREMAS COSMÉTICAS.**

AUTORA:

ANA MARÍA RAMOS ROBALINO

DOCENTE TUTORA:

TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, julio del 2018

Carta de cesión de derechos de autora

Yo, Ana María Ramos Robalino, con documento de identificación N° 171498214-5, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la eficacia conservante del aceite esencial y extracto de Ishpingo (*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm) en cremas cosméticas”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera 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 mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Ana María Ramos Robalino

C.I.: 171498214-5

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la eficacia conservante de aceite esencial y extracto de Ishpingo (*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm) en cremas cosméticas” realizado por Ana María Ramos Robalino, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, julio del 2018



Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta

C.I.: 171166801-0

Dedicatoria

Este trabajo de titulación lo dedico con cariño principalmente a mis padres Ángel y Ligia por su paciencia, sacrificio y esfuerzo, para brindarme la educación y por creer en mí, a pesar de los tropiezos que se han presentado.

A mis hermanos Santiago, Carlos y Tatiana a quien también considero como mi hermana.

Les dedico un esfuerzo más de vida, hecho con amor, sacrificio y alegría.

Ana Ramos

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de terminar mis estudios, por guiarme en cada paso de mi vida.

A mis padres y hermanos por brindarme su apoyo incondicional y compartir conmigo este nuevo logro en mi vida.

A mi tutora, Tatiana Mosquera por darme la oportunidad de ser su colaboradora, por su paciencia, compartirme sus conocimientos y guiarme durante el proceso del proyecto.

A Andrés, por ayudarme en cada momento y no dejarme vencer.

Les agradezco a todos.

Ana Ramos

Índice

Introducción	1
Capítulo I.....	7
1. Marco Teórico.....	7
1.1 Cosmética Natural	7
1.1.1 Ingredientes para cosmética natural.....	8
1.2 Extractos naturales	9
1.2.1 Aceite natural de <i>Ocotea quixos</i>	10
1.2.2 Extracto natural de <i>Ocotea quixos</i>	11
1.3 Formulación cosmética.....	12
1.3.1 Formas cosméticas	12
1.3.2 Emulsiones.....	12
1.3.3 Seguridad cosmética	13
Capítulo II	15
2. Marco Metodológico.....	15
2.1. Diseño experimental.....	15
2.2 Formulación cosmética.....	16
2.2.1 Fórmula de las cremas cosméticas.....	16
2.2.2 Estabilidad preliminar.....	18
2.2.3 Prueba de preferencia.....	19
2.3 Challenge test	21
Capítulo III.....	31
3. Resultados y Discusión	31
3.1 Diseño experimental.....	31
3.2 Formulación cosmética.....	32

3.2.1 Fórmula de las cremas cosméticas.....	32
3.2.2 Estabilidad preliminar.....	34
3.2.3 Prueba de preferencia.....	35
3.3 Challenge test	39
Capítulo IV.....	51
4. Conclusiones y Recomendaciones	51
4.1 Conclusiones	51
4.2 Recomendaciones	52
Referencias.....	53
Anexos	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Cremas sometidas a pruebas de estabilidad	18
Tabla 2. Diseño de cuadrado latino	20
Tabla 3. Escala de 9 puntos para valoración de preferencia hedónica	21
Tabla 4. Activación de cepas ATCC (colonia madre)	24
Tabla 5. Preparación para método Overnight.....	25
Tabla 6. Comprobación de eficacia conservante.....	27
Tabla 7. Tiempos especificados por la Norma ISO 11930:2012 para evaluar eficacia conservante.....	27
Tabla 8. Criterio de evaluación para el ensayo de la eficacia conservante	30
Tabla 9. Formulación de cremas a evaluar.....	31
Tabla 10. Formulación de cremas con conservante sintético Phenova. Tratamiento 5.....	32
Tabla 11. Formulación de cremas con extractos de <i>Ocotea quixos</i> (Tratamiento T1, T2, T3).....	33
Tabla 12. Resultados de estabilidad preliminar	34
Tabla 13. Lectura en espectrofotómetro de los microorganismos de las cepas ATCC para el método Overnight.....	40
Tabla 14. Cálculo de UFC/mL de microorganismos ATCC inicial a partir de la lectura de espectrofotometría	41
Tabla 15. Promedio de conteo microbiano en caja Petri. Tratamiento 1 (T1)	42
Tabla 16. Promedio de conteo microbiano en caja Petri. Tratamiento 2 (T2)	43
Tabla 17. Promedio de conteo microbiano en caja Petri. Tratamiento 3 (T3)	43
Tabla 18. Promedio de conteo microbiano en caja Petri. Tratamiento 4 (T4)	44
Tabla 19. Promedio de conteo microbiano en caja Petri. Tratamiento 5 (T5)	44

Tabla 20. Reducción lagarítmica de T1	46
Tabla 21. Reducción lagarítmica de T2	47
Tabla 22. Reducción lagarítmica de T3	47
Tabla 23. Reducción lagarítmica de T4	48
Tabla 24. Reducción lagarítmica de T5	49

Índice de Figuras

Figura 1. Resultados de las pruebas de Duncan y Análisis de varianza. Primera etapa (aroma al abrir el envase).	36
Figura 2. Resultados de las pruebas de Duncan y Análisis de varianza. Segunda etapa (aroma al instante de ponerse en la piel).	37
Figure 3. Resultados de las pruebas de Duncan y Análisis de varianza. Tercera etapa (aroma a los 5 minutos de aplicación en la piel).	38
Figura 4. Interpolación: UFC/mL vs ABSORBANCIA para bacterias.	40
Figura 5. Interpolación: upml/mL vs ABSORBANCIA para hongos y levaduras... ..	41
Figure 6. Resultados de comparación estadística de los Tratamientos 2, 3 y 5.	50

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación de los microorganismo en cada tiempo de muestreo..... 28

Ecuación 2. Reducción en los recuentos de microorganismos 28

Índice de anexos

Anexo 1 Ficha técnica del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i>	61
Anexo 2 Certificado de análisis de extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> realizado por Flor y Parra en el trabajo de tesis: “Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de Ishpink, <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm	62
Anexo 3 Hoja de evaluación sensorial.....	63
Anexo 4 Envase de crema (20 g).....	64
Anexo 5 Prueba de estabilidad para las diferentes concentraciones.....	65
Anexo 6 Temperatura de incubación de <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404.....	66
Anexo 7 Temperatura de incubación de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9037, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	67
Anexo 8 Cultivo de cepa ATCC 6538, <i>Staphylococcus aureus</i> en medio TSA.....	68
Anexo 9 Cultivo de cepa ATCC 9037, <i>Pseudomona aeruginosa</i> en medio TSA.....	69
Anexo 10 Cultivo de cepa ATCC 8739, <i>Escherichia coli</i> en medio TSA.....	70
Anexo 11 Cultivo de cepa ATCC 10231, <i>Candida albicans</i> en medio SDA.....	71
Anexo 12 Cultivo de cepa ATCC 16404, <i>Aspergillus brasiliensis</i> en medio SDA...	72
Anexo 13 Caja Petri separada en cuadrantes para conteo microbiano (T2)	73

Resumen

La cosmética natural ha hecho que el hombre busque nuevos ingredientes para la elaboración de cremas cosméticas y que mantengan las características de olor y aspectos de las cremas. Además, la Comunidad Andina de Naciones determinó que las empresas cosméticas retiren los parabenos de su formulación y busquen nuevas sustancias que cumplan con el mismo efecto conservante; es así que, el objetivo de esta investigación es realizar cremas utilizando aceite esencial (0.4 %) y extracto fluido hidroalcohólico (7.5 %, 10 % y 15 %) de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm como sustitutos de los parabenos. Para evaluar la capacidad conservante de los extractos naturales utilizados en las cremas cosméticas, se utilizó el método de Challenge Test que utiliza cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y se evaluó la actividad conservante en cuatro tiempos (0, 7, 14 y 28 días) y los resultados del conteo microbiano se expresó en logaritmos. Utilizando métodos estadísticos, se determinó que las cremas de extracto fluido hidroalcohólico - aceite esencial (10 % - 0.4 % y 15 % - 0.4 %) y la crema con sólo aceite esencial (0.4 %) como conservante no presentan diferencia significativa frente al control positivo, crema con phenova (0.8 %). Por lo tanto, la mezcla de extracto fluido hidroalcohólico - aceite esencial o sólo el aceite esencial podrían ser sustitutos de los conservantes sintéticos.

Palabras clave: *Ocotea quixos*, extractos naturales, challenge test, parabenos.

Abstract

The natural cosmetic has done that the man looks for new ingredients for the production of cosmetic lotions and support the characteristics of smell and aspects of the lotions. In addition, the Comunidad Andina de Naciones determined that the cosmetic companies remove parabens from his formulation and look for new natural substances that fulfill with the same preserving effect; it is so, the aim of this investigation is to make lotions using essential oil (0.4 %) and hydroalcoholic fluid extract (7.5 %, 10 % and 15 %) of *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm like substitutes of the parabens. To assess the preservative capacity of the natural extracts used in the cosmetic lotions, it was used the Challenge Test's method that uses strains of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillius brasiliensis* ATCC 16404 and it was evaluated in four times (0, 7, 14 and 28 days) and the results of the microbial count were expressed in logarithms. Using statistical methods, it was determined that the lotions with hydroalcoholic fluid extract – essential oil (10 % - 0.4 % and 15 % - 0.4 %) and the lotion with only essential oil (0.4 %) as preservative, do not present significant difference in front of the positive control that was the lotion with phenova (0.8 %). Therefore, the mixture of hydroalcoholic fluid extract - essential oil or only the essential could be substitutes of the preservative synthetic ones.

Key words: *Ocotea quixos*, natural extracts, challenge test, parabens.

Introducción

A nivel mundial las personas por necesidad están atadas a mantener una imagen de aseo y estética, las cuales durante mucho tiempo han sido indicativos que permiten a una persona ser aceptada o no, y ha hecho que las personas utilicen cosméticos para mejorar la presentación física (Nuñez, Navarro, & Cebrián, 2012, pp. 13-16). El uso de cosméticos ha hecho que el mercado busque satisfacer esta demanda y dentro de éste, encontramos al mercado cosmético con tendencia hacia lo natural.

La tendencia hacia la cosmética natural ha hecho que las compañías cosméticas hagan uso de ingredientes orgánicos y/o naturales en sus formulaciones.

Los ingredientes orgánicos son componentes libres de tóxicos como: hormonas, antibióticos, pesticidas, plaguicidas, etc., mientras que los ingredientes naturales son: “aquellos que han sido elaborados solamente con ingredientes como plantas, minerales y frutas” (elhuerto, 2015).

Nava & Lambros (2011) mencionan que en el año de 1960 se da a conocer el auge de lo natural inspirado en un movimiento hippie que consistía en que las personas consuman o utilicen productos naturales, así como los productos marcados como “natural” que en su mayoría poseen ingredientes naturales, lo que hace relevante el uso de metabolitos existentes en la naturaleza, sean estos derivados de animales, plantas y/o microorganismos, como bacterias, hongos, entre otros ingredientes naturales, para lograr el objetivo de tener cosméticos naturales.

También ha generado que se haga investigación sobre recursos naturales que sean promisorios para su uso en cosmética, haciendo que la cosmética natural tenga la necesidad de implementar y utilizar materias primas naturales que sustituyan a los artificiales, para lo cual, empresas productoras de cosméticos buscan satisfacer estas

nuevas tendencias y necesidades de productos, haciendo que éste sea a base de compuestos más amigables con la piel de las personas y también sea amigable con el medio ambiente. Nadinic, Martino, Bandoni, & Ferraro (2015) señalan que desde la antigüedad se ha utilizado la cosmética natural, siendo esta la base para la cosmética que se conoce hoy en día, mencionando como ejemplo a los egipcios, romanos y babilonios quienes utilizaban extractos naturales y aceites esenciales, así como también jugo de semillas, jugo de plantas y arcillas como recursos para la elaboración de productos cosméticos. Nadinic *et al.* (2015) mencionan como ejemplo a Cleopatra, una exponente de la belleza egipcia que utilizaba aceites, esencias y extractos naturales para embellecer su piel.

Pérez (2016) hace referencia que desde tiempos antiguos la cosmética natural ha tomado importancia en su uso, poniendo como modelo el uso de materiales utilizados por nuestros ancestros como, por ejemplo: la cera de abeja a la que se le otorga capacidad antioxidante, emoliente, espesante, cicatrizante, también ayuda a retener la humedad de la piel, y es un antibacterial natural, ingrediente indispensable en la preparación de bálsamos, lociones, pomadas.

De los ingredientes generalmente cuestionados en las formulaciones están los conservantes y dentro de este grupo de forma especial los parabenos, que de acuerdo con Canosa (2009, p. 21) define a los parabenos como: “ésteres del ácido 4-hidroxibenzóico” compuestos químicos con propiedad antibacterial o antifúngica que le confiere a la fórmula estabilidad protegiéndola contra contaminación microbiana, es decir estos ingredientes tienen función conservante en el producto. Canosa (2009, p. 22) indica que los parabenos son empleados como estabilizantes y poseen actividad conservante en cosmética, los más empleados son: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y bencilparabeno.

El uso de los parabenos en las industrias es tan extenso y necesario como antimicrobiano que éstas se niegan a retirarlas o cambiarlas por otras opciones que se encuentran en el mercado. Así lo corrobora Scott (2011) quien indica que en Food and Drug Administration (FDA) existe un listado con los productos tóxicos para el ser humano, entre los cuales se encuentran los parabenos.

Al hablar de parabenos debemos enfatizar que son productos artificiales derivados del petróleo y que su aplicación es de carácter conservante, y como resultado a su gran impacto de eficiencia como conservante, lo convierte en un componente de difícil sustitución por ingredientes de origen natural, sin embargo desde hace tiempo atrás la cosmética natural ha ahondado en dar soluciones concretas que brinden el campo necesario a los conservantes naturales que poseen la misma capacidad de acción conservante que los parabenos, por lo tanto es viable el sustituir los parabenos de las formulaciones cosméticas y dar cabida y uso a componentes de origen natural que no generan efectos adversos en la piel como sí lo generan los parabenos.

La Comunidad Andina de Naciones (CAN, 2017) en su Resolución 1905 emite que está prohibido el uso de parabenos de cadena larga en las industrias cosméticas y farmacéuticas y, determina que a partir de febrero de 2018 los productos que contengan parabenos tienen que realizar cambios en sus formulaciones, haciendo que dichas industrias busquen alternativas que tengan el mismo efecto que los parabenos y que a la vez puedan ser alternativas que tengan un mismo efecto que los parabenos y que no sean un riesgo para el consumidor de dicho producto; por lo que, las empresas están en la obligación de buscar compuestos alternos a los parabenos sin perder la seguridad de la fórmula y mantenga las características propias del producto original, es decir, que permanezca con el mismo efecto, aroma, color, etc. que son cualidades que atraen al consumidor.

Esta necesidad de encontrar nuevos productos naturales que tengan los mismos beneficios que los parabenos, hace que se analice nuevas fuentes naturales que actúen como antimicrobianos y/o antifúngicos, además que puedan brindar al producto aroma, aspecto y/o color que sean llamativos para el consumidor por eso, dentro de la categoría natural, los aceites esenciales y los extractos podrían representar una alternativa.

Por lo expuesto anteriormente se hace énfasis en el uso de derivados de plantas como ingredientes en la fabricación de cosméticos naturales en reemplazo de compuestos químicos, con el uso especialmente de extractos y aceites esenciales de plantas que no son perjudiciales para la salud.

De acuerdo con estudios realizados existen evaluaciones sobre aceites esenciales y extractos naturales que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico, por lo que pueden ser excelentes candidatos para sustituir a los parabenos, tal es el caso de estudios sobre *Ocotea quixos*, cuyo nombre común es “Ishpingo” en el que Noriega & Decarro (2008, pp. 3-8) comprueban que el aceite foliar de *Ocotea quixos* inhibe el crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Candida albicans* y *Streptococcus piogenes*. Además, este aceite esencial ha sido utilizado en formulaciones cosméticas como lo hizo Espadero (2017), quien señala mediante evaluación sensorial que al comparar cremas con 0.4 %, 0.6 % y 0.8 % de aceite esencial de *Ocotea quixos*, existe diferencia en la percepción de las tres fórmulas, siendo la de 0.4 % la de mayor aceptación por el consumidor.

Así mismo, Álvarez & Peña (2017) señalan que el aceite esencial de *Ocotea quixos* mezclado con aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) poseen eficacia cosmética para formulaciones anti-edad, demostrando que la combinación de aceites esenciales en formulaciones cosméticas influye en su estabilidad.

El estudio realizado por F. López & Tituaña (2017) con: cremas de Matico, cremas de Ishpingo, cremas de Matico - Ishpingo proporción (80 % - 20 %) y cremas de Matico - Ishpingo proporción (20 % - 80 %) dispensadas en envases de: vidrio y plástico, fueron evaluadas en condiciones ambientales y condiciones controladas durante tres meses, determinó: las cremas analizadas bajo condiciones ambientales presentaron mejor estabilidad que las de condiciones controladas. Además, en base al análisis de ANOVA-Duncan con un 95 % de confiabilidad determinó: la viscosidad aumenta en condición ambiental, mientras que en condiciones controladas la viscosidad disminuye; en características de olor, color y aspecto, se mantiene a lo largo del tiempo en condiciones ambientales; el pH se mantuvo estable (4.5 a 5.9) en todas las formulaciones; en estabilidad microbiológica, de acuerdo a los valores indicados en la metodología utilizada por los autores, Bacterias Aerobios Totales: <100 UFC/mL; Mohos y levaduras: <10 UFC/mL; Coliformes Totales: <1 UFC/mL y *E. coli*: ausencia, indica que las formulaciones no presentan crecimiento microbiano o se encuentra bajo los valores mínimos; la concentración de fenoles, determinó que la fórmula de Matico - Ishpingo en proporción (80 % - 20 %) presenta el menor porcentaje de degradación de fenoles (67.57 %) al tener como concentración inicial 3.98 mg/mL y concentración final 1.28 mg/mL.

De igual forma Flor & Parra (2017) enfocaron su investigación en obtener un extracto fluido de *Ocotea quixos* fitoquímicamente estandarizado, tomando como referencia la concentración de fenoles totales, el estudio combina las siguientes variables: material vegetal de *Ocotea quixos* (hojas frescas y secas), disolvente (etanol de caña y etanol potable) y concentración de disolvente (50 %, 70 % y 90 %); la evaluación de fenoles se realizó mediante el método de Folin – Ciocalteu, luego de realizada la investigación se determinó que el extracto con mayor concentración de fenoles, representado por mg de

ácido gálico / mL de extracto fluido fue el tratamiento de hojas frescas de *Ocotea quixos* con 90 % v/v de disolvente de etanol de caña utilizando como método de extracción el percolado de 48 horas; el valor de los fenoles es de 13.289 mg de ácido gálico / mL de extracto (cuantificación de fenoles totales expresados en mg de ácido gálico).

Estos estudios previos demuestran que tanto el aceite esencial y el extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* representan un potencial componente dentro de cualquier formulación, en la que puede brindar actividad antioxidante y actividad antimicrobiana; con este precedente se puede considerar el uso de estos dos ingredientes en fórmulas cosméticas en las que podrían reemplazarse a los conservantes habituales como los parabenos por conservantes naturales como el aceite esencial y el extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*.

El objetivo principal de esta investigación es el de evaluar la eficacia conservante del extracto fluido hidroalcohólico y aceite esencial de *Ocotea quixos* en cremas cosméticas, para lo cual se elaboró cremas a base del aceite esencial (0.4 %) y las concentraciones del extracto fluido hidroalcohólico (7.5 %, 10 % y 15 %) sometiéndolas a la “Prueba de desafío” o Challenge Test tomando como referencia lo descrito en la Norma ISO 11930:2012.

La investigación plantea como hipótesis la acción antimicrobiana del extracto vegetal, identificando que, si cualquiera de las diferentes combinaciones de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* con aceite esencial de *Ocotea quixos* logra pasar la prueba de desafío, quedará confirmada la capacidad conservante de la combinación.

Capítulo I

1. Marco Teórico

1.1 Cosmética Natural

Según Carrasco (2005, p. 19), indica que un producto cosmético se lo define como un preparado que al tener contacto directo con el cuerpo humano tiene como objetivo el de modificar, perfumar, proteger el mismo.

De acuerdo con la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT, 2018) indica que el cosmético puede ser natural, sintético o una combinación de ambos para ser empleados por las personas, con el único fin de obtener un cambio de la apariencia, protección, higiene o perfume en el cuerpo; y resalta que los cosméticos no tienen acción terapéutica.

La cosmética natural abarca el uso de derivados vegetales, minerales y animales, para la elaboración de sus productos, entre los cuales se destacan: aceites esenciales, extractos, aromas, entre otros que posean la misma acción que los ingredientes utilizados para elaborar cosmética convencional o de síntesis química (Badía & García, 2014, p. 61).

De acuerdo con COSMetic Organic Standar (COSMOS-standar AISBL, 2013) para que un cosmético sea certificado como “natural”, el 95 % del total de ingredientes deben ser ingredientes orgánicos, y además mostrar en el envase los materiales utilizados en la elaboración, mediante un listado con su denominación International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI).

De acuerdo con Nuñez *et al.* (2012, p. 104) existe anualmente una elevación del 20 al 25 % en la industria de cosmética natural y muestra un déficit del 5 % para la convencional, representando en Europa más de dos millones de euros y en Alemania representa el 10 % total de la industria cosmética.

Ciertos autores como Badía & García (2014, p. 61) consideran que está en auge la cosmética natural, ya que esta presenta ventajas como: poseer bajos porcentajes de ingredientes químicos, no ser testeados en animales y no contener conservantes químicos de origen sintético como los parabenos que son los que producen dermatitis en la piel.

1.1.1 Ingredientes para cosmética natural

Todo producto cosmético debe tener la información de los ingredientes por los que está compuesto, ya que es muy importante para el usuario, debido a que hay personas que presenta alergias a ciertos componentes como por ejemplo: ingredientes que provocan los diferentes tipos de dermatitis en donde se presenta irritación y enrojecimiento de la piel por tener contacto con alguna sustancia irritantes para la piel (Ayela, s. f., pp. 75-80).

Los ingredientes utilizados en la elaboración de los cosméticos poseen nombres específicos lo que permite su identificación a nivel mundial; a este nombre se lo conoce como Nombre Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI por sus siglas en inglés), el cual es el nombre mundial del compuesto (AEMPS, 2006).

En la cosmética natural se utilizan derivados de: plantas, animales y suelos, de los cuales se utilizan como: antioxidantes, antimicrobianos o aditivos. Dentro de la página del Grupo ECOCERT (<http://www.ecocert.com>) se puede encontrar un listado de las materias primas permitidas para elaborar cosméticos naturales, como: aceites de: semillas, de flores, de hojas, de raíz, agua de flores, extractos de hojas, de flores, de cortezas, glicerina, etanol/alcohol, ácido cítrico, manteca de cacao, manteca de karité, cera de abeja, maltodextrina, laurato de sacarosa, sales, entre otras.

1.2 Extractos naturales

Hay que considerar que los extractos naturales provienen de las plantas son mezclas de metabolitos secundarios, al igual que los aceites esenciales. Los extractos hidroalcohólicos según REDSA (2017): “son líquidos concentrados que se consiguen en el proceso de extracción de la planta entera o de porciones específicas de la planta como puede ser hojas, flores, raíces, etc., con la ayuda de un solvente más agua”, en donde se extraen compuestos químicos más polares, ejemplo: azúcares, saponinas, ciertos tipos de flavonoides, entre otros.

Las plantas dan origen a productos naturales biológicamente activos, que se denominan metabolitos secundarios y para la planta no son fundamentales en su desarrollo diario pero, para el ser humano representa una fuente de ingredientes que por procesos extractivos se convierten en materia prima para la elaboración de diferentes productos (N. López, 2011). Así como lo describe da Costa, Barbosa, & Ozório (2016, pp. 1-11), los aceites esenciales son metabolitos secundarios secretados por las plantas, las mismas que lo utilizan como: mecanismo de protección y como medio para atraer a los animales que cumplen la función de polinizar. También estos autores indican que el uso de los aceites esenciales en la sociedad ha sido de interés para ser estudiados en tratamientos de enfermedades como: tos, dolores y para uso: insecticida y como antimicrobiano por capacidad bactericida.

Estos extractos vegetales tienen alto grado de variabilidad dependiendo de múltiples factores como: condiciones ambientales de producción de la planta, condiciones del suelo, época de cosecha, etc., como lo menciona Usano-Aleman, Palá-Paúl, & Herráiz-Peñalver (2016, pp. 19-38), diciendo que el estado fenológico de la planta también influye en la obtención de los compuestos, así como la genética y los diferentes climas a los que está expuesta la planta, provocará una variación fitoquímica de la especie.

1.2.1 Aceite natural de *Ocotea quixos*

Ocotea quixos, de acuerdo con Ríos, Koziol, Borgtoft Pedersen, & Granda (2007, p. 438) pertenece a la familia de las Lauraceae, en el idioma Kichwa se la denomina “Ishpingu”; la especie se encuentra a una altura entre 200 a 700 m.s.n.m, crece en un bosque húmedo tropical.

Los árboles poseen hojas con base recurvada, con flores de un solo sexo con nueve estambre fértiles (Palacios, 2011, p. 915).

De la especie se puede utilizar: corteza, hojas, flores y fruto como condimentos, comestible y para tratamiento de la gripe en infusiones (Ríos *et al.*, 2007, p. 438)

(Noriega, 2016, pp. 181-188) indica que el aceite esencial de *Ocotea quixos* se puede extraer de varias partes del árbol y obtener varios compuestos químicos del mismo árbol y, además, resalta que su aroma es muy agradable y aromático.

Existen investigaciones sobre el extracto de *Ocotea quixos* de acuerdo con (Noriega & Dacarro, 2008, pp. 3-8) donde dicho aceite posee 62 compuestos: cariofileno (19.029 %), eremofileno (11.407 %) y humuleno (14.323 %), canfeno, terpenos y otros. Sin embargo, el compuesto llamado canfeno detectado en la composición química del aceite foliar de *Ocotea quixos* posee actividad antifúngica, bactericida y ha sido utilizado en enfermedades como: pie de atleta, eczemas y psoriasis (ladosis.org, 2017). Los terpenos como: alfa-pineno, β -pineno, terpineol, entre otros identificados en el estudio, se les atribuye la capacidad de ser altamente tóxicos para algunos insectos y parásitos de las plantas, por lo que se los utiliza como insecticida comercial (Taiz & Zeiger, 2006, pp. 539-540).

El aceite de *Ocotea quixos* tiene capacidad antimicrobiana y antifúngica, fundamentado en el estudio realizado por (Noriega & Dacarro, 2008, pp. 3-8) que evalúan la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) para cinco bacterias (*S. aureus*, *S. mutans*, *S. epidermis*, *S. piogenes* y *E. coli*) y una levadura (*C. albicans*) se realizó con soluciones de μL de aceite de *Ocotea quixos* /mL de agar Mueller Hinton con tween 20, dando como resultado una CMI para: *C. albicans* de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *E. coli* de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *S. epidermis* de 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *S. aureus* de 3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *S. piogenes* de 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y *S. mutans* de 0.097 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

1.2.2 Extracto natural de *Ocotea quixos*

Según estudio realizados por Cárdenas-Tello, Pozo-Rivera, Almirall, & Roque (2016, pp. 56-83) en el que hicieron estudio fitoquímico del extracto de *Ocotea quixos*, determinan que existen metabolitos secundarios como los flavonoides, los que de acuerdo con (fundacion-canna.es, s.f) indica que: “Los flavonoides tienen grandes actividades farmacológicas en modelos “*in vitro*” tales como: antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antibióticas, antidiarreicas y contra el cáncer”, por consiguiente, se puede realizar estudios de aplicación del extracto con fines cosméticos. Además Cárdenas, Pozo, Rojas, Roque, & Mihai (2016, pp. 465-474) indican que el extracto acuoso (30 % y 60 %), extracto alcohólico (30 %, 60 % y 90 %) y el extracto alcohólico de azúcar (30 %, 60 % y 90 %) de *Ocotea quixos* aplicada dos veces por semana en cultivo de rosas “Pink Emely” en la compañía “Chimbacalle Rose” en Pedro Moncayo, Tabacundo, Pichincha, Ecuador, tiene actividad antifúngica frente a *Sphaerotheca pannosa* que ataca a dichas rosas.

1.3 Formulación cosmética

1.3.1 Formas cosméticas

Según Vivancos (2017) indica que:

El término formas cosméticas hace referencia a la presentación final de un producto cosmético, es decir, forma de crema, gel, barra, polvo, etc. Esta forma viene determinada por las características de los excipientes y aditivos que contenga, pero no son estos los que le dan las propiedades al cosmético, si no el principio activo. Por tanto, la formulación cosmética se encarga de estudiar qué otras sustancias deben acompañar al principio activo (compuesto que hace posible que puedan realizar la función a la que están destinados) según la capa de la piel que quieran alcanzar, la textura que se necesite conseguir, el tipo de población objetivo, etc.

De acuerdo con Badía & García, (2014, p. 61) hacen referencia a: “las formas cosméticas más utilizadas son las emulsiones O/A, las emulsiones A/O, las lociones, las espumas, los geles y las cremas fluidas”; mientras que, según Sierra Acosta (2014, p. 134) indica que: “las principales formas cosméticas son: emulsiones, soluciones, polvos sueltos, polvos compactos, barras y lápices”.

1.3.2 Emulsiones

La formulación cosmética utilizada para el estudio es de tipo emulsión, la cual Martini, Chivot, & Peyrefitte (1997, p. 11) la define como: la diseminación de un fluido en otro fluido no miscible con el primero, formando 2 fases (oleosa y acuosa) y con acción de un tercer componente se puede dar la unión de las mismas.

Para que se forme una emulsión debe existir un trabajo, el cual ayuda a que uno de los fluidos tenga una subdivisión para formar pequeñas gotas, y así lograr un incremento de la superficie de contacto entre los dos fluidos (de Castro & Lozano, 2012, pp. 155-162).

Para formar una emulsión de Castro & Lozano (2012, pp. 155-162) indican que es necesario el uso de calor, agitación constante y emulgente/s, los cuales permiten que se disminuya la tensión superficial entre los fluidos inmiscibles y se eleve el equilibrio entre ambas para evitar la separación en fase acuosa y oleosa.

En el campo de la cosmética Mosquera, (2014) manifiesta que del 100 % de los productos cosméticos utilizados en el mercado las emulsiones representan al 60 % de este. Y según Badía & García, 2013, (p. 219) : “hoy en día, las más utilizadas son las emulsiones de fase externa acuosa (O/A), porque son más fáciles de aplicar y más satisfactorias al tacto”, y explican que los ingredientes utilizados crean una capa hidrofóbica que para el tacto es atractivo y no deja residuos de grasa.

1.3.3 Seguridad cosmética

De acuerdo con la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS, 2018), se debe tener normas para asegurar a los operadores al momento de fabricar los cosméticos y a los consumidores de que el producto cosmético es seguro de utilizar.

A la seguridad cosmética se la puede relacionar con la cosmetovigilancia que según la página web de AEMPS (2017), menciona lo siguiente: “la cosmetovigilancia es la actividad destinada a la recogida, evaluación y seguimiento de la información sobre los efectos no deseados observados como consecuencia del uso normal o razonablemente previsible de los productos cosméticos”.

Según la página web de ANMAT (s.f.) complementa a la definición dada por AEMPS sobre la cosmetovigilancia diciendo que: “todo ello con el objetivo de tomar las medidas pertinentes para garantizar la calidad, seguridad y eficacia”.

El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA, 2017) de Colombia, afirma que para tener seguridad sobre un producto que está en el mercado es necesario que tenga registro sanitario, porque asegura que fue hecho bajo estándares de calidad para obtener un producto final, e indica que se siguió las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en su elaboración y refleja en la eficacia y seguridad del producto.

De acuerdo con (AINIA, 2016): “garantizar la seguridad en los cosméticos depende entonces de los análisis de control microbiológicos previos”,

Capítulo II

2. Marco Metodológico

La parte experimental se llevó a cabo en Ecuador en la Provincia de Pichincha en la Ciudad de Quito en la Universidad Politécnica Salesiana, Campus Girón, en los Laboratorios de Ciencias de la vida.

2.1. Diseño experimental

En la reformulación de las cremas, sustituyendo a los conservantes sintéticos por ingredientes naturales con posible potencial acción bactericida y posible papel de conservante dentro de la formulación, se consideran los siguientes aspectos:

- Las fórmulas tienen como ingrediente natural activo, con papel antioxidante comprobado por estudios anteriores y con potencial acción conservante el aceite esencial de *Ocotea quixos* al (0.4 %).
- El ingrediente añadido que podría aumentar tanto la capacidad antioxidante como la conservadora es el extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*; las concentraciones consideradas para incorporar a la fórmula son: 7.5 % - 10 % - 15 % determinadas en función de la estabilidad preliminar de la fórmula y pruebas hedónicas de preferencia con el consumidor.

Se combina las siguientes variables:

Variable independiente: concentración de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*.

Variable dependiente: logaritmo del crecimiento bacteriano.

La combinación de los aspectos considerados en la formulación (extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* y aceite esencial de *Ocotea quixos*) generó cinco (5) tratamientos, cinco (5) microorganismos para cada tratamiento, hace un total de veinte y cinco muestras (25) las cuales se las analizó en cuatro (4) tiempos cada uno por triplicado.

2.2 Formulación cosmética

2.2.1 Fórmula de las cremas cosméticas

El método utilizado en la preparación de la crema fue el de inversión de fases o método indirecto, en el cual se calienta la fase oleosa por separado de la acuosa y con agitación constante se añade poco a poco la fase acuosa sobre la oleosa para obtener la emulsión que se desea (de Castro & Lozano, 2012, pp. 155-162).

- a. Tipo de emulsión: O/W o Ac/Ag (FÓRMULA BLANCO) fórmula utilizada en los estudios que preceden a esta investigación como son: (Álvarez & Peña, 2017; Espadero, 2017; Uguña, 2017; Vega, 2015)

Fase oleosa: 5.4 %.

- Emulgente: 20.5 %.
- Fase Acuosa c.s.p. 100 g: 73.3 %
- Phenova: 0.8 % (Mezcla de parabenos)

- b. Formulación: composición.

- Sustancia activa: aceite esencial de *Ocotea quixos* proveedor Fundación Chankuap. (Anexo 1) y extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* proveedor Laboratorio Ciencias de la Vida Girón- Quito (hojas frescas percoladas con 90:10 (v/v) de etanol de caña: agua) (Anexo 2).

- Emolientes: Paraffinum Liquidum, Theobroma Cacao (Cocoa) Seed Butter, Caprylic/Capric Triglyceride, Cyclopentasiloxano.
- Fase acuosa: agua destilada.
- Emulsificantes: Stearic Acid, Glyceryl Stearate, Cetyl Alcohol.
- Conservante: Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben.

El procedimiento para la elaboración de las emulsiones (cremas) es el siguiente:

- a) Esterilizar el material a utilizar y desinfectar el área de fabricación.
- b) Pesar los materiales en la balanza marca Ohaus, serie Scout Pro, con precisión de 0,1 g.
- c) Calentar la fase oleosa en una plancha de calentamiento marca Thermo a 70 °C en agitación constante.
- d) Retirar de la plancha y mantener en agitación constante con el Turbo emulsor Silverson LSM hasta lograr la fusión del componente oleoso con los emulgentes.
- e) Calentar la fase acuosa a la misma temperatura que la fase oleosa.
- f) Introducir la fase acuosa en la fase oleosa en el Turbo emulsor Silverson LSM por un tiempo de 15 minutos a una velocidad de 2500 rpm.
- g) Introducir los principios activos termolábiles (aceite esencial y extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*) en la mezcla a una temperatura igual a 40 °C y agitar por 10 minutos a una velocidad de 4000 rpm.
- h) Dispensar en los envases previamente esterilizados 20 g de crema de acuerdo con la formulación.

2.2.2 Estabilidad preliminar

La estabilidad preliminar de las cremas se fundamenta en los ensayos propuestos por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA, 2004) que permiten determinar la estabilidad de la fórmula en el momento del desarrollo.

Se somete a prueba de estabilidad las fórmulas con las siguientes concentraciones:

Tabla 1.

Cremas sometidas a prueba de estabilidad preliminar

Aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> (%)	Extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> (%)
0.4	5
0.4	7.5
0.4	10
0.4	15
0.4	20

Elaborado por: la autora, 2018.

Se realizó el siguiente procedimiento:

- a) Colocar 10 mL de la crema en tubos de ensayo con tapa rosca, en la centrifuga análoga con rotor fijo marca Gemmy centrifugar por 30 minutos a 3000 rpm. El análisis se hace por triplicado.
- b) Observar los tubos de ensayo si presentan separación de fases (acuosa y oleosa).

La separación de fases (acuosa y oleosa) en la crema, luego de ser sometida a centrifugación, puede ser indicativo de las siguientes situaciones: incompatibilidad física entre los ingredientes; el período de almacenamiento en condiciones normales (temperatura) podría provocar la separación; cambios bruscos de temperatura puede alterar la viscosidad inicial de la formulación; vibraciones constantes y prolongadas producen separación de fases (ANVISA, 2004).

Para las siguientes evaluaciones se utilizaron las cremas que en la prueba de estabilidad preliminar no presentaron separación de fases luego de someter a centrifugación.

2.2.3 Prueba de preferencia

Las formulaciones que no presentaron separación de fases (7.5 % - 10 % - 15 % de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*) se sometieron a pruebas de preferencia hedónicas. Las pruebas de preferencia son utilizadas con el fin de evaluar la aceptación del consumidor hacia un determinado producto, siendo evaluadas como agradables o no agradables (Lawless & Heymann, 2010)

De acuerdo con Carpenter, Lyon, & Hasdell (2000, p. 6) indica que el análisis sensorial es una herramienta esencial para la investigación de aceptación al momento de implementar un nuevo producto al mercado.

La evaluación utilizada se denomina evaluación monádica, de acuerdo con «Pruebas sensoriales. Investig de Mercados» (2008) indica que se evalúa un producto a la vez, dirigiendo la atención a un único producto. Según O`Shaughnessy (1991, p. 292) menciona que la prueba monádica es una prueba aislada a un producto nuevo, con un nivel bajo de comparación, discriminación y observación.

Para realizar las pruebas hedónicas se utiliza el diseño experimental de “Cuadrado Latino”, donde Cortés (2011) lo indica como un conjunto finito con **n** número de muestras, las cuales aparecen una sola vez en cada fila y en cada columna (cuadro **n x n**), asegurando de que cada panelista obtenga de forma no ordenada las muestras que va a testear. Para este diseño experimental se define a W, X y Y como las concentraciones de 7.5 %, 10 % y 15 % de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* respectivamente (Tabla 2);

además, cada muestra de crema se asignó un número aleatorio sin repetición en todo el bloque de muestras, dando un total de 51 muestras testeadas.

Tabla 2.

Diseño de cuadrado latino.

Panelistas	W	X	Y
1	W	X	Y
2	X	Y	W
3	Y	W	X

Elaborado por: la autora, 2018.

Este diseño de cuadrado latino se lo aplicó para las concentraciones especificadas de las cremas que fueron evaluadas por 17 evaluadores no entrenados, quienes evaluaron el atributo de “aroma” de las cremas categorizando la preferencia del producto con la ayuda de una escala de 9 puntos (Tabla 3). Además, para esta evaluación los panelistas calificaron en tres (3) etapas el aroma de las cremas: **Primera etapa:** aroma primario (al abrir el envase); **Segunda etapa:** aroma en la piel apenas de coloca la crema y **Tercera etapa:** aroma en la piel a los 5 minutos de haberse colocado la crema.

La calificación numérica obtenida de las muestras se procesa con análisis de varianza (ANOVA) y con prueba de Duncan con un $\alpha = 0.05$, para determinar si existen diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos de las muestras (Ramírez-Navas, 2012). (Figura 1-3).

Tabla 3.

Escala de 9 puntos para valoración de preferencia hedónica.

Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría
1	Me disgusta extremadamente	6	Me gusta levemente
2	Me disgusta mucho	7	Me gusta moderadamente
3	Me disgusta moderadamente	8	Me gusta mucho
4	Me disgusta levemente	9	Me gusta extremadamente
5	No me disgusta ni me gusta		

Elaborado por: la autora, 2018.

Para esta prueba la evaluación del atributo “aroma” se siguió el siguiente procedimiento:

- a) Entregar al panelista las tres muestras (W, X, Y) a evaluar claramente rotuladas, en el orden establecido por el diseño experimental y con una cantidad fija en cada envase (5 g) junto con la hoja de evaluación para registrar resultados.
- b) Realizar una lectura de las indicaciones establecidas en la hoja de evaluación en la que se indica forma de evaluar, tiempo y calificación.
- c) Limpiar la zona de aplicación con paños húmedos sin olor.
- d) Evaluar cada muestra en diferentes sitios de las muñecas y antebrazos, y registrar la calificación.

2.3 Challenge Test

El método de Challenge Test o “Prueba de desafío” se rige a la norma: Cosméticos. Microbiología. Ensayo de la protección antimicrobiana de un producto cosmético (ISO 11930:2012), que tiene como objetivo evaluar la eficacia de un conservante como antimicrobiano (ISO 11930, 2014).

(AINIA, 2016) menciona que: “el Challenge test se emplea para conocer la estabilidad microbiológica de una nueva o mejorada formulación cosmética, o para conocer la eficacia de un nuevo conservante, inhibidor del desarrollo de los microorganismos”.

Los microorganismos utilizados para esta prueba son cepas liofilizadas certificadas denominadas Cepas ATCC (American Type Culture Collection) de: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 mencionadas en dicha norma y utilizando la masa bacteriana mencionada en la norma; evalúa cambios de carga microbiana, en base al conteo de microorganismos vivos después de determinado tiempo y teniendo en consideración los criterios de aceptación que se plantea en la norma y determina si la fórmula cosmética satisface las necesidades cosméticas.

La colonia principal para el estudio se denomina colonia madre. La colonia es un cúmulo de microorganismos que procede de una sola célula de una especie específica (García-Rodríguez & Picazo, 1998, p. 14), siendo la colonia madre, la colonia sembrada directamente con las perlas que contienen las cepas ATCC de los diferentes microorganismos a evaluar.

Se llaman cepas liofilizadas, ya que la liofilización se utiliza para preservar cepas viables sin variación de ningún tipo (genética, morfológica) por muchos años, además se utilizan cepas que estén en fase de crecimiento, para evitar variabilidad (Universidad Nacional de Colombia, 2016).

Las cepas ATCC utilizadas estuvieron en Cryobank™, el cual es un sistema que permite almacenar y manipular fácilmente las perlas químicamente tratadas contenidas en viales

con medio de Trypton Soy Broth (TSB) con glicerol y sacarosa; se almacenan a una temperatura de -85 °C en congelación (Copan Diagnostics Inc., s.f).

La activación de cepas se basa en la resiembra de los microorganismos en medios de cultivo adecuados para cada uno, proporcionando los nutrientes necesarios para que los microorganismos reinicien su etapa de crecimiento con ayuda de la temperatura adecuado de incubación (Sanchis, Roqués, & de la Llana, 2006).

Se siguió el siguiente procedimiento para el Challenge test:

a) Activación de cepas liofilizadas ATCC

Cada cepa liofilizada de ATCC se cultiva en cajas Petri con los respectivos medios: agar de soya tríptica (TSA, siglas en inglés), agar dextrosa sabouraud (SDA, siglas en inglés), agar de papa y dextrosa (PDA, siglas en inglés) (Tabla 4).

Dichas cepas van a ser utilizados como colonia madre de las cuales parte el Challenge test.

Para reactivar las cepas ATCC, se procede al descongelamiento a temperatura ambiente de los viales con las perlas de las cepas ATCC.

Realizar una resiembra de las cepas ATCC en cajas Petri con medios de cultivo específicos para cada microorganismo.

Incubar las cajas Petri en la estufa marca Mermmet en los tiempos especificados, pasado este tiempo mantener en refrigeración hasta su uso.

Tabla 4.

Activación de cepas ATCC (colonia madre)

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación	Tipo de siembra
<i>E. coli</i> ATCC 8739	TSA	33 ± 2	24 a 48 h	Estriado
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA	33 ± 2	24 a 48 h	Estriado
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSA	33 ± 2	24 a 48 h	Estriado
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	SDA	33 ± 2	24 a 48 h	Estriado
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	PDA	23 ± 2	5 a 7 días	Espiral

Elaborado por: la autora, 2018.

b) Preparar los inóculos de cada cepa ATCC.

En base a la lectura de absorbancia del espectrofotómetro se calcula la cantidad de microorganismos que se inocularan en la muestra.

De acuerdo con Alastruey- Izquierdo, Melhem, Bonfietti, & Rodriguez-Tudela (2015, pp. 57-64), indican que el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antibióticos (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)) y el Instituto de Normas de Laboratorio Clínico (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)) han determinado al método de espectrofotometría como un método estandarizado para conteo de microorganismos y, Cermeño & Torres (1998, pp. 155-157) definen al método espectrofotométrico como: el método en donde el haz de luz que pasa a través de la suspensión de microorganismos se relaciona con la cantidad de microorganismos presentes en dicha suspensión. Además, de acuerdo con (Vega, 2015) se determina que: a la longitud de onda de 625 nm, absorbancia de 0.08 a 0.11 corresponde entre 1 - 2x10⁸ UFC/mL en bacterias y una longitud de onda de 530 nm, absorbancia 0.13 a 0.16 corresponde entre 1 - 5x10⁶ upml/mL para hongos y levaduras.

Para el crecimiento de las cepas en caldo se utilizó el cultivo Overnight en el que se ocupa medio líquido específico que favorece el crecimiento de los microorganismos.

El cultivo Overnight según Kragh *et al.* (2018) es utilizado poder obtener microorganismos en fase de crecimiento, el objetivo de utilizar el cultivo Overnight es garantizar la obtención de colonias jóvenes de los diferentes microorganismos a utilizar en la evaluación.

A las 18 horas de incubación en cultivo Overnight, con la ayuda de la centrifuga marca Gemmy por 20 minutos a 3000 rpm separar el pellet, descartar el sobrenadante y diluir con suero fisiológico estéril, medir en el espectrofotómetro con las longitudes de onda especificadas las absorbancias para cada microorganismo (Tabla 5).

Anotar los resultados y realizar una interpolación para conocer las UFC/mL de acuerdo con las mediciones obtenidas para bacterias y upml/mL (unidades propagadoras de mohos y levaduras/mL) para hongos y levaduras (Figuras 4 y 5).

Tabla 5.

Preparación para cultivo Overnight

Microorganismo	Caldo	Cantidad (UFC/mL)	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
<i>E. coli</i> ATCC 8739	TSB	1-2x10 ⁸	625	0.08 – 0.11
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	TSB	1-2x10 ⁸	625	0.08 – 0.11
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSB	1-2x10 ⁸	625	0.08 – 0.11
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	SDB	1-5x10 ⁶	530	0.13 – 0.16
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	Tween 80 (1 %)	1-5x10 ⁶	530	0.13 - 0.16

Elaborado por: la autora, 2018.

c) Inoculación de cepas ATCC en cremas cosméticas.

Inocular las cremas con 0.2 mL de cultivo ATCC de cada microorganismo especificadas en la tabla 5. Realizar el proceso por triplicado. El 0.2 mL es el equivalente al 1 % del peso total (20 g) de la crema, lo cual está estipulado en la norma ISO 11930:2012.

d) Homogenizar cada muestra con Vortex Mixer modelo XH-D por un (1) minuto.

e) Mantener las muestras a temperatura ambiente (°T: 20 °C – 24 °C) y protegidas de la luz directa por 28 días, tiempo de duración de Challenge Test conforme a la Norma ISO 11930:2012.

f) Comprobación de eficacia conservante Norma ISO 11930:2012.

La determinación de crecimiento microbiano en las cremas se realiza mediante dilución de las diferentes muestras en proporción 1:10 (1 mL de crema: 9 mL de suero fisiológico estéril), sembrando 1 mL de dicha dilución en medios y condiciones de incubación específicos para cada microorganismo.

La comprobación de la eficacia conservante de las cremas se realiza en cuatro (4) tiempos (0, 7, 14 y 28 días) que se especifican en la norma. Dichos tiempos son tomados a partir de la fecha de inoculación de las diferentes cepas en las muestras (Tabla 7), siempre bajo el mismo procedimiento.

Tabla 6.

Comprobación de eficacia conservante.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación
<i>E. coli</i> ATCC 8739	TSA	33 ± 2	24 h
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA	33 ± 2	24 h
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSA	33 ± 2	24 h
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	SDA	33 ± 2	24 h
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	PDA	23 ± 2	7 días

Elaborado por: la autora, 2018.

Tabla 7.

Tiempos especificados por la Norma ISO 11930:2012 para evaluar eficacia conservante.

Tiempos	Días
t ₀	0
t ₁	7
t ₂	14
t ₃	28

Elaborado por: la autora, 2018.

g) Recuento de microorganismo.

Realizar recuento de placa, observando las colonias formadas en las cajas Petri y anotando los resultados.

De acuerdo con lo establecido en la Norma ISO 11930:2012, para el recuento de microorganismos vivos se los debe interpretar en reducción logarítmica, por lo que se utiliza las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1.

Enumeración de los microorganismos en cada tiempo de muestreo

$$N_x = \frac{\bar{C}}{Vxd}$$

Fuente: (ISO 11930, 2014)

Donde:

\bar{C} = medida de número de colonias contadas por triplicada en las placas.

V= volumen de inóculo depositado en la placa (1ml).

d= factor de dilución.

Ecuación 2.

Reducción en los recuentos de microorganismos

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x$$

Fuente: (ISO 11930, 2014).

Donde:

N_0 = número de microorganismos inoculados en t_0 (Tiempo 0 o tiempo inicial).

N_x = número de microorganismo vivientes en cada conteo.

Criterios de aceptación

Los criterios presentados a continuación son tomados de (ISO 11930, 2014).

Los criterios de aceptación están basados en los resultados de la reducción logarítmica.

Se definen dos (2) criterios de aceptación:

CRITERIO A

Si los datos alcanzados en la prueba cumplen al mismo tiempo las siguientes condiciones:

Posterior a los 7 días: existe reducción de al menos tres (3) logaritmos en bacterias y al menos de un (1) logaritmo para *C. albicans* ATCC 10231.

Posterior a los 14 días: existe reducción de al menos tres (3) logaritmos en bacterias, sin existir aumento en la lectura anterior; y al menos de un (1) logaritmo para *C. albicans* ATCC 10231, sin existir aumento en la lectura anterior y no existir aumento de *A. brasiliensis* ATCC 16404 con respecto al t_0 .

Posterior a los 28 días: existe reducción de al menos tres (3) logaritmos en bacterias, sin existir aumento en la lectura anterior; y al menos de un (1) logaritmo para *C. albicans* ATCC 10231, sin existir aumento en la lectura anterior y al menos un (1) logaritmo con respecto a *A. brasiliensis* ATCC 16404.

CRITERIO B

Si los datos alcanzados en la prueba cumplen al mismo tiempo las siguientes condiciones:

Posterior a los 14 días: existe reducción de al menos tres (3) logaritmos en bacterias, al menos un (1) logaritmo para *C. albicans* ATCC 10231, y no existir aumento con respecto al t_0 de *A. brasiliensis* ATCC 16404.

Posterior a los 28 días: existe reducción de al menos tres (3) logaritmos en bacterias, sin existir aumento en la lectura anterior; y al menos de un (1) logaritmo para *C. albicans* ATCC 10231, existiendo un (1) aumento en la lectura anterior y no existir aumento con respecto a *A. brasiliensis* ATCC 16404.

Al interpretar los criterios A y B, se define el riesgo microbiológico vinculado estrechamente con la eficacia conservante de las cremas.

Además:

Criterio A: la fórmula está garantizada frente a la actividad microbiana que puede ser un riesgo potencial para el consumidor y no se considera otro factor adicional.

Criterio B: la fórmula tiene un nivel de seguridad frente a la actividad microbiana aceptable, si el análisis de riesgo manifiesta la presencia de elementos no vinculados con la fórmula y señala que el riesgo microbiológico es tolerable para el producto cosmético.

Tabla 8.

Criterio de evaluación para el ensayo de la eficacia conservante.

Valores requeridos en la reducción logarítmica ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) ^a								
Microorganismo	Bacterias			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>	
Tiempo de muestreo	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
Criterio A	≥3	≥3 y NI ^b	≥3 y NI	≥ 1	≥ 1 y NI	≥ 1 y NI	≥ 0 ^c	≥ 1
Criterio B	No realizado	≥ 3	≥3 y NI	No realizado	≥ 1	≥ 1 y NI	≥ 0	≥ 0 y NI

Nota: Fuente: (ISO 11930, 2014). **Elaborado por:** la autora, 2018.

Considerando que:

^a En este ensayo se acepta un margen de desviación de 0.5 log.

^b NI: no hay incremento en el recuento respecto al del tiempo de contacto precedente.

^c $R_x = 0$ cuando $N_0 = \lg N_x$ (no hay incremento respecto al recuento inicial).

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1 Diseño experimental

Tabla 9.

Formulación de cremas a evaluar.

FORMULACIONES	Número de tratamiento
Crema con aceite esencial (0.4 %) de <i>Ocotea quixos</i> + extracto fluido hidroalcohólico (7.5 %) de <i>Ocotea quixos</i> .	T 1
Crema con aceite esencial (0.4 %) de <i>Ocotea quixos</i> + extracto fluido hidroalcohólico (10 %) de <i>Ocotea quixos</i> .	T 2
Crema con aceite esencial (0.4 %) de <i>Ocotea quixos</i> + extracto fluido hidroalcohólico (15 %) de <i>Ocotea quixos</i> .	T 3
Crema con aceite esencial (0.4 %) de <i>Ocotea quixos</i>	T 4
Crema con phenova (0.8 %) (CONTROL POSITIVO)	T 5
Cultivo madre de las cepas ATCC (CONTROL NEGATIVO)	

Elaborado por: la autora, 2018.

Se elaboraron cinco fórmulas (T1, T2, T3, T4 y T5) que contienen una combinación de aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %) y extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (7.5 – 10 – 15 %). Las concentraciones de los activos naturales se encuentran basadas en estudios previos en cuanto al aceite esencial, en cuanto al extracto al resultado de la prueba de preferencia hedónica 3.2.3. Se compara los resultados obtenidos de las cremas elaboradas con activos naturales de *Ocotea quixos* con posible acción conservante versus los resultados obtenidos de la crema con phenova (conservante comercial) que es el control positivo, y se determina cuál o cuáles son las cremas con mejor efecto conservante.

El control negativo se considera a las cepas de los microorganismos ATCC, que permite identificar si existe crecimiento del microorganismo en las diferentes cremas.

3.2 Formulación cosmética

3.2.1 Fórmula de las cremas cosméticas

De acuerdo con el literal 2.2.1 la formulación de las cremas tiene la siguiente composición:

Tabla 10.

Formulación de crema con conservante sintético (Phenova). Tratamiento 5.

Nombre INCI	Nombre común	Porcentaje (%)	Función
Paraffinum Liquidum	Aceite mineral	3	Emoliente
Glyceryl Stearate	Estearato de glicerilo	4	Emulsificante
Stearic Acid	Ácido esteárico	5	Emulsificante
Cetyl Alcohol	Alcohol cetílico	2.5	Emulsificante
Theobroma Cacao (Cocoa) Seed Butter	Manteca de cacao	2	Emoliente
Caprylic/Capric Triglyceride	Crodamol GTCC	6	Emoliente
Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	Phenova	0.8	Conservante sintético
Cyclopentasiloxano	Silicona xiameter	3	Emoliente
Agua destilada	Agua destilada	c.s.p	Disolvente

Elaborado por: la autora, 2018.

Para la elaboración de la crema del tratamiento 5, phenova (conservante sintético) se utilizaron los materiales descritos en la tabla 10, en la que se indica los porcentajes utilizados para la elaboración de dicha crema.

En la crema del tratamiento 5 se utilizó 0.8 % de phenova del total del peso de la crema.

Tabla 11.

Formulación de cremas con extractos de Ocotea quixos (Tratamiento T1, T2, T3).

Nombre INCI	Nombre común	Porcentaje (%)	Función
Paraffinum Liquidum	Aceite mineral	3	Emoliente
Glyceryl Stearate	Estearato de glicerilo	4	Emulsificante
Stearic Acid	Ácido esteárico	5	Emulsificante
Cetyl Alcohol	Alcohol cetílico	2.5	Emulsificante
Theobroma Cacao (Cocoa) Seed Butter	Manteca de cacao	2	Emoliente
Caprylic/Capric Triglyceride	Crodamol GTCC	6	Emoliente
Cyclopentasiloxano	Silicona xiameter	3	Emoliente
Agua destilada	Agua destilada	c.s.p	Disolvente
Extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i>		(5 - 7.5 - 10 - 15 - 20) *	Activo natural
Aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i>		(0.4) **	Activo natural

Nota: * Las concentraciones del extracto variaron en cada fórmula elaborada manteniendo fijo la concentración de aceite esencial. ** Se prepare una fórmula únicamente con aceite y sin extracto (Tratamiento 4). **Elaborado por:** la autora, 2018.

Los porcentajes utilizados en la elaboración de las cremas tienen como referencia estudios anteriores, tanto en eficacia cosmética (Álvarez & Peña, 2017; Espadero, 2017) como de estabilidad (F. López & Tituaña, 2017).

En el estudio de eficacia cosmética realizado por (Álvarez & Peña, 2017), determinó que las cremas elaboradas con *Aristiguetia glutinosa* y *Ocotea quixos* (aceite esencial), utilizadas en proporción 20:80 como antioxidantes, ayudan en la firmeza y la elasticidad de la piel. Además, (Espadero, 2017) elaboró cremas y lociones con *Ocotea quixos* (aceite esencial) y en base a pruebas de preferencia hedónica determinó que el porcentaje de 0.4 % de aceite esencial de *Ocotea quixos* es agradable y no disgusta al olfato, se evaluó elasticidad y firmeza de la piel mediante cutometer determinando que la formulación sí brinda elasticidad y firmeza a la piel.

El estudio realizado por (F. López & Tituaña, 2017) indica que las cremas elaboradas y almacenadas en condiciones ambientales favorecen para que dichas cremas no varíe las características químicas (determinación de fenoles totales) y físicas (viscosidad, organolépticas, pH) y determina que la vida útil de las cremas es menor a dos (2) años con el método de Poppe.

Los estudios mencionados demuestran que la formulación utilizada con 0.4 % de aceite esencial de *Ocotea quixos* es eficaz y estable; la incorporación de otro activo natural extracto de *Ocotea quixos* pretende comparar la estabilidad demostrada de la fórmula de estudios anteriores, frente a fórmulas que al tener otros activos naturales podrían potencializar el efecto conservante.

3.2.2 Estabilidad preliminar

De acuerdo con el proceso establecido por (ANVISA, 2004), se realiza una estabilidad preliminar que identifica separación de fases en fórmulas poco estables, se sometió las cremas a centrifugación, los resultados se describen en la tabla 12.

Tabla 12.

Resultados de estabilidad preliminar.

Tratamiento	Resultados
0.4 % de aceite de <i>Ocotea quixos</i> + 5 % de extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> .	Con separación de fases
0.4 % de aceite de <i>Ocotea quixos</i> + 7.5 % de extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> .	Sin separación de fases
0.4 % de aceite de <i>Ocotea quixos</i> + 10 % de extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> .	Sin separación de fases
0.4 % de aceite de <i>Ocotea quixos</i> + 15 % de extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> .	Sin separación de fases
0.4 % de aceite de <i>Ocotea quixos</i> + 20 % de extracto fluido hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> .	Con separación de fases

Elaborado por: la autora, 2018.

Colina (s.f) hace referencia a la viscosidad de una emulsión afecta a su estabilidad, indicando que: “a mayor viscosidad de la fase continua, mayor estabilidad de la emulsión”, (en la fórmula planteada la fase continua es agua), y además menciona que para que una emulsión se pueda formar se debe superar la tensión interfacial.

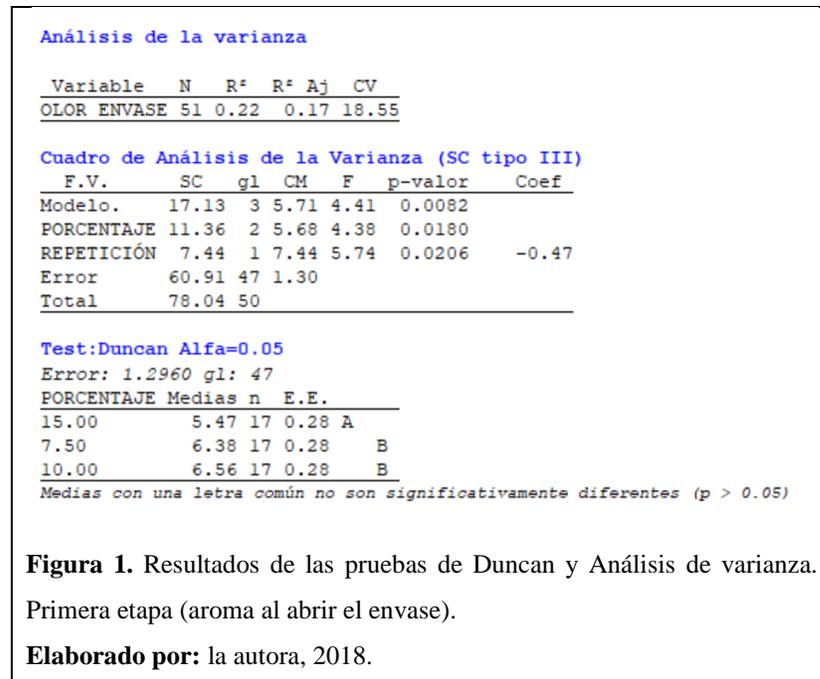
Según Gennaro (2003, p. 873) indica que una emulsión puede formar dos fases (acuosa y oleosa) cuando se produce un cambio, es decir que si la fórmula original era una emulsión Oleosa/Acuosa (O/A) se convierte en Acuosa/Oleosa (A/O) y viceversa.

En base a lo que menciona Colina (s.f) se puede determinar que al 5 % de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* tiene una viscosidad baja (de consistencia líquida), haciendo que la crema no sea estable; mientras que, de acuerdo con lo que menciona Gennaro (2003, p. 873) se considera que la concentración de 20 % de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* es una cantidad elevada y hace que la crema cambie de forma O/A a A/O y esto hace que los porcentajes utilizados en la fórmula se deban cambiar para que se mantenga la estabilidad de la crema.

Las cremas que no poseen separación de fases se sometieron a pruebas de preferencia hedónica, ya que indican que las cremas se mantendrán estables en el tiempo.

3.2.3 Prueba de preferencia

Las tres (3) etapas especificadas en el literal 2.2.3, se evaluaron en el programa InfoStat versión 2015 y se obtuvieron los siguientes resultados:



La figura 1 muestra la respuesta de los panelistas en la primera etapa y de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza se determina que las tres (3) formulaciones testeadas en la primera etapa, dieron como resultado lo siguiente:

Formulación de 15 % extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*: media de 5.47, lo que indica que está en el rango de 5 (“no me gusta ni me disgusta”).

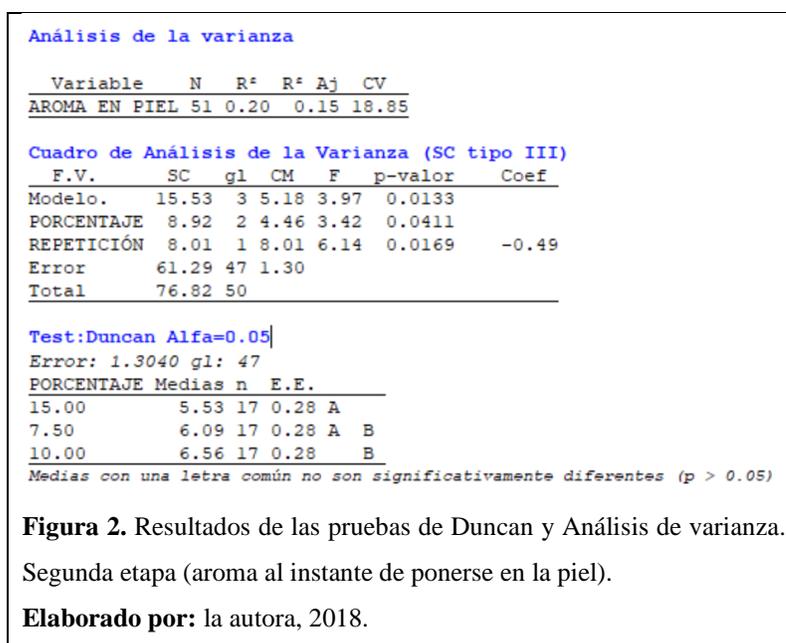
Formulación de 7.5 % y 10 % extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*: media de 6.38 y 6.56, respectivamente. Se encuentran en el rango de 6 (“me gusta levemente”).

De acuerdo con los resultados estadísticos, se indica que existe diferencia significativa entre la crema con 15 % de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (letra A) y las de 7.5 % y 10 % de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (letra B).

Según los resultados mencionados en la figura 1, indican que en la primera etapa la crema con mayor aceptación es el tratamiento 2 que corresponde a: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (10 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %),

seguido del tratamiento 1 correspondiente a: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (7.5 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %); el tratamiento con menor aceptación es el tratamiento 3: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (15 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %).

Debido a estos resultados se puede decir que, el tratamiento 3 tuvo menor aceptación debido a la concentración de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*, por tener un aroma intenso.



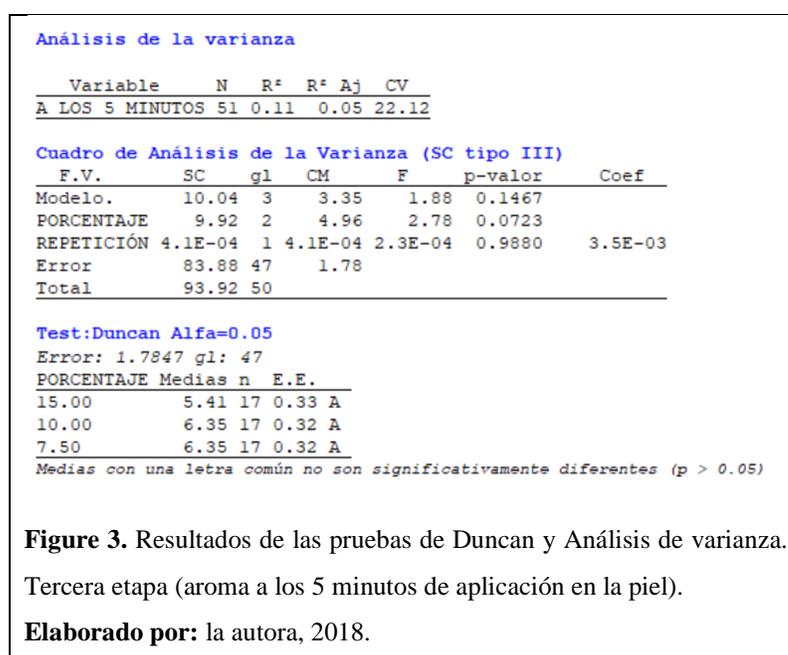
La figura 2 muestra la respuesta de los panelistas en la segunda etapa y de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza se determina que las tres (3) formulaciones testeadas en dicha etapa, dieron como resultado lo siguiente:

Formulación de 15 % extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*: media de 5.53, lo que indica que está en el rango de 5 (“no me gusta ni me disgusta”).

Formulación de 7.5 % y 10 % extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*: media de 6.09 y 6.56, respectivamente. Se encuentran en el rango de 6 (“me gusta levemente”).

De acuerdo con los resultados obtenidos se determina que las tres cremas tienen diferencia significativa.

En esta segunda etapa que corresponde al aroma de la crema al instante de colocarse en la piel, la figura 2 nos indica que la crema con mayor aceptación es el tratamiento 2: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (10 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %), y el de menor aceptación fue el tratamiento 3: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (15 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %).



La figura 3 muestra la respuesta de los panelistas en la tercera etapa y de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza se determina que las tres (3) formulaciones testeadas en esta etapa, dieron como resultado lo siguiente:

Formulación de 15 % extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*: media de 5.41, lo que indica que está en el rango de 5 (“no me gusta ni me disgusta”).

Formulación de 7.5 % y 10 % extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos*: media de 6.35 para ambas formulaciones. Se encuentran en el rango de 6 (“me gusta levemente”).

Según la figura 3 las cremas de mayor aceptación son de los tratamientos 1: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (10 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %) y tratamiento 2: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (7.5 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %), y la de menor aceptación es el tratamiento 3: extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* (15 %) y aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %); sin embargo, de acuerdo con las estadísticas indicadas en la figura 3, se procedió a realizar las tres (3) cremas para la evaluación, ya que no presentan diferencia significativa.

De acuerdo con los resultados obtenidos del programa InfoStat versión 2015, se determina que las tres concentraciones utilizadas (7.5 % - 10 % y 15 %) de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* no presentan diferencias significativas entre ellas en el aspecto de aroma al momento de la tercera etapa de evaluación (a los cinco minutos de colocada la crema), indicando que la crema al utilizarla no es desagradable en cuanto al aroma que percibe el panelista, lo que significa que las concentraciones utilizadas no tienen diferencia significativa a su olfato, por lo que se puede utilizar las tres concentraciones para la evaluación de efecto conservante.

3.3 Challenge test

Según lo planteado en la tabla 5 del enunciado 2.3 sobre el método de Overnight, se obtuvieron las siguientes lecturas en el espectrofotómetro:

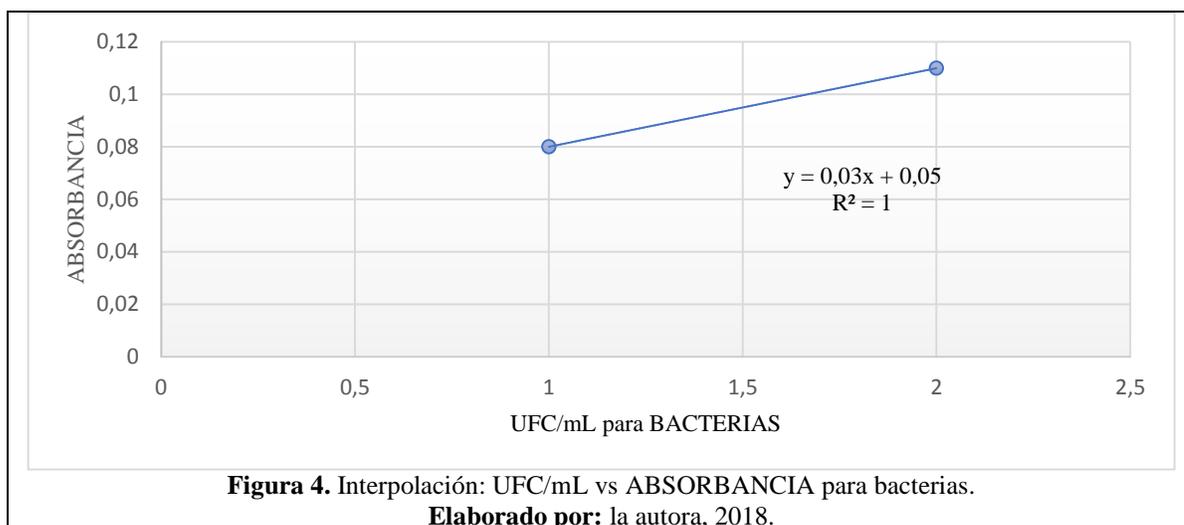
Tabla 13.

Lectura en espectrofotómetro de los microorganismos de las cepas ATCC para el cultivo Overnight.

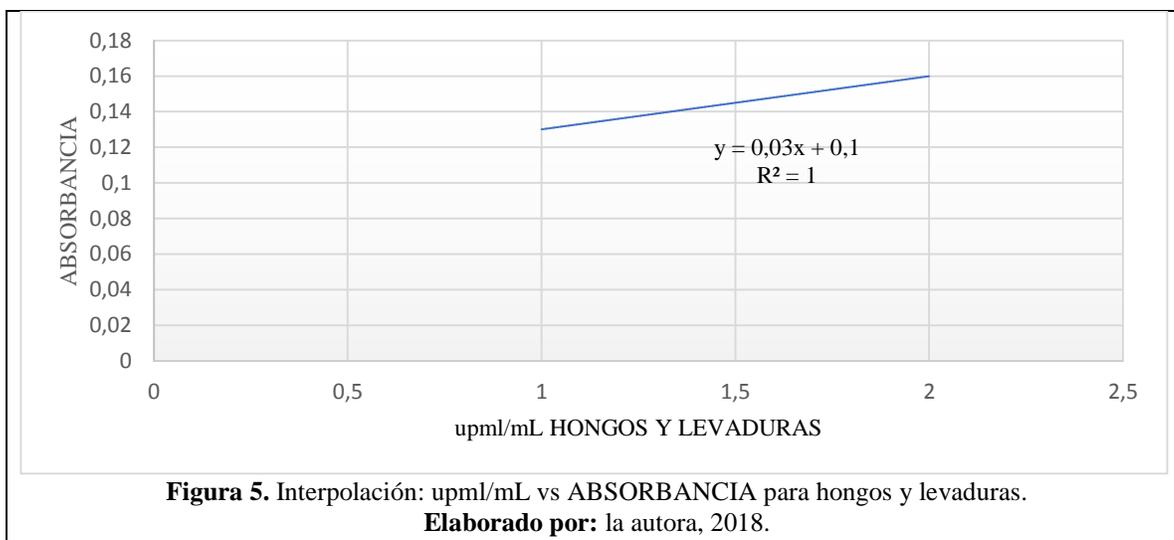
Microorganismo de cepa ATCC	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
<i>E. coli</i> ATCC 8739	625	0.08
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	625	0.11
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	625	0.08
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	530	0.13
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	530	0.147

Elaborado por: la autora, 2018.

De acuerdo con estos resultados se realiza una interpolación de los datos. Utilizando la ecuación de la recta obtenida, se determina la cantidad de masa de microorganismos inicial existentes.



La figura 4 señala la recta formada al interpolar los datos obtenidos en la tabla 13 referente a las absorbancias obtenidas para bacterias. Esta interpolación ayuda a conocer la ecuación de la recta que calcula la cantidad inicial de microorganismos a utilizar en la evaluación de Challenge Test.



La figura 5 indica la recta formada al interpolar los datos de la tabla 13 con referencia a los hongos. Dicha interpolación ayuda a conocer la ecuación de la recta con la que se calcula la cantidad inicial de microorganismos a utilizar para el Challenge Test.

Tabla 14.

Cálculo de UFC/mL de microorganismos ATCC inicial a partir de la lectura de espectrofotometría.

Microorganismo de cepa ATCC	Absorbancia	Ecuación de la recta	Determinación de UFC/mL (X)	UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0.08	$y=0.03x + 0.05$	$x=(y-0.05)/0.03$	1×10^8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.11			2×10^8
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0.08			1×10^8
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.13	$y=0.03x + 0.1$	$x=(y-0.1)/0.03$	1×10^6
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	0.147			1.56×10^6

Elaborado por: la autora, 2018.

En la tabla 14 se indican los valores de UFC/mL iniciales de los inóculos de las cepas ATCC (t_0) que es la masa inicial de microorganismos dictados por la norma ISO 11930:2012.

En dicha ecuación “y” es el valor conocido de absorbancia y “x” es el valor que se desea conocer para determinar la cantidad inicial de microorganismo, por lo que se utiliza un despeje simple en la ecuación para conocer dicha cantidad.

Las siguientes tablas indican las UFC obtenidas en recuento de placas, es decir, células con capacidad de reproducción y formación de colonias expresadas en Unidad Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) (Martín, s.f).

Tabla 15.

Promedio de contaje microbiano en placas Petri. Tratamiento 1 (T1).

Microorganismo	t₀ UFC/mL	t₁ UFC/mL	t₂ UFC/mL	t₃ UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1x10 ⁸	540	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2x10 ⁸	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1x10 ⁸	12	<10	<10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1x10 ⁶	1348	1440	Incontable
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	1.56x10 ⁶	296	80	112

Elaborado por: la autora, 2018.

Analizando los resultados de la tabla 15, se determina que el T1 (extracto fluido hidroalcohólico 7.5 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*), no posee actividad conservante, debido a que no posee actividad antimicrobiana contra *C. albicans* ATCC 10231, al demostrar que aumenta el crecimiento microbiano hasta ser incontable en t₃ (28 días).

Como antimicrobiano de *A. brasiliensis* ATCC 16404, se observa que existe una disminución de carga microbiana en los tiempos de toma de muestras.

Tabla 16.

Promedio de contaje microbiano en caja Petri. Tratamiento 2 (T2).

Microorganismo	t₀ UFC/mL	t₁ UFC/mL	t₂ UFC/mL	t₃ UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1x10 ⁸	968	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2x10 ⁸	48	<10	<10
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1x10 ⁸	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1x10 ⁶	480	1264	2184
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	1.56x10 ⁶	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora, 2018.

El tratamiento 2 (extracto fluido hidroalcohólico 10 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*) indica que existe un aumento de *C. albicans* ATCC 10231 en cada toma de muestra, sin embargo, hay que analizarlo en reducción logarítmica para saber si cumple los criterios de aceptación.

Tabla 17.

Promedio de contaje microbiano en placas Petri. Tratamiento 3 (T3).

Microorganismo	t₀ UFC/mL	t₁ UFC/mL	t₂ UFC/mL	t₃ UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1x10 ⁸	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2x10 ⁸	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1x10 ⁸	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1x10 ⁶	120	<10	<10
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	1.56x10 ⁶	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora, 2018.

La tabla 17 indica que no existe crecimiento microbiano frente a las cremas del tratamiento 3 (extracto fluido hidroalcohólico 15 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*).

Se puede indicar que existe un crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 en el tiempo t_1 que al momento de hacer el recuento de placa en t_2 y t_3 disminuye, asumiendo que se debe al efecto conservante de los extractos naturales utilizados en la elaboración de las cremas. Para considerarlo un tratamiento eficaz como conservante se debe realizar el análisis de reducción logarítmica, y comparar con los criterios de aceptación.

Tabla 18.

Promedio de conteaje microbiano en placas Petri. Tratamiento 4 (T4).

Microorganismo	t_0 UFC/mL	t_1 UFC/mL	t_2 UFC/mL	t_3 UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1×10^8	Incontable	6200	3868
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2×10^8	Incontable	2424	2000
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1×10^8	<10	<10	232
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1×10^6	<10	1004	1604
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	1.56×10^6	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora, 2018.

La tabla 18 correspondiente a las cremas elaboradas con aceite esencial de *Ocotea quixos* (0.4 %), indica que existe reducción en ciertos microorganismos al momento de los diferentes tiempos de conteo microbiano, sin embargo, no se lo puede considerar como un tratamiento viable debido a que existe un excesivo crecimiento en t_1 de *E. coli* ATCC 8739 y *P. aeruginosa* ATCC 9027 y no se podrá realizar reducción logarítmica.

Tabla 19.

Promedio de conteaje microbiano en placas Petri. Tratamiento 5 (T5).

Microorganismo	t_0 UFC/mL	t_1 UFC/mL	t_2 UFC/mL	t_3 UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1×10^8	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2×10^8	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1×10^8	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1×10^6	<10	<10	<10
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	1.56×10^6	<10	12	40

Elaborado por: la autora, 2018.

La tabla 19 indica el tratamiento 5 (conservante sintético, Phenova 0.8%).

De acuerdo con PROSPECTOR (2017) menciona que a Phenova se lo utiliza en formulaciones cosméticas y farmacéuticas, presentando actividad antimicrobiana al tener acción contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

De acuerdo con esta bibliografía se corrobora la actividad antimicrobiana de phenova, y se lo utilizó como blanco positivo por su capacidad de conservante sintético.

Las siguientes tablas representan los datos obtenidos de forma logarítmica de las tablas anteriores (tabla 15 – 19) del promedio de contaje microbiano en placa Petri, para lo cual se utiliza la ecuación 2:

$$Rx = \lg N_0 - \lg N_x$$

Elaborado por: la autora, 2018.

La ecuación 2, indica la disminución de los microorganismos en función de la reducción logarítmica siempre en relación con el t_0 (N_0 en la ecuación 2) con los datos obtenidos de los diferentes tiempos (t_1 , t_2 y t_3) (N_x en la ecuación 2). Hay que considerar que t_0 , t_1 , t_2 y t_3 corresponden a los días 0, 7, 14 y 28 respectivamente, que son los días que dicta la norma para realizar la evaluación de un conservante.

En base a R_x , se determina cuál es el mejor tratamiento en comparación a los criterios de aceptación (criterios A y B) expuestos anteriormente y resumidos en la tabla 8.

Tabla 20.

Reducción logarítmica de T1.

Microorganismo	t₀	t₁	t₂	t₃
<i>E. coli</i> ATCC 8739	8	5.27	7.05	7.05
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	8.30	7.35	7.35	7.35
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	6.92	7.05	7.05
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	2.87	2.84	Incontable
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	6.19	3.72	4.29	4.14

Elaborado por: la autora, 2018.

Los resultados obtenidos en la tabla 20, correspondiente al tratamiento 1 (extracto fluido hidroalcohólico 7.5 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*), se los compara con los criterios de aceptación resumidos en la tabla 8, y se determina que la crema del tratamiento 1 no cumple con ningún criterio de aceptación debido a lo expuesto a continuación:

En el caso de *E. coli* ATCC 8739 en t₁ (7 días) la población microbiana disminuye en 5 logaritmos, en t₂ (14 días) la población microbiana disminuyó en 7 logaritmos con referencia al valor inicial en t₀ (0 días) y en t₃ (28 días) la población se mantiene en 7 logaritmos, indicando que no existe incremento de población (NI en la norma 11930:2012), siendo indicativo de que el conservante se encuentra ejerciendo acción bactericida, es decir, que la combinación de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* y aceite esencial de *Ocotea quixos* disminuyen la cantidad de inóculo sembrada en t₀.

Se observa el mismo comportamiento para los otros microorganismos a excepción de *C. albicans* ATCC 10231 que presenta en t₁ reducción de 2 logaritmos, pero en t₃ indica que existe crecimiento microbiano excesivo (incontable), siendo indicativo de que la combinación de los extractos naturales no tiene acción contra este microorganismo.

Tabla 21.

Reducción logarítmica T2.

Microorganismo	t₀	t₁	t₂	t₃
<i>E. coli</i> ATCC 8739	8	5.01	7.05	7.05
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	8.30	6.32	7.05	7.05
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	7.05	7.05	7.05
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	3.32	2.90	2.66
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	6.19	5.24	5.24	5.24

Elaborado por: la autora, 2018.

Las reducciones logarítmicas obtenidas del tratamiento 2 (extracto fluido hidroalcohólico 10 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*) se las compara con el criterio de aceptación A y a este tratamiento se lo considera viable debido a lo siguiente:

El criterio de aceptación A indica que las bacterias deben tener una reducción logarítmica mayor o igual que 3 en t₁ (día 7); t₂ y t₃ (día 14 y 28, respectivamente) deben tener una reducción mayor o igual que 3 y no tener ningún incremento (NI) microbiano en las lecturas. Para *C. albicans* ATCC 10231 indica que debe tener una reducción mayor o igual que 1 en los tres tiempos y en que además en t₂ y t₃ no debe existir incremento microbiano. Para *A. brasiliensis* ATCC 16404 este criterio indica que en t₂ debe ser mayor o igual 0 y t₃ debe ser mayor o igual que 1.

Tomando en cuenta estas especificaciones el tratamiento 2 se lo puede considerar como un sustituto de phenova, ya que cumple con el criterio A.

Tabla 22.

Reducción logarítmica T3.

Microorganismo	t₀	t₁	t₂	t₃
<i>E. coli</i> ATCC 8739	8	7.05	7.05	7.05
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	8.30	7.05	7.05	7.05
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	7.05	7.05	7.05
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	3.92	5.05	5.05
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	6.19	5.24	5.24	5.24

Elaborado por: la autora, 2018.

Los resultados obtenidos de la reducción logarítmica indicados en la tabla 22 correspondientes al tratamiento 3 (extracto fluido hidroalcohólico 15 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*), indica que la crema cumple con el criterio de aceptación A, por lo siguiente:

Las bacterias cumplen con la reducción de al menos 3 logaritmos y no existe incremento microbiano (NI). *C. albicans* ATCC 10231 indica que tiene reducción de al menos 1 logaritmo en t₁, t₂ y t₃, sin incremento en t₂ y t₃. *A. brasiliensis* ATCC 16404 cumple con las reducciones logarítmicas dictadas para t₂ y t₃; por lo tanto, al tratamiento 3 se la considera viable para poder ser utilizada como reemplazo del conservante sintético (phenova).

Tabla 23.

Reducción logarítmica T4.

Microorganismo	t₀	t₁	t₂	t₃
<i>E. coli</i> ATCC 8739	8	Incontable	4.21	4.41
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	8.30	Incontable	4.62	4.70
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	7.05	7.05	5.63
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	5.05	3.00	2.79
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	6.19	5.24	5.24	5.24

Elaborado por: la autora, 2018.

Los resultados obtenidos del tratamiento 4 (aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*), se los compara con el criterio de aceptación B, considerando lo siguiente:

En t₁ para *E. coli* ATCC 8739 y *P. aeruginosa* ATCC 9027 indica que el conservante aún no tiene efecto bactericida para dichas cepas, sin embargo, en t₂ y t₃ indican que existe reducción que está dentro de lo estipulado en el criterio B que es reducir al menos 3 logaritmos.

De acuerdo con los resultados obtenidos y comparados con el criterio de aceptación B, el tratamiento 4 se lo puede considerar una opción para poder ser sustituto de phenova.

Tabla 24.

Reducción logarítmica T5.

Microorganismo	t₀	t₁	t₂	t₃
<i>E. coli</i> ATCC 8739	8	7.05	7.05	7.05
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	8.30	7.05	7.05	7.05
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	7.05	7.05	7.05
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	5.05	5.05	5.05
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	6.19	5.24	5.11	4.59

Elaborado por: la autora, 2018.

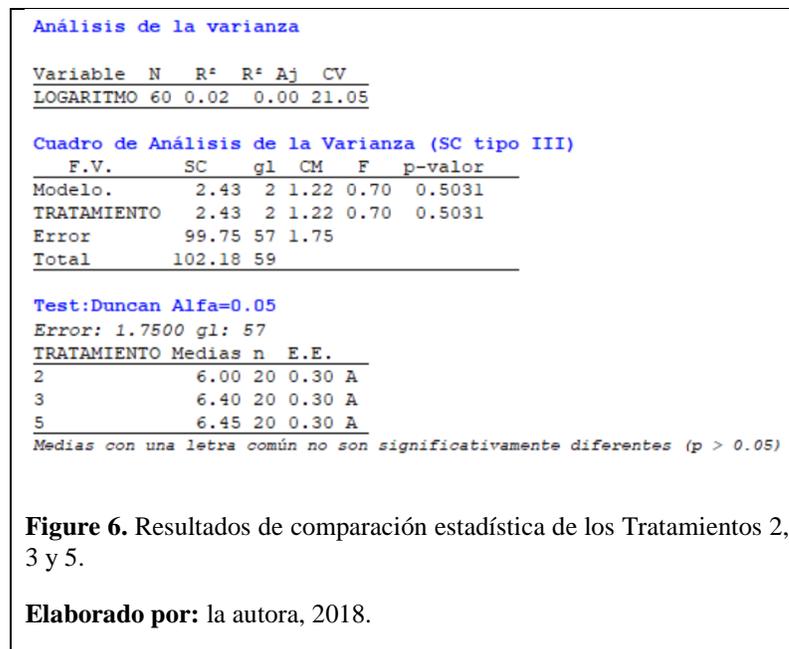
La tabla 24 correspondiente a la reducción logarítmica del tratamiento 5 (phenova 0.8 %), indica que el conservante sintético cumple con el criterio de aceptación A que menciona lo siguiente:

Las bacterias tienen una reducción de al menos 3 logaritmos en los tres tiempos; *C. albicans* ATCC 10231 tiene reducción de al menos 1 logaritmo y *A. brasiliensis* ATCC 16404 cumple con la reducción especificada para el mismo.

De acuerdo con los datos obtenidos en la reducción logarítmica y comparados con los criterios de aceptación (Tabla 8), se determina que los tratamientos 2 y 3 son los que mejores resultados se obtuvieron de acuerdo con los criterios de aceptación y comparados con el tratamiento 5 que es el blanco positivo.

Los resultados anteriores indican que se cumple la hipótesis que la investigación plantea: si cualquiera de las diferentes combinaciones de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* con aceite esencial de *Ocotea quixos* logra pasar la prueba de desafío, quedará confirmada la capacidad conservante de la combinación.

Para elegir cuál de los tratamientos que cumplen con el criterio A es el mejor, los datos obtenidos se ingresan al programa InfoStat versión 2015 y se hace un análisis estadístico.



De acuerdo con los datos analizados se determina que los tratamientos 2, 3 y 5 no presentan diferencia significativa entre ellos. Esto indica que los tratamientos 2 y 3 que contienen la combinación de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* con aceite esencial de *Ocotea quixos* son igual de efectivos que el tratamiento 5 que es la crema elaborada con phenova.

Según la bibliografía phenova es un conservante sintético, que puede ser sustituido por extractos naturales, y de acuerdo a los resultados obtenidos, la combinación de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* y aceite esencial de *Ocotea quixos* puede ser una opción para ser sustituto de este conservante sintético, y además, se debe tomar en cuenta que la (CAN, 2017) en su resolución 1905, indica que todos los parabenos de cadena larga deben ser substituidos como conservantes.

Capítulo IV

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

- La hipótesis planteada al inicio de la investigación indica que: si cualquiera de las diferentes combinaciones de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* con aceite esencial de *Ocotea quixos* logra pasar la prueba de desafío, quedará confirmada la capacidad conservante de la combinación. Esta hipótesis es validada con los tratamientos 2, 3 y 4, debido a los resultados expuestos anteriormente que indican que estos tienen capacidad conservante, de acuerdo con los criterios de aceptación expuestos por la prueba de desafío.
- El tratamiento 4 es aceptado de acuerdo con criterio de aceptación B, en el que indica que el riesgo de contaminación de la crema es tolerable para el consumidor, y que la cantidad microbiana presente en la crema es aceptable dentro de las estipulaciones dadas en la norma; y los tratamientos 2 y 3 son aceptados con el criterio de aceptación A, en el que menciona que los microorganismos que pueden contaminar la fórmula no representan un riesgo potencial para el consumidor.
- De acuerdo con el análisis estadístico de varianza, se indica que los tratamientos 2 (extracto fluido hidroalcohólico 10 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*) y tratamiento 3 (extracto fluido hidroalcohólico 15 % de *Ocotea quixos* y aceite esencial 0.4 % de *Ocotea quixos*) versus el tratamiento 5 (phenova 0.8 %) no poseen diferencia significativa, por lo que cualquiera de estos dos tratamientos pueden ser utilizados como sustituto de phenova en la elaboración de cremas cosméticas.

4.2 Recomendaciones

- Probar con otro tipo de envase, considerando que el anexo D de la norma indica que el tipo de envase utilizado es un factor importante al momento de evaluar el riesgo e influye en los resultados finales de la prueba de protección microbiana en un producto cosmético.
- Considerar a otros materiales vegetales que tengan estudios en los que indiquen la acción bactericida, ya que estos pueden ser candidatos para potencializar la fórmula.
- Considerar la posibilidad de cambiar los porcentajes utilizados en los materiales de elaboración de las cremas, para conseguir una mejor textura de la crema, debido a que la finalidad de esta investigación fue probar la actividad conservante de los extractos naturales en base a los porcentajes utilizados en investigaciones anteriores.

Referencias

- AEMPS. (2006). Comisión de las Unidades Europeas: Diario oficial de la Unión Europea. Recuperado el 22 de marzo de 2018, de www.aemps.gob.es
- AEMPS. (2017). Preguntas y respuestas sobre cosmetovigilancia. Recuperado 22 de marzo de 2018, de www.aemps.gob.es
- AEMPS. (2018). El Gobierno aprueba el nuevo Real Decreto que regula los productos cosméticos en beneficio de la seguridad de los consumidores. Recuperado el 22 de marzo de 2018, de www.aemps.gob.es
- AINIA. (2016). Seguridad en los cosméticos: técnicas de control microbiológico en el desarrollo de productos. Recuperado 22 de marzo de 2018, de www.ainia.es
- Alastruey- Izquierdo, A., Melhem, M., Bonfietti, L., & Rodriguez-Tudela, J. (2015). Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology, 57(19), 57-64. [dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000700011](https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700011)
- Álvarez, P., & Peña, J. (2017). *Evaluación de la eficacia cosmética in vivo de fórmulas cosméticas elaboradas con aceite esencial de Aristeguietia glutinosa (Matico) y Ocotea quixos (Ishpingo)* (Proyecto de investigación y desarrollo previo a la obtención del Grado de Magíster en Ciencias y Tecnologías Cosméticas). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca. Recuperado el 06 de junio de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec
- ANMAT. (s.f.). ¿Qué es la Cosmetovigilancia? Recuperado el 23 de febrero de 2018, de www.anmat.gov.ar
- ANMAT. (2018). ¿Qué son los productos cosméticos? Recuperado el 23 de febrero de 2018, de www.anmat.gov.ar
- ANVISA. (2004). *Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos* (1ª edición, Vol. 1). Brasília. Recuperado el 15 de febrero de 2018, de portal.anvisa.gov.br

- Ayela, M. R. (s. f.). *Dermatitis* (Vol. 1.0). San Vicente (Alicante): Editorial Club Universitario. ISBN: 978-84-9948-215-6
- Badía, M., & García, E. (2013). *Cosmética para peluquería* (1ª edición). Madrid, España: Ediciones Paraninfo, S.A. ISBN: 978-84-9732-378-9
- Badía, M., & García, E. (2014). *Perfumería y Cosmética Natural* (1ª edición). Madrid, España: Ediciones Paraninfo, S.A. ISBN: 978-84-9732-560-8
- CAN. (2017). Resolución 1905. Recuperado el 01 de abril de 2018, de www.controlsanitario.gob.ec
- Canosa, M. del P. (2009). *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de Triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. Santiago de Compostela. Recuperado el 08 de abril de 2018, de www.books.google.com.ec
- Cárdenas, C., Pozo, W., Rojas, M., Roque, A., & Mihai, R. (2016). Antifungal Activity of Two Botanicals Extracts on Rose Crop (*Rosa L. Sp.*), Against *Sphaerotheca Pannosa* Var. *Rosae*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10(ELSEVIER), 465-474. doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.017
- Cárdenas-Tello, C., Pozo-Rivera, W., Almirall, E., & Roque, A. (2016). Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* y *Piper carpunya*, potenciales fungocontroladores, 11(Qualitas), 56-83. ISSN: 1390-6569
- Carpenter, R., Lyon, D., & Hasdell, T. (2000). *Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control* (2ª edición). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher Inc. ISBN: 0-8342-1642-6
- Carrasco, F. (2005). *Diccionario de Ingredientes Cosméticos* (3ª edición). Málaga. ISBN: 84-609-3243-5

- Cermeño, J., & Torres, J. (1998). Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos, (*Revista Iberoamericana de Micología*), 155-157. Recuperado el 13 de mayo de 2018, de www.reviberoammicol.com
- Colina, L. (s.f). Reducción de tamaño de líquidos. Emulsificación y homogenización. Recuperado el 17 de junio de 2018, de sgpwe.izt.uam.mx
- Copan Diagnostics Inc. (s.f). Cryobank™ Conveniente Systema De Perlas Para Almacenar y Reactivar Cultivos de Bacteria. Recuperado el 18 de mayo de 2018, de www.pvequip.cl
- Cortés, C. (2011). *Propiedades y Aplicaciones de los Cuadrados Latinos* (Tesis que, para obtener el grado académico de: Maestro en Ciencias Matemáticas Aplicadas e Industriales). Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, D.F. Recuperado el 22 de abril de 2018, de mat.izt.uam.mx
- COSMOS-standar AISBL. (2013). Cosmetics organic and natural standart. Recuperado el 22 de febrero de 2018, de cosmosstandard.files.wordpress.com
- da Costa, G., Barbosa, B., & Ozório, C. (2016). Essential Oil: Properties, Applications, Extraction Methods, and Perspective. En *Essential Oil* (1ª edición, pp. 1-11). New York: Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63484-351-5.
- de Castro, M., & Lozano, M. del C. (2012). Sistemas dispersos heterogéneos: emulsiones. En *Manual de tecnología farmacéutica* (pp. 155-162). Barcelona, España: Elsevier España, S.L. ISBN: 978-84-8086-600-2.
- elhuerto. (2015). Diferencias entre eco, orgánico y natural. Recuperado 27 de julio de 2018, de elhuertodelucas.com
- Espadero, M. (2017). *Evaluación in vitro de la eficiencia cosmética de dos formulaciones elaboradas con Ocotea quixos (Ishpingo)* (Proyecto de investigación y desarrollo previo a la obtención del Grado de Magíster en

- Ciencias y Tecnologías Cosméticas). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. Recuperado el 25 de febrero de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec
- Flor, H., & Parra, M. (2017). *Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de Ishpink, Ocotea quixos (Lam.) Kosterm* (Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales). Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Recuperado el 21 de enero de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec
- fundacion-canna.es. (s.f). Flavonoides. Recuperado 23 de marzo de 2018, de www.fundacion-canna.es
- García-Rodríguez, J., & Picazo, J. (1998). *Microbiología Médica. 2. Microbiología Clínica*. Madrid - España: Harcourt Brace. ISBN: 84- 8174-172-8
- Gennaro, A. (2003). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20.^a ed., Vol. 1). Argentina: Ed. Médica Panamericana S. A. ISBN: 950-06-1866-4.
- INVIMA. (2017). Información de seguridad relacionada con la comercialización de algunos productos fabricados por el laboratorio Química Patric Ltda. Recuperado el 22 de marzo de 2018, de www.invima.gov.co
- ISO 11930. (2014). Cosméticos. Microbiología. Ensayo de la protección antimicrobiana de un producto cosmético (ISO 11930:2012, IDT).
- Kragh, K., Alhede, M., Rybtke, M., Stavnsberg, C., Jensen, P., Tolker-Nielsen, T., ... Bjarnsholt, T. (2018). The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Applied Environmental Microbiology*, (84). doi.org/10.1128/AEM.02264-17.
- ladosis.org. (2017). Canfeno: El terpeno en la cannabis que combate la enfermedad cardiovascular. Recuperado 23 de marzo de 2018, de ladosis.org

- Lawless, H., & Heymann, H. (2010). *Preference Testing. In: Sensory Evaluation of Food*. New York: Springer. ISBN: 978-1-4419-6488-5
- López, F., & Tituaña, K. (2017). *Estudio de estabilidad de cremas faciales elaboradas con Matico (Aristeguietia glutinosa) e Ishpingo (Ocotea quixos)* (Tesis previa a la obtención del título de Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. Recuperado el 25 de febrero de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec
- López, N. (2011). Obtención y aplicación de extractos naturales. Recuperado el 22 de febrero de 2018, de www.anfaco.es
- Martín, I. (s.f). Recuento de placa. Recuperado 17 de junio de 2018, de www.diversidadmicrobiana.com
- Martini, M.-C., Chivot, M., & Peyrefitte, G. (1997). *Dermocosmética y Estética* (Vol. 3). Barcelona, España: Masson S.A. ISBN: 84-458-0501-0.
- Mosquera, T. (2014). *Estudio comparativo de la eficacia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite esencial de romero (Rosmarinus officinalis Lamiaceae) utilizados como conservantes en una formulación cosmética* (Tesis previa a la obtención del título de Magister en Ciencias y Tegnologías Cosméticas). Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Recuperado el 06 de junio de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec
- Nadinic, J., Martino, G., Bandoni, A., & Ferraro, G. (2015). *Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales* (1ª edición). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Eudeba. ISBN: 978-950-23-4620-5
- Nava, D., & Lambros, K. (Eds.). (2011). *Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-48408-1

- Noriega, P. (2016). *Ishpink, Ocotea quixos (LAM.) Kosterm. History, traditional uses, chemical, pharmacological properties and the economic potential of its essentials oils present within this amazonian species*. (Vol. 12). Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63484-351-5
- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: Actividad antimicrobiana y antifúngica, 7(1), 3-8. doi.org/10.17163/lgr.n7.2008.01.
- Núñez, M., Navarro, C., & Cebrián, J. (2012). *El libro de la cosmética natural* (1ª edición). Barcelona: Nuevos Emprendimientos Editoriales S. L. ISBN: 978-84-940800-0-5
- O`Shaughnessy, J. (1991). *Marketing competitivo. Un enfoque estratégico*. (2ª edición). Madrid, España: Díaz de Santos, S.A. ISBN: 84-87189-77-6
- Palacios, W. (2011). *Árboles del Ecuador* (1ª edición). Quito, Ecuador: Grupo Comunicacional efigie.
- Pérez, P. (2016). *Yo sí que me cuido. Trucos y recetas fáciles y naturales para mantenerte guapa*. Penguin Random House Grupo Editorial.
- PROSPECTOR. (2017). Phenova. Recuperado 22 de junio de 2018, de www.ulprospector.com
- Pruebas sensoriales. Investig de Mercados. (2008). Recuperado 24 de mayo de 2018, de javiernoriegav.wordpress.com
- Ramírez-Navas, J. (2012). Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor, (Revista ReCiTeIa). Recuperado el 21 de enero de 2018, de www.researchgate.net
- REDSA. (2017). Extractos naturales y plantas medicinales. Recuperado 15 de febrero de 2018, de redsa.com.mx

- Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft Pedersen, H., & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas / Useful Plants of Ecuador: Applications, Challenges, and Perspectives*. (1ª edición). Quito, Ecuador: Ediciones Abya-Yala. ISBN: 978-9978-22-684-1
- Sanchis, J., Roqués, B., & de la Llana, A. (2006). Estudio sobre la recuperación de diferentes cepas microbianas de colección, mantenidas en congelación, en los diferentes tipos de CRIOTECAS MICROKIT. Recuperado el 24 de mayo de 2018, de www.microkit.es
- Scott, N. (2011). *Organic Skin Care Recipes For Natural Radiant Beauty*. ISBN: 1-4680-9555-2
- Sierra Acosta, M. (2014). *Maquillaje* (2ª edición). Madrid, España: Ediciones Paraninfo, S.A. ISBN: 978-84-9732-416-8
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (3ra ed., Vol. 1). España: Publicacions de la Universitat Jaume. ISBN: 978-84-8021-599-2
- Uguña, V. (2017). *Evaluación in vivo de la eficacia cosmética de dos formulaciones elaboradas con aceite esencial de matico (Aristiguetia glutinosa)* (Proyecto de investigación y desarrollo previo a la obtención del Grado de Magíster en Ciencias y Tecnologías Cosméticas). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. Recuperado el 20 de abril de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec
- Universidad Nacional de Colombia. (2016). Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias, hongos y levaduras. Recuperado el 24 de mayo de 2018, de www.ibun.unal.edu.co
- Usano-Aleman, J., Palá-Paúl, J., & Herráiz-Peñalver, D. (2016). Phenological Changes in the Biosynthesis and Chemical Composition of the Essential Oils.

En *Essential Oils* (pp. 19-38). New York: Nova Science Publishers, Inc. ISBN:
978-1-63484-351-5

Vega, M. A. (2015). *Evaluación de la eficacia del aceite esencial de Curcuma longa L. como conservante en una formulación cosmética orgánica* (Tesis previa a la obtención del título de Magister en Ciencias y Tecnologías Cosméticas). Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Recuperado el 25 de febrero de 2018, de www.dspace.ups.edu.ec

Vivancos, V. (2017). Formas cosméticas. Principios activos, excipientes y aditivos. Recuperado 23 de marzo de 2018, de revistadigital.inesem.es

Anexos

Anexo 1

Ficha técnica del aceite esencial de *Ocotea quixos*.

FICHA TÉCNICA



Fundación Chankuap', Dirección: Vidal Rivadeneira y Hernando de Benavente, Macas – Ecuador EC140150; Telf.: (593)7-2701763, e-mail: chankuap@mo.pro.ec. Para mayor información contactar: Área de Transformación de productos

ACEITE ESENCIAL ISHPINK

(ISHPINK ESSENTIAL OIL)

1. Descripción

El aceite esencial de ishpink es un producto obtenido de las hojas y cálizos florales de la planta *Ocotea quixos* por medio de una destilación por arrastre de vapor. Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

2. Aplicaciones

Ingrediente natural para cosméticos (Aroma)

3. Especificaciones

INCI name (sugerido): Ocotea quixos
CAS No.: No disponible
EINECS No.: No disponible

COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id
Cardeno	0,124	Mosleno	0,582	Gurjuneno	0,735
Alpha pinene	4,121	Linanol	1,213	Caryophyllene	11,785
Benzaldehyde	1,599	3 phenyl propanal	0,321	Cinnamyl acetate	13,943
1R- alpha pinene	2,263	4 terpineol	0,806	Alpha caryophyllene	7,245
Bicyclo heptane	4,773	Alpha terpineol	0,690	Isoeugenol methyl ester	0,658
Terpinolene	0,375	Cinnamal	13,042	Azulenes	2,763
Cymene	0,206	Alpha cubeno	0,282	Cardineno	0,664
Camphene	1,694	Copaeno	2,560	Caryophyllene oxide	4,044
Eucahyptol	4,811	Methyl cinnamate	4,992		
Benzyl benzoate	0,567				

GC-MS Estudio de la Universidad de Ferrara (Italia)

DATO DE ANÁLISIS	RANGO	MÉTODO
Apariencia Visual	Líquido aceitoso transparente	Visual
Color	Ligeramente amarillo	Visual
Olor	Típica nota a canela	Olor
Densidad (g/ml)	0.82 – 0.92	<841>USP
Índice de Refracción	1.520 – 1.530	<831>USP
Índice de Acidez (%)	Max. 1.2	Método Interno
Solubilidad en alcohol	Completamente soluble en alcohol 96°	Método Interno
Cinnamal (%)	11.0 – 13.5	GC-MS
Caryophyllene (%)	9.5 – 12.0	GC-MS
Cinnamyl acetate (%)	13.5 – 15.0	GC-MS

Fecha de emisión: 20/02/09

Fecha de revisión: 20/02/09

1 | Página

MTDS ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK

Fuente: Fundación Chankuap, 2009.

Anexo 2

Certificado de análisis de extracto fluido hidroalcohólico de *Ocotea quixos* realizado por Flor y Parra en el trabajo de tesis: Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de *Ishpink, Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.



Certificado de Análisis



Tipo de análisis: Caracterización de extracto hidroalcohólico de <i>Ocotea quixos</i> .
Fecha: 17 de Octubre de 2016.
Lugar: Laboratorios CIVABI – Universidad Politécnica Salesiana.

1. Características organolépticas:

Características organolépticas	Evaluación	Observaciones
Forma/Aspecto	Líquido	
Color	Café claro	
Olor	Característico	
Sabor	Característico	

2. Parámetros físico/químicos:

Parámetros físico/químicos	Valor	Observaciones
pH	6.228	
Índice de refracción	1.349	
Densidad	0.9796	

3. Análisis fitoquímicos:

Metabolitos secundarios	Tipo de ensayo	Observaciones
Alcaloides	Mayer, Wagner y Dragendorff	++
Fenoles	Cloruro férrico 5%	+++
Taninos	Cloruro férrico 5%	++
Lactonas y cumarinas	Baljet	++
Flavonoides	Shinoda	++
Quinonas	Borntranger	++
Catequinas	Catequinas	++
Saponinas	Espuma	+++

(-) Ausencia (+) Leve presencia (++) Moderada presencia (+++) Abundante presencia

LABORATORIOS CIENCIAS DE LA VIDA

Campus El Girón, Av. Isabel La Católica N23-52 y Madrid, Bloque B, • Teléfonos 3962800 / 3962900
Ext. 2646 y 2249 • Correo electrónico: clarenas@ups.edu.ec

Elaborado por: Flor y Parra, 2017.

Anexo 3

Hoja de evaluación sensorial.

PRUEBA DE EVALUACIÓN SENSORIAL

CREMAS COSMÉTICAS

FECHA: _____

NUMERO DE PANELISTA: _____

INSTRUCCIONES

1.- Familiarizarse con la escala a utilizar, cualquier duda comunicar al instructor de la prueba

1 = me disgusta extremadamente	5 = no me gusta ni me disgusta
2 = me disgusta mucho	6 = me gusta levemente
3 = me disgusta moderadamente	7 = me gusta moderadamente
4 = me disgusta levemente	8 = me gusta mucho
	9 = me gusta extremadamente

2.- Sacar las muestras a testear y colocar en el orden indicado.

3.- Limpiar la zona de los dos antebrazos con los paños proporcionados para la prueba

4.- La primera calificación debe realizarse apenas se abre el recipiente que contiene la muestra.

5.- De acuerdo al orden de evaluación colocar las muestras en diferentes zonas del antebrazo, seguir las indicaciones del instructor de la prueba

6.- En el orden indicado realizar la evaluación,

AROMA: Acercar la nariz al área del antebrazo en donde se encuentre la muestra, tomar respiraciones cortas con la boca cerrada, y aromatizar el espacio de la muestra.

7.- Colocar los resultados en la siguiente tabla

N° MUESTRA	AROMA PRIMARIO (Al abrir el envase)	AROMA EN LA PIEL (Apenas se coloca en la piel)	AROMA EN LA PIEL (después de cinco minutos)

Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 4

Envase de crema (20 g)



Elaborado por: la autora, 2018

Anexo 5

Prueba de estabilidad para las diferentes concentraciones.



Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 6

Temperatura de incubación de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.



Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 7

Temperatura de incubación de *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9037, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 8

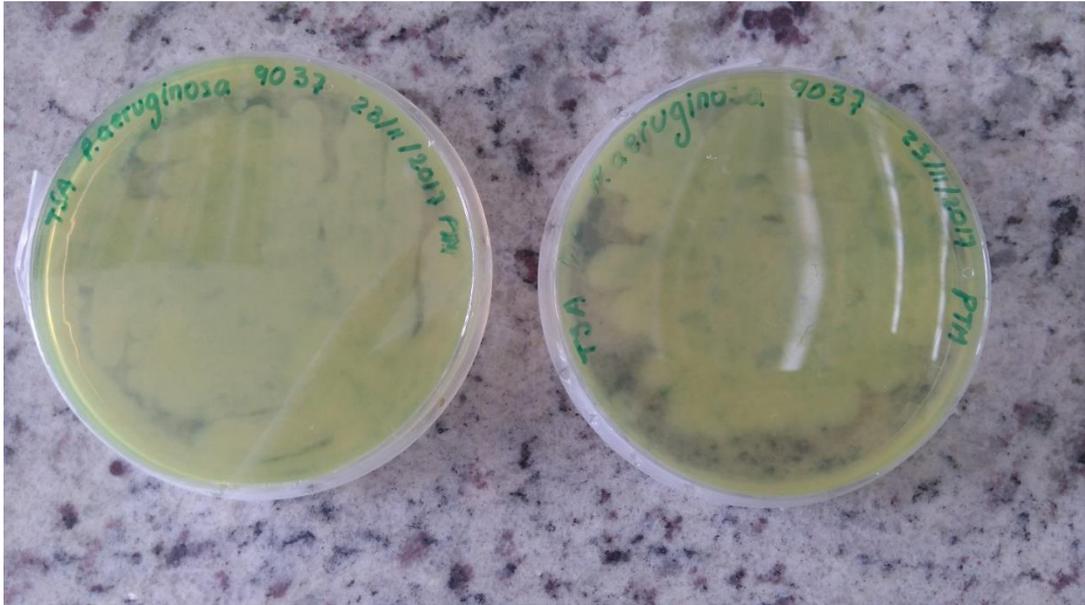
Cultivo de cepa ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* en medio TSA



Elaborado por: la autora, 2018

Anexo 9

Cultivo de cepa ATCC 9037, *Pseudomona aeruginosa* en medio TSA.



Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 10

Cultivo de cepa ATCC 8739, *Escherichia coli* en medio TSA.



Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 11

Cultivo de cepa ATCC 10231, *Candida albicans* en medio SDA



Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 12

Cultivo de cepa ATCC 16404, *Aspergillus brasiliensis* en medio PDA.



Elaborado por: la autora, 2018

Anexo 13

Caja Petri separada en cuadrantes para conteo microbiano. (T2).



Elaborado por: la autora, 2018.