



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA EFICACIA DE DOS CONSERVANTES EN  
FORMULACIONES COSMÉTICAS ELABORADOS CON ACEITES ESENCIALES DE  
*TOMILLO (THYMUS VULGARIS) Y SALVIA (SALVIA OFFICINALIS)*”

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORAS: ODALIS JULISSA ASTUDILLO ASPIAZU

GABRIELA CAROLINA PUCHA ORTIZ

TUTORA: DRA. MÓNICA JUDITH ESPADERO BERMEO, Mgtr.

Cuenca - Ecuador  
2023

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Odalis Julissa Astudillo Aspiazu con documento de identificación N° 0106872088 y Gabriela Carolina Pucha Ortiz con documento de identificación N° 0107387409; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 18 de agosto del 2023

Atentamente,



---

Odalis Julissa Astudillo Aspiazu

0106872088



---

Gabriela Carolina Pucha Ortiz

0107387409

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, Odalis Julissa Astudillo Aspiazu con documento de identificación N° 0106872088 y Gabriela Carolina Pucha Ortiz con documento de identificación N° 0107387409, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos las autoras del Trabajo experimental: “Evaluación in vitro de la eficacia de dos conservantes en formulaciones cosméticas elaborados con aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y salvia (*Salvia officinalis*)”, el cual ha sido desarrollado para optar el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 18 de agosto del 2023

Atentamente,

---

Odalis Julissa Astudillo Aspiazu

0106872088

---

Gabriela Carolina Pucha Ortiz

0107387409

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mónica Judith Espadero Bermeo con documento de identificación N° 0103645412, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN IN VITRO DE LA EFICACIA DE DOS CONSERVANTES EN FORMULACIONES COSMÉTICAS ELABORADOS CON ACEITES ESENCIALES DE TOMILLO (*THYMUS VULGARIS*) Y SALVIA (*SALVIA OFFICINALIS*)”, realizado por Odalis Julissa Astudillo Aspiazu con documento de identificación N° 0106872088 y por Gabriela Carolina Pucha Ortiz con documento de identificación N° 0107387409, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 18 de agosto del 2023

Atentamente,



---

Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo, Mgtr.

0103645412

## **DEDICATORIA**

Este trabajo quiero dedicarles a mi padre Oswaldo y mi madre Mercedes, por ser las personas que me motivaron a seguir continuando con este trayecto de formación. Han sido quienes me impulsan a ser mejor y me han ayudado a mantener un carácter fuerte para enfrentar cualquier adversidad.

A mi tía Mayi y abuela Santa por siempre estar pendiente a pesar de la distancia, quienes me han dado consejos y amor incondicional para no rendirme a pesar de las tragedias.

Los amos y recuerden que esto es por ustedes.

Odalís

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación va dedicado a mis padres María Edelmira y Pedro Leonidas, quienes han sido mi mayor inspiración, guía y fortaleza, les debo todo lo que soy.

A mis hermanos Fernando, Kathy, Ronald, Jessica y Erika, quienes han sido cómplices de aventuras y confidentes, gracias por estar presente en cada tropiezo y celebrar juntos cada logro alcanzado.

A mis tías Susanita y Luisita que son como mis segundas por brindarme su apoyo en las buenas y malas y darme consejos cuando más lo necesitaba.

A mis abuelitos Angelino, Virgilio, Felicia y Zoila, igualmente a mi tío Lucho y hermano Pedro Eduardo, que desde el cielo son una pieza importante en mi vida, ya que son mis ángeles y guías para seguir cumpliendo mis sueños.

A mi amiga Alejandra, que siempre estará presente en mi mente y corazón

Gabriela

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi grupo de estudio, Gaby, Michi y Sami quienes durante los últimos 5 años fueron compañeras incondicionales, me brindaron amor sincero y una amistad casi imposible de encontrar. Han sido personas que me ayudaron a crecer como persona y con sus grandes capacidades intelectuales a mejorar en mis asignaturas, nunca las olvidare. También agradezco a mis amigos Fernando, Mateo, Gata y Ali por nunca abandonarme en mis momentos más difíciles.

A mi familia, especialmente mis hermanas Tiffany y Nahomy por ser mis confidentes e impulsarme ha crecer siempre más alto, no habría podido lograrlo sin su apoyo.

A mis docentes, ya que cada uno de ellos siempre compartían sus conocimientos y enseñanzas permitiéndome crecer académicamente, gracias por ser la inspiración para ser una mejor profesional.

A mi compañera de tesis, Gabriela por ser parte de este logro académico, escucharme y soportarme durante todo este tiempo de duro trabajo.

Odalís

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mis padres por su apoyo y sacrificio y ser el motor de mi vida, gracias a ellos pude a llegar a estas instancias.

A mis hermanos por nunca dejarme sola, y brindarme su apoyo y consejos para subirme el ánimo en mis momentos más difíciles.

A mi compañera de tesis Oda, que en el poco tiempo que nos conocemos, me demostró su apoyo incondicional y con sus locuras alegrar los días más frustrante y de esta manera concluir con el trabajo de titulación, mil gracias.

A mis amigas Majo, Mary, Xime, Liz, Nathy, Sofy y Ali, gracias por su amistad que ha sido un pilar fundamental en momentos de desafío y duda, dándome el aliento necesario para seguir adelante. Gracias por estar ahí para escucharme, por compartir risas y alegrías, pero también para ofrecerme sus sabios consejos. Gracias por hacerme los días bonitos.

A mis profesores, les agradezco por compartir su sabiduría y pasión por la enseñanza. Cada uno de ustedes ha contribuido significativamente a mi desarrollo académico y personal.

Gabriela



## ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
1.1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.3	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	4
1.4	JUSTIFICACIÓN .....	4
1.5	OBJETIVOS.....	6
1.5.1	Objetivo General.....	6
1.5.2	Objetivos Específicos .....	7
1.6	HIPÓTESIS .....	7
1.6.1	Hipótesis Nula.....	7
1.6.2	Hipótesis Alternativa .....	7
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>8</b>
2.1	ESTADO DEL ARTE .....	8
2.2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	9
2.2.1	COSMÉTICA NATURAL Y ORGÁNICA .....	9
2.2.2	Cosmética natural .....	11
2.2.3	Cosmética orgánica.....	13
2.2.4	Regulación de los cosméticos naturales y orgánicos .....	13
2.2.5	Conservantes cosméticos .....	17
2.2.6	Selección de conservantes.....	17
2.2.7	Conservante natural .....	22
2.2.8	Conservante sintético.....	24
2.2.9	CONSERVANTES NATURALES .....	25
2.2.10	FORMAS COSMÉTICAS .....	30
2.2.11	MÉTODO DE CHALLENGE TEST.....	31
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>33</b>
3.1	MARCO METODOLÓGICO.....	33
3.1.1	Diseño de investigación.....	33

3.1.2	Unidad experimental .....	33
3.1.3	Población y muestra.....	33
3.1.4	Variables .....	33
3.1.5	Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	34
3.1.6	Técnicas de procesamiento y análisis de datos .....	34
3.1.7	Procedimientos experimentales .....	34
3.2	FASE 1. FORMULACIÓN DEL PRODUCTO COSMÉTICO.....	34
3.3	FASE 2. ENSAYO PARA EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS ACEITES ESENCIALES COMO CONSERVANTES (Challenge Test) .....	38
3.3.1	Estándar internacional ISO 11930:2019.....	38
3.3.2	A. Activación de cepas liofilizadas ATCC .....	40
3.3.3	B. Preparación de los inóculos de cada cepa ATCC .....	41
3.3.4	C. Inoculación de muestras .....	42
3.3.5	D. Verificación de eficacia de conservantes a intervalos específicos según la norma ISO 11930:2019.....	43
3.3.6	E. Evaluación de resultados conteo de colonias (recuento en placa).....	44
4	CAPÍTULO IV.....	45
4.1	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1.1	Elaboración de las fórmulas cosméticas - shampoo.....	45
4.1.2	Control de calidad de las fórmulas (shampoos) .....	46
4.1.3	Resultados de la eficacia de los aceites esenciales como conservantes (Challenge Test) .....	47
4.1.4	Resultados de la eficacia de la acción antimicrobiana de los conservantes en las formulaciones (Challenge Test) .....	50
4.2	Análisis Estadístico.....	60
5	CAPÍTULO V .....	63
5.1	CONCLUSIONES.....	63
5.2	RECOMENDACIONES.....	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
	ANEXOS.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Condiciones que establecen que el cosmético esté libre de contaminación microbiológica .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 2. Conservantes más utilizados en formulaciones .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 3. Taxonomía de <i>Thymus vulgaris</i> L.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 4. Taxonomía de <i>Salvia officinalis</i> L. ....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 5. Información del aceite esencial <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo).....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 6. Información del aceite esencial <i>Salvia officinalis</i> (salvia) .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 7. Formulación general del shampoo a desarrollarse .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 8. Microorganismos ATCC establecidos en la norma ISO 11930:2019 .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 9. Activación de cepas liofilizadas ATCC .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 10. Formulaciones de shampoo a evaluar .....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 11. Formulaciones con sus respectivas concentraciones.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 12. Resultados de viscosidad y pH de las diferentes formulaciones .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 13. Lecturas de absorbancia de los microorganismos ATCC .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabla 14. Cálculo de las UFC/mL de los inóculos microbianos ATCC a partir de lecturas de absorbancia.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 15. Cronograma de trabajo para comprobar el crecimiento microbiano .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 16. Contaje microbiano Fórmula 1 AE <i>Thymus vulgaris</i> L (tomillo) (0,5%) .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 17. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 1 <i>Thymus vulgaris</i> L (tomillo) (0,5%).....</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 18. Contaje microbiano Fórmula 2 AE Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L) (1,5%).....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 19. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 2 AE <i>Thymus vulgaris</i> L (tomillo) (1,5%).....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 20. Contaje microbiano Fórmula 3 AE <i>Salvia officinalis</i> (salvia) (0,5%).....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 21. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 3 AE <i>Salvia officinalis</i> (salvia) (0,5%).....</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 22. Contaje microbiano Fórmula 4 AE <i>Salvia officinalis</i> (salvia) (1,5%).....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 23. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 4 AE <i>Salvia officinalis</i> (salvia) (1,5%).....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 24. Contaje microbiano Fórmula 5 Sharomix (0,5%) .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 25. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 5 Sharomix (0,5%) .....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 26. Contaje microbiano Fórmula 6 Sharomix (1,5%) .....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 27. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 6 Sharomix (1,5%) .....</b>	<b>58</b>

<b>Tabla 28. Contaje microbiano Fórmula 7 Sin conservante.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 29. Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 7 Sin conservante</b> <b>.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 30. Análisis estadístico en R Studio por la prueba de Kruskal-Wallis .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 31. Análisis estadístico en R Studio por el método de Kruskal-Wallis .....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1. Interpolación de lecturas de absorbancia de bacterias ATCC estandarizadas</b> .....	<b>48</b>
<b>Ilustración 2. Interpolación de lecturas de absorbancia de hongos y levaduras ATCC estandarizadas</b> .....	<b>49</b>
<b>Ilustración 3. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 1</b> .....	<b>51</b>
<b>Ilustración 4. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 2.</b> .....	<b>53</b>
<b>Ilustración 5. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 3</b> .....	<b>54</b>
<b>Ilustración 6. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 4.</b> .....	<b>56</b>
<b>Ilustración 7. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 5.</b> .....	<b>57</b>
<b>Ilustración 8. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 6.</b> .....	<b>58</b>
<b>Ilustración 9. Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 7.</b> .....	<b>60</b>
<b>Ilustración 10. Formulación cosmética madre</b> .....	<b>74</b>
<b>Ilustración 11. Preparación de shampoos con sus respectivos conservantes</b> .....	<b>74</b>
<b>Ilustración 12. Inoculación de los microorganismos en los shampoos</b> .....	<b>75</b>
<b>Ilustración 13. Incubación de los shampoos en intervalos de tiempo de 0,7,14,28 días</b> .....	<b>75</b>
<b>Ilustración 14. Inoculación de microorganismo en cajas Petri</b> .....	<b>76</b>
<b>Ilustración 15. Sembrado de inóculos por diseminación</b> .....	<b>76</b>
<b>Ilustración 16. Conteo de colonias formadoras de microorganismo.</b> .....	<b>77</b>

## Resumen

El incremento de la tendencia por parte de los consumidores de adquirir productos cosméticos naturales cada día es más grande, debido a que varios estudios han demostrado los beneficios que ofrecen el uso de ingredientes naturales dentro de las formulaciones brindando seguridad, calidad y eficiencia. La presencia de bioactivos naturales que forman parte de los aceites esenciales tienen varias propiedades como antimicrobianas, antioxidantes, entre otras. Y también pueden ser utilizadas como posibles conservantes en las diversas industrias tanto cosméticas, alimentarias y farmacéuticas.

La *Salvia officinalis L* y el *Thymus vulgaris L* son especies cosmopolitas con alto potencial terapéutico utilizada tradicionalmente por su potente actividad antimicrobiana, por lo que en el presente estudio se desarrolló un producto cosmético incorporando los aceites esenciales en dos concentraciones (0.5% y 1.5%) y se realizaron pruebas de Challenge Test, que permite determinar eficacia del conservante. Al mismo tiempo, se comparó con un conservante de amplio espectro aprobado en cosméticamente natural.

La interpretación de datos se realizó mediante una prueba no paramétrica conocido como método Kruskal- Wallis y Holm-Dunn teniendo como resultado que el aceite de *Salvia Officinalis L* al 1.5% presenta menos contaminación microbiana transcurridos los 28 días. Al contrario de *Thymus vulgaris L* y *Salvia Officinalis L* en concentraciones de 0.5% y 1.5% resultaron eficientes solo hasta el día 7. El conservante aprobado cosméticamente no presento contaminación en ningún intervalo de tiempo.

**PALABRAS CLAVES:** Aceites Esenciales, Actividad Antimicrobiana, Challenge Test, Conservante.

## Abstract

The increasing trend of consumers to purchase natural cosmetic products is growing every day, because several studies have shown the benefits offered by the use of natural ingredients in the formulations, providing safety, quality and efficiency. The presence of natural bioactives that are part of essential oils have several properties such as antimicrobial, antioxidant, among others. They can also be used as possible preservatives in various cosmetic, food and pharmaceutical industries.

*Salvia officinalis L* and *Thymus vulgaris L* are cosmopolitan species with high therapeutic potential traditionally used for their potent antimicrobial activity, so in the present study a cosmetic product was developed incorporating the essential oils in two concentrations (0.5% and 1.5%) and Challenge Test was performed, which allows determining the efficacy of the preservative. At the same time, it was compared with a broad-spectrum preservative approved in natural cosmetics.

The interpretation of data was performed by means of a non-parametric test known as the Kruskal-Wallis and Holm-Dunn method, with the result that the oil of *Salvia Officinalis L* at 1.5% presents less microbial contamination after 28 days. On the contrary, *Thymus vulgaris L* and *Salvia Officinalis L* at concentrations of 0.5% and 1.5% were efficient only up to day 7. The cosmetically approved preservative showed no contamination at any time interval.

**KEY WORDS:** Antimicrobial Activity, Challenge Test, Essential Oils, Preservative.

# 1 CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de tener productos que ofrezcan seguridad y eficacia dentro de la industria cosmética va aumentando cada día más. Uno de los principales desafíos a los que se enfrentan las empresas es desarrollar cosméticos de calidad y seguros, procurando evitar ocasionar daños en la salud de los consumidores. Por lo que una alternativa rentable en las últimas décadas, ha sido el uso de aceites esenciales como conservantes que permiten mantener los productos cosméticos íntegros y alargar su tiempo de vida útil.

Varios estudios han demostrado las increíbles propiedades que poseen los aceites esenciales, entre las más estudiadas sus efectos antimicrobianos y antioxidantes. Sin embargo, lo que más llama su atención es su origen natural, que hoy en día es un requisito muy utilizado por los consumidores, volviendo a los cosméticos más atractivos por ser amigables con el ambiente y sostenibles.

El uso de aceites esenciales es cada vez más cotizado por su composición química, dentro de sus compuestos tenemos terpenos, fenoles, aldehídos, éteres, epóxidos, etc. Esta combinación permite que los aceites esenciales tengan actividad antiinflamatoria, antiespasmódica, antiséptica, astringente y antimicrobiana en Gram positivas (*Bacillus sphaericus*, *S. aureus*,) y Gram negativas (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, etc), lo que resulta útil para las empresas que desean prevenir contaminación microbiana dentro de sus productos.



La presente investigación comparará la actividad antimicrobiana que poseen los aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) frente a un conservante aprobado cosméticamente dentro de las industrias. El aumento de uso en productos de origen natural y la posibilidad de desarrollarlos en vista de la variedad de ingredientes naturales con potenciales biológicos han sido la motivación de esta investigación, aprovechar la biodiversidad en el Ecuador incentiva la producción y permite competir bajo un criterio técnico motivando la producción de nuestro propios recursos ocupados en la cosmética, bajo aspectos técnicos y con estudios de eficacia, que su a vez garanticen al fabricante su efecto deseado.

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La mayoría de los productos cosméticos presentes en el mercado se encuentran en forma de geles, shampoo, lociones que están formulados con agua y compuestos orgánicos/inorgánicos que a menudo están expuestos a la contaminación microbiana. Esto demuestra que los productos requieren una protección eficaz y adecuada frente a la proliferación de microorganismos. Es por esta razón que la mayoría de las industrias utilizan conservantes sintéticos, donde los ingredientes juegan un papel vital en la prevención del crecimiento microbiano y la disminución del tiempo de vida útil del producto (Grenda et al., 2023).

En un estudio realizado por Wohlrab et al. (2018), los ésteres de parabeno se incorporan en la mayoría de las cremas y lociones dermatológicas y cosméticas como conservantes en el que se mostró que de 273 pacientes consecutivos con dermatitis crónica a los que se les realizó una prueba de parche rutinaria con 5 % de parabeno en vaselina tenían alergia al parabeno, una incidencia del 0,8 %. evaluaron etilparabeno al 5% y metilparabeno en vaselina y demostraron

reacciones alérgicas cutáneas fuertes en un grupo de pacientes. Confirmando los efectos secundarios que pueden ocasionar el uso de algunos tipos de parabenos.

Hay diversos estudios en donde se menciona como la cosmética convencional al ser compuestos químicos pueden ocasionar afecciones en la piel debido al contenido de parabenos como conservantes. En el estudio de Laguna et al., (2009), indica que los parabenos son solo uno de los varios ingredientes cuestionados. Así mismo, Soler de la Vega (2016) recalca que la mezcla de compuestos presentes en productos de cuidado personal, contiene altas concentraciones de toxicidad probada en el crustáceo planctónico *Daphnia magna* y la microalga marina *Phaeodactylum tricorutum*, y los resultados mostraron que su toxicidad incrementa en proporción a la concentración.

Dubey, D. et al., (2017) ha comprobado que los parabenos absorbidos por la piel afectan los fibroblastos, donde pueden inhibir la biosíntesis de la producción total de colágeno, que incluye los tipos I y III en la epidermis. Los shampoo y acondicionadores no tienen mucho contacto con la piel; solo son aplicables al cabello y como tales, causan menos efectos adversos. Sin embargo, pueden ser un problema cuando entran en contacto con los ojos durante el lavado del cabello. El efecto más común del uso de champú es el enmarañamiento del cabello (también conocido como enredo del cabello).

Es importante verificar la dosis adecuada de conservante para aplicar en un producto final, y si el producto es capaz de soportar las condiciones a la que se sometió durante el periodo de validez. La dosificación insuficiente puede provocar el crecimiento microbiano, comprometiendo la estabilidad del producto, mientras que una cantidad excesiva puede provocar reacciones

indeseables en los consumidores. Por lo que estudiar sus efectos en diversas concentraciones ayudaría a evitar daños al consumidor y pérdidas para los fabricantes.

### **1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La implementación de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L. (tomillo) y *Salvia officinalis* L. (salvia), como conservantes naturales es eficiente para la formulación cosmética de shampoo?

### **1.4 JUSTIFICACIÓN**

La seguridad y la calidad de los productos cosméticos son requisitos fundamentales para los consumidores y, por tanto, para las empresas que los producen. En el contexto de los cosméticos, es crucial garantizar que los productos no solo cumplan su función de manera efectiva, sino que también permanezcan en condiciones óptimas durante un período de tiempo más largo y sean seguros para la salud de los usuarios. Una de las consideraciones más importantes para lograr esta seguridad es el uso de conservantes en las formulaciones cosméticas (Rathee et al., 2023).

Los conservantes juegan un papel esencial en la prevención del crecimiento de microorganismos, ayudando a prolongar la vida útil del producto y asegurando que no representen un riesgo para la salud. Jain, (2023) afirma que, los aceites esenciales han sido estudiados y utilizados como posibles antisépticos naturales debido a sus propiedades antibacterianas y antioxidantes. Los compuestos de los aceites esenciales pueden inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos, lo que puede ayudar a prolongar la vida útil de un producto y cumplir su función cosmética.

Naufalin (2019) indica que entre los conservantes naturales alternativos que pueden utilizarse en los productos alimentarios se encuentran las plantas de kecombrang (*Nicolaia speciosa*) que ha demostrado sensibilidad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus*. La propuesta de investigación pretende relacionar la actividad antibacteriana de determinados ingredientes botánicos con su comportamiento como conservantes en formulaciones cosméticas (Naufalin, 2019).

En el caso del *Thymus vulgaris L* (tomillo), es conocido por su excelente actividad antibacteriana y antifúngica. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos en el aceite, como timol y carvacrol. Según estudios realizados por Rao et al., (2019), han demostrado inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shewanella spp* y *Aspergillus niger*.

Por otro lado, *Salvia officinalis L* (salvia) inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aspergillus niger*, debido a compuestos como cineol, alfa-pineno y borneol. Esta propiedad lo convierte en un ingrediente valioso en cosmética para promover la higiene, proteger la piel y el cabello de microorganismos y mejorar el cuidado personal de forma natural (Scuteri et al., 2021).

Debido a las normativas planteadas en el Ecuador se deben garantizar la calidad de los productos implementando técnicas aprobadas. Es así que dentro del país existe el Servicio Ecuatoriano de Normalización, INEN, siendo el encargado de controlar la calidad y la

productividad en las empresas para garantizar una comercialización segura para el consumo. Dentro de esta regulación también podemos encontrar los requisitos necesarios para desarrollar productos cosméticos en relación con aspectos microbiológicos, condiciones físico-químicas, entre otros (INEN 2867, 2015).

El estudio propuesto evalúa mediante la prueba de eficacia un conservante (Challenge test) la cual, se realiza para determinar la concentración mínima efectiva de conservantes antimicrobianos requerida para la conservación adecuada de productos cosméticos y farmacéuticos. Esta prueba asegura la calidad del cosmético antes de su comercialización (Ferreira et al., 2014).

Todos estos beneficios y propiedades relacionados con los aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia), como se ha descrito anteriormente, forman la base del presente estudio: "Evaluación in vitro de la eficacia de dos conservantes en formulaciones cosméticas elaborados con aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia)". Por lo tanto, el trabajo de investigación tiene como objetivo contribuir al crecimiento y desarrollo de la industria de la cosmética natural y ecológica y ofrecer una respuesta prometedora a las demandas de los consumidores conscientes que buscan productos cosméticos seguros, eficaces y respetuosos con el medio ambiente.

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.1 Objetivo General**

Evaluar la eficacia de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) como conservantes naturales para la formulación de productos cosméticos.

## 1.5.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar productos cosméticos incorporando aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) mediante las normativas vigentes para la formulación de shampoos con diferentes concentraciones.
- Determinar la eficacia de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) a través de la prueba de Challenge Test para la evaluación como conservantes naturales en diferentes concentraciones incorporadas en los productos cosméticos.
- Comparar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) frente a un conservante sintético mediante análisis estadístico para su posible uso en la industria cosmética.

## 1.6 HIPÓTESIS

### 1.6.1 Hipótesis Nula

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) no son eficaces como conservantes en una formulación cosmética para inhibir el crecimiento microbiano.

### 1.6.2 Hipótesis Alternativa

Los aceites esenciales *Thymus vulgaris L* (tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) son eficaces como conservantes en una formulación cosmética para inhibir el crecimiento microbiano.

## 2 CAPÍTULO II

### 2.1 ESTADO DEL ARTE

Muchos productos farmacéuticos, cosméticos y medicinales deben almacenarse adecuadamente, sobre todo los que tienen agua como ingrediente, ya que es el principal producto causante de la proliferación microbiana, que puede provocar deterioro, reducción del índice de rendimiento, daños y reacciones al consumidor. Por ello, es necesario añadir conservantes que reduzcan esta contaminación microbiana y garanticen la seguridad.

Según Guerrero Rivadeneira (2017) informa que la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo) cuando se probó en emulsión o/w en 3 concentraciones: 0,5%, 1,0% y 1,5% utilizando *Escherichia coli* Gramnegativa, *Pseudomonas aeruginosa* Gramnegativa, *Staphylococcus aureus* Grampositiva y *Candida albicans* como organismos de prueba mostró que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo) en las concentraciones probadas redujo el crecimiento de los microorganismos de prueba, cumpliendo así con los criterios USP-36 para productos de Categoría 2. Además, mediante un estudio de estabilidad microbiológica acelerada, se comprobó que a una concentración del 1,5% conservaba su efecto antimicrobiano durante toda la duración del estudio.

Según Montero, Romero, et al., (2018), mencionan en su investigación que el aceite de *Thymus vulgaris* muestra actividad antifúngica y antimicrobiana por su componente mayoritario que es el 1,8-cineol en un 21.5%, seguido del B-pineno con 20% y el o-cimeno con 17.9%. En donde gracias a estos componentes, demuestran su acción contra *S. aureus* a una concentración mínima inhibitoria del 0.03% v/v.

Otras investigaciones como la de Favero et al., (2019), probaron una mezcla de diferentes aceites esenciales (*Punica granatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Urtica*

*dioica*, *Mentha piperita* y *Salvia officinalis*) y algunos productos químicos tradicionales para producir un champú anticaspa y descubrieron que la adición de aceites esenciales a las formulaciones aumentaba la eficacia del producto sin efectos secundarios adicionales. Esto se debe a las propiedades antifúngicas de algunos aceites esenciales combinadas con sus propiedades antiinflamatorias, que pueden ayudar a eliminar la causa de la caspa.

El aceite esencial de *Salvia officinalis* tiene actividad anticolinesterásica, antidiabética, antiinflamatoria, antiespasmódica, antiséptica y astringente, antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antimutagénica y antivírica. Según los datos de la literatura, el aceite de salvia comercial se caracteriza generalmente por la presencia de tujonas, dominando la  $\alpha$ -tujona (18-43%) sobre la  $\beta$ -tujona (3-8,5%), el alcanfor (4,5-24,5%), el 1,8-cineol (5,5-13%), el  $\alpha$ -humuleno (0-12%), el  $\alpha$ -pineno (1-6,5%), el canfeno (1,5-7%) y el acetato de boronilo (2,5%) (Poulios, Giaginis & Vasios, 2019).

Según Joshi et al., (2021) afirmaron que el aceite esencial de *Salvia officinalis* es altamente bacteriostático, con una elevada actividad biológica frente a *Staphylococcus aureus* Grampositivos, *Klebsiella pneumoniae* Gramnegativos y *Escherichia coli* Gramnegativos, con zonas de inhibición mayores (11 y 10 mm, respectivamente) en comparación con el control positivo de eritromicina (6 mm).

## **2.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **2.2.1 COSMÉTICA NATURAL Y ORGÁNICA**

Los cosméticos naturales y orgánicos son populares en todo el mundo y América Latina no es la excepción. Cada vez más personas buscan productos de belleza ecológicos y promueven un estilo de vida más saludable. La cosmética natural se basa en utilizar ingredientes de origen natural y evitar el uso de productos químicos nocivos y sintéticos. La cosmética orgánica, por su parte, va



un paso más allá al asegurarse de que los ingredientes proceden de cultivos orgánicos certificados y están libres de pesticidas y fertilizantes sintéticos (Mouaz y Laala, 2021).

América Latina es rica en recursos naturales y siempre ha sido un lugar ideal para desarrollar cosméticos naturales y orgánicos. La región cuenta con una variedad de plantas e ingredientes naturales que se utilizan para elaborar estos productos. El aceite de argán, la rosa mosqueta, el aloe vera, el aguacate, el cacao, el aceite de coco y la miel son solo algunos ejemplos de ingredientes naturales ampliamente utilizados en la cosmética latinoamericana. Estos ingredientes tienen propiedades beneficiosas para la piel y el cabello y son conocidos por sus efectos hidratantes, regeneradores y antioxidantes (Rodríguez, 2022).

#### **2.2.1.1 Conceptos**

Es importante comprender los siguientes términos en el ámbito de la cosmética natural y ecológica.

#### **2.2.1.2 Materia prima**

Los ingredientes provienen de fuentes naturales como plantas, flores, frutas y aceites esenciales, evitando el uso de químicos sintéticos y aditivos dañinos. Al elegir cosméticos elaborados con ingredientes naturales, no solo podemos tratar nuestra piel y cabello con ingredientes más suaves y beneficiosos, sino que también podemos contribuir a proteger la biodiversidad y reducir nuestra huella ecológica (ECOCERT, sf).

#### **2.2.1.3 Componente de origen natural**

Al elegir estos ingredientes de fuentes naturales, podemos optar por productos más suaves y menos agresivos para nuestra piel, reduciendo el riesgo de posibles irritaciones o reacciones

adversas. Además, mediante el uso de ingredientes naturales, apoyamos prácticas sostenibles y respetuosas con la naturaleza (ECOCERT, sf).

#### **2.2.1.4 Orgánico, ecológico o biológicos**

Estos productos están hechos con ingredientes que no usan químicos o pesticidas dañinos, lo que significa que nuestra piel y nuestro cuerpo están expuestos a menos sustancias potencialmente dañinas y tóxicas; término utilizado para clasificar los productos que cumplen determinados requisitos según la normativa aplicable en cada país. Como ejemplo podemos citar: el término orgánico se usa en Estados Unidos y América Latina, ecológico en España y biológico en Francia (ECOCERT, sf).

#### **2.2.1.5 Ingrediente ecológico certificado**

Se obtiene de plantas o animales, a veces transformados, y se certifica cuando sigue las normas de producción de la agricultura ecológica (ECOCERT, sf).

#### **2.2.1.6 Agricultura sustentable, orgánica o biológica**

Se basa en el aprovechamiento óptimo de los recursos naturales sin utilizar productos químicos sintéticos o modificados genéticamente, obteniendo así productos orgánicos, preservando el equilibrio entre la tierra y el ambiente (ECOCERT, sf).

### **2.2.2 Cosmética natural**

La cosmética natural se refiere a productos que incluyen ingredientes derivados de plantas, como aceites vegetales y grasas extraídas de las semillas, frutos, corteza y otras partes de la planta. Estos ingredientes han sido científicamente probados y contienen principios activos de origen vegetal. La cosmética natural se centra en el uso de ingredientes naturales para garantizar la eficacia del producto (Hoang et al., 2021).

A medida que los consumidores de todo el mundo se preocupan cada vez más por su salud, bienestar y apariencia, el concepto de lo natural se ha convertido en la manzana de la discordia. Términos como natural, orgánico, sin conservantes artificiales y sin pruebas en animales están recibiendo mucha atención. Al mismo tiempo, los consumidores son cada vez más conscientes de que los productos etiquetados como naturales no son necesariamente productos naturales. Las etiquetas de productos para el cuidado del cuerpo pueden resultar confusas debido a su larga lista de ingredientes, a menudo incomprensibles (Gubitosa et al., 2019).

Las normas y reglamentos para los cosméticos naturales varían de un país a otro, ya que cada ubicación puede tener sus propias leyes y reglamentos para el etiquetado, la fabricación y la comercialización de cosméticos naturales. Las regulaciones más comunes para los cosméticos naturales incluyen:

- Reglamento Europeo de Cosméticos (Reglamento CE 1223/2009): Se aplica a la Unión Europea y establece reglas para la seguridad, etiquetado, composición y notificación de productos cosméticos.
- Estándar COSMOS: COSMOS es una organización internacional que establece estándares para los cosméticos naturales y orgánicos. Sus estándares cubren la selección de ingredientes, los procesos de fabricación, el envasado y el etiquetado.
- USDA Organic: en los Estados Unidos, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) proporciona un sello orgánico, que certifica que los cosméticos cumplen con ciertos estándares para ingredientes orgánicos.

- ECOCERT: Esta es una de las certificaciones más reconocidas para cosméticos naturales y orgánicos. Establece estándares para la producción y el abastecimiento de ingredientes y el respeto por el medio ambiente.
- Natrue: Natrue es otra certificación internacional que garantiza la autenticidad de la cosmética natural y ecológica (Fonseca, Correa & Chorilli, 2015)

### **2.2.3 Cosmética orgánica**

Los cosméticos orgánicos están hechos con ingredientes orgánicos certificados que provienen de fuentes responsables y respetuosas con la biodiversidad. Estos ingredientes incluyen extractos de plantas, aceites esenciales, mantecas y ceras vegetales, entre otros (ECOCERT, sf). Además, los cosméticos orgánicos evitan el uso de fragancias y colorantes sintéticos, parabenos, sulfatos y otros aditivos químicos controvertidos. Prioriza la pureza de sus ingredientes y se centra en la salud y el bienestar general de la piel (Zouza et al., 2023).

Organic Cosmetic Standard (Cosmos): Estándar privado europeo, desarrollado en conjunto con organismos de certificación, tales como: BDIH Entidad certificadora BIO (Alemania), Cosmebio (Francia), Ecocert Greenlife SAS (Francia), ICEA Organismo de certificación Ética y Ambiental (Italia), Soil Association (Reino Unido), son los encargados de determinar los requisitos mínimos comunes y la estandarización global de las reglas de certificación para cosméticos naturales y orgánicos (ECOCERT, sf).

### **2.2.4 Regulación de los cosméticos naturales y orgánicos**

Aunque no existe una regulación oficial para la cosmética orgánica y natural que determine las sustancias permitidas en las formulaciones cosméticas o la relación entre los ingredientes naturales y orgánicos, diferentes organismos privados de certificación alrededor del mundo han

establecido sus propios estándares para garantizar toda la autenticidad y origen del producto descrito (Barros y Barros, 2020). Los requisitos y organismos encargados de supervisar estos productos cosméticos varían según el área geográfica en la que se comercialicen los productos.

#### **2.2.4.1 América del Norte**

En Estados Unidos no existe una regulación específica para los productos cosméticos orgánicos, lo que ha llevado a las empresas del sector a adoptar los estándares establecidos para la industria alimentaria. El Programa Nacional Orgánico (NOP, sigla en inglés) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, sigla en inglés) ha establecido criterios que permiten el uso del sello del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en el etiquetado de los productos, siempre que al menos el 95% de sus ingredientes provengan de agricultura orgánica. En caso de que el porcentaje sea menor, no se permite utilizar la denominación el sello en el empaque (Wallack, 2019). Al elegir productos cosméticos certificados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, sigla en inglés), nos permite saber que los consumidores pueden estar seguros de que están eligiendo productos que han sido producidos bajo estrictas regulaciones orgánicas y que cumplen con ciertos estándares de sustentabilidad y respeto por el medio ambiente (Ayaque Cruz, sf).

En relación con el término "natural", la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, sigla en inglés) no ha establecido regulaciones específicas para su uso en productos cosméticos. Por lo tanto, los productos que se promocionan como "completamente naturales" o "derivados de plantas" pueden contener otros ingredientes adicionales.

Además del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, sigla en inglés) la Fundación Nacional de Ciencia (NSF, sigla en inglés) es otro organismo de certificación

importante en América del Norte. Esta organización emite certificaciones para productos con menor contenido de materia orgánica o para empresas que optan por no certificar sus productos bajo el sello del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, sigla en inglés) (Wallack, 2019).

#### **2.2.4.2 Unión Europea**

En la Unión Europea existe una legislación claramente definida y regulada para los alimentos etiquetados como “orgánicos, ecológicos y orgánicos”, que se producen sin el uso de productos químicos en todas las etapas de su elaboración. Sin embargo, no existe una regulación europea oficial en el campo de los productos cosméticos que defina, entre otras cosas, los requisitos para las sustancias permitidas y prohibidas, la proporción de ingredientes naturales y biológicos y las normas de etiquetado (Wallack, 2019).

Ante la ausencia de una legislación específica, los fabricantes de cosméticos y materias primas se someten a los criterios de empresas privadas de certificación para garantizar la autenticidad y calidad natural y/o orgánica de sus productos.

En Europa se han realizado importantes avances en el campo de la cosmética ecológica y natural a través de la armonización de criterios de certificación entre diferentes organismos. Como resultado, se estableció un estándar europeo denominado COSMOS (marca registrada), creado por representantes de los principales organismos de certificación europeos (Wallack, 2019). El objetivo de Organic Cosmetic Standard (COSMOS) es establecer requisitos y definiciones comunes para los cosméticos orgánicos y/o naturales, evitando así confusiones tanto para los consumidores como para la industria cosmética en general.

### 2.2.4.3 Latinoamérica

En la región de Latinoamérica, aún no se han establecido normas específicas para la certificación de cosméticos orgánicos. Sin embargo, el Instituto Biodinámica (IBD, siglas en inglés), una de las principales entidades certificadoras de América Latina con sede en Brasil, ha desarrollado su propia normativa para el mercado de los países pertenecientes al Mercosur. Según esta certificadora, su normativa se basa en los estándares más avanzados a nivel internacional para la certificación de cosméticos orgánicos (Wallack, 2019).

La certificadora del Instituto Biodinámica (IBD, siglas en inglés) ha sido realizada por muchos fabricantes que solo utilizan un 95% de ingredientes orgánicos en sus productos. Si el producto contiene entre 70% y 95% de los ingredientes orgánicos, debe estar certificado con el producto EcoSocial. Para otros productos que utilicen menos del 70% de ingredientes orgánicos, puede utilizar los “Ingredientes Naturales” y certificarse con el sello “Integra” (Wallack, 2019)

En Ecuador, la normativa para cosméticos está regulada principalmente por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN, siglas en inglés). Los principales requisitos y reglamentos aplicables incluyen:

- Etiquetado: Los productos cosméticos deben cumplir con los requisitos de etiquetado del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN, siglas en inglés). Esto incluye la información obligatoria sobre los ingredientes utilizados en el producto, así como las advertencias y precauciones para un uso adecuado.

- Registro de Higiene: Todos los productos cosméticos deben obtener un registro de higiene emitido por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia de Higiene (ARCSA, siglas en inglés) para poder ser comercializados en el Ecuador.

- **Buenas Prácticas de Manufactura:** Los fabricantes de productos cosméticos debían seguir las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM, siglas en inglés) establecidas por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN, siglas en inglés) para garantizar la calidad y seguridad de los productos.

- **Restricciones de Ingredientes:** El INEN cuenta con una lista de ingredientes restringidos o prohibidos para su uso en productos cosméticos para proteger la salud del consumidor (Morel et al., 2023).

### **2.2.5 Conservantes cosméticos**

Los conservantes se agregan a las formulaciones cosméticas para evitar el crecimiento microbiano durante el proceso de producción, el empaque, el almacenamiento y durante el uso por parte del consumidor. Para Wang et al., (2019) las empresas que fabrican productos cosméticos utilizan métodos de conservación aprobados para mantener la calidad del producto y evitar el crecimiento y deterioro de microorganismos. El sistema conservante utilizado debe ser eficaz contra una amplia gama de microorganismos y compatible con los ingredientes presentes en el producto. Además, debe permanecer estable durante la vida útil y uso recomendado del producto. Para lograr estos objetivos, se emplea una combinación de conservantes y técnicas de formulación para lograr un amplio espectro de actividad y reducir la concentración requerida de cada ingrediente activo.

### **2.2.6 Selección de conservantes**

Para poder seleccionar un conservante es crucial conocer el tipo de formulación que se vaya a desarrollar, y de esta manera elegir el tipo de conservante adecuado para el producto



cosmético. No es posible establecer "reglas" para determinar el conservante ideal. Sin embargo, un conservante debe tener sobre todo las siguientes propiedades:

- Presenta una amplia capacidad de actividad antimicrobiana.
- No genera una reacción de sensibilización a la concentración empleada.
- Tiene una estructura química conocida
- Mantiene su estabilidad bajo condiciones extremas de pH y temperatura.
- Es compatible con los ingredientes de la formulación y envasado.
- No se deben modificar las propiedades organolépticas (color y olor) del cosmético en el que se incorpora.
- Que tenga un precio razonable (Dreno et al., 2019).

La Comunidad Andina de Naciones (CAN, sigla en inglés), de la cual el Ecuador es miembro, adopta como normas supranacionales las que se determinen como Decisiones o Reglamentos dentro de esta organización. En este contexto se ha establecido la Resolución 1482, que demuestra que los productos cosméticos que cumplan con ciertas condiciones establecidas se presumirán libres de contaminación microbiológica (Segura Diaz, 2023).

**Tabla 1.**

Condiciones que establecen que el cosmético esté libre de contaminación microbiológica

Indicador	Limite
Actividad del agua	$\leq 0,75$
pH acido	$\leq 3$
pH alcalino	$\geq 10$
Soluciones hidroalcoholicas	$\geq 20\%$
Producto de base solvente	Sin limite
Producto oxidantes	Sin limite
Clorhidrato de aluminio y sales relacionadas	15% a 25%

Fuente: (Segura Diaz, 2023)

## Tipos de conservantes

Para prevenir el crecimiento microbiano, los conservantes son sustancias que se agregan con frecuencia a los cosméticos con el propósito principal de inhibir el desarrollo de microorganismos. La evidencia científica de los posibles efectos nocivos que algunos conservantes podrían tener sobre la salud de los consumidores ha hecho que aumenten las restricciones por parte de diversas normativas internacionales. Por ejemplo, la familia más extendida de conservantes, los parabenos, ha sido revisada una y otra vez en el Anexo II del Reglamento de la Unión Europea (UE, sigla en inglés) N° 681/2019, y el uso de algunos de ellos (por ejemplo, isopropil-, isobutil-, fenil-, bencil- y pentilparabeno) ha prohibido en productos cosméticos (Comisión Europea, 2019).

### 2.2.6.1 Conservantes antimicrobianos

La gran variedad de estos ingredientes de tipo antimicrobiano se puede organizar en diferentes categorías químicas, según la estructura molecular y los grupos funcionales más característicos. La tabla 2 muestra algunos conservantes representativos de cada clase.

**Tabla 2.**  
Conservantes más utilizados en formulaciones

Clase	Conservantes
Alcoholes	Alcohol bencílico
	Alcohol 2,4-diclorobencílico
Derivados fenólicos	Fenoxietanol
	Triclosan
Ácidos	Ácido dehidroacético y sus sales
	Acido benzoico y sus sales
	Ácido sorbico y sus sales
	Acido p-hidroxibenzoico sus sales y ésteres
Donadores de formaldehído	Diazolidinil urea
	Imidazolinil urea
	DMDM hidantoina
Otros	Yodopropinilbutilcarbamato
	Clorometilisotiazolinona + metilisotiazolinona

Fuente: (Alvarez, Llupart & Garcia, 2018)

### 2.2.6.2 Conservantes de ácidos orgánicos y sus sales

Estos son ingredientes dependientes del pH, ya que muestran actividad solo en forma ácida, aunque generalmente se agregan a las formulaciones como sales para facilitar la incorporación.

Sin embargo, la sal en sí misma no muestra actividad antimicrobiana hasta que se baja el pH para liberar la forma de ácido libre. Algunos ácidos orgánicos típicos usados como conservantes son el ácido benzoico y su sal, benzoato de sodio, ácido dehidroacético y dehidroacetato de sodio, ácido fórmico, ácido propiónico y sus sales, ácido sórbico y sorbato de potasio, ácido salicílico y ácido undecilénico (Alvarez, Llompart & Garcia, 2018).

### **2.2.6.3 Alcoholes y Derivados**

Los conservantes con grupos hidroxilo ( $-OH$ ) también pueden tener propiedades ácidas, aunque en menor medida que los conservantes de ácidos orgánicos. Este grupo de conservantes incluye compuestos tales como alcohol bencílico, isopropil metilfenol, fenoxietanol, fenoxiisopropanol y ofenilfenol y su sal de sodio.

Particularmente relevantes son los ésteres alquílicos del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB, también conocidos como parabenos). Los más comunes son los ésteres metílico, etílico, propílico, isopropílico, butílico, isobutil y bencílico, aunque las formas iso y bencílico están actualmente prohibidas por el Reglamento de la Unión Europea (UE, sigla en inglés). Estos compuestos exhiben propiedades antifúngicas y actividad contra bacterias Gramnegativas (Alvarez, Llompart & Garcia, 2018).

### **2.2.6.4 Isotiazolinonas**

Los biocidas de tipo isotiazolinona son un grupo de conservantes eficaces que se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones y productos industriales o domésticos de base acuosa. Estos compuestos son derivados heterocíclicos de 2H-isotiazolin-3-ona con un resto de azufre activo capaz de oxidar residuos que contienen tiol, ofreciendo así una poderosa actividad de conservación contra un amplio espectro de hongos y bacterias (Alvarez, Llompart & Garcia, 2018).

### **2.2.6.5 Conservantes Halogenados**

Los conservantes halogenados exhiben una actividad más fuerte, particularmente contra los hongos. Este grupo incluye compuestos como 5-bromo-5-nitro-1,3 dioxano (bronidox) y 2-bromo 2-nitropropano-1,3-diol (bronopol). Estos pueden descomponerse, liberando agentes nitrosantes que pueden reaccionar con aminas alifáticas como dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA) y monoetanolamina (MEA), que comúnmente se agregan a los champús y otros productos de higiene personal.

Esta categoría también comprende otros conservantes halogenados como 2-cloroacetamida, p-clorom-cresol, clorobutanol, cloroxilenol, clorfenesina, alcohol diclorobencílico, yodopropinil butilcarbamato y metildibromo glutaronitrilo. A pesar de su potente actividad antimicrobiana, muchos de estos compuestos son poco solubles en agua, lo que dificulta su incorporación en la matriz cosmética (Alvarez, Llompart & Garcia, 2018).

### **2.2.7 Conservante natural**

Según Tayupanta et al., (2020) en los últimos años, la industria cosmética ha experimentado grandes cambios debido a la creciente demanda de productos naturales libres de ingredientes nocivos. En este contexto, los conservantes naturales están ganando popularidad en la cosmética ya que mantienen la calidad y seguridad de los productos sin comprometer la salud de nuestra piel.

Los cambios en las propiedades organolépticas del producto, tales como cambios de color, olor y textura, se mencionan como consecuencias visibles de contaminación. También se puede observar una turbidez del producto, indicando la presencia de sedimento o materia en suspensión. Además, se observa que la separación de fases puede ocurrir en emulsiones, que son mezclas de

sustancias que normalmente no se mezclan, lo que indica un problema de contaminación. En relación con el control microbiológico del producto final, se señala que se debe asegurar que no existen en él microorganismos patógenos. Algunos de estos microorganismos patógenos se mencionan específicamente, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Escherichia coli*.

La contaminación microbiana de los productos cosméticos es una preocupación para la industria y las agencias reguladoras. Además, constituye una amenaza para la seguridad del consumidor, así como para la imagen comercial de los cosméticos. Según Mondejar et al., 2022, la búsqueda de la seguridad es de suma importancia, ya que los cosméticos se utilizan por razones estéticas y deben tener un bajo riesgo para la salud del consumidor. Debido a esta cuestión primordial de la seguridad, ahora se están centrando muchos esfuerzos en enfoques más nuevos para la conservación cosmética, como el uso de productos naturales.

Los aceites esenciales tienen excelentes propiedades antimicrobianas; por lo tanto, podrían ser alternativas rentables y seguras a los conservantes cosméticos químicos sintéticos. Los aceites esenciales se refieren a los líquidos sutiles, aromáticos y volátiles extraídos de varias partes de las plantas, como flores, semillas, hojas, tallos, cortezas y raíces de hierbas, arbustos y árboles a través de la destilación (Nowak et al., 2021).

Orus et al., (2015) proponen el uso de los aceites los aceites *Artemisia afra*, *L. officinalis* y *R. officinalis* como conservantes naturales de preparaciones cosméticas, solos o en combinación con otros conservantes. Se encontró que el alcanfor, el 1,8-cineol y el pineno eran los compuestos mayoritarios más frecuentes de estos aceites. Sin embargo, algunos compuestos importantes aparecieron únicamente en un aceite en particular. Estos fueron: 3-tujanona, como componente

principal del aceite de *A. afra*; p-mentha-8-ene-2-ol, como componente principal de *P. incana*; y 2-bornanol, como componente principal del aceite de *L. officinalis*; como resultados demostraron una notable reducción de crecimiento microbiano en la cepas *Escherichia coli* ATCC 35218; *Estafilococo aureus* ATCC 2592; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 10231; *Aspergillus niger* ATCC 16404. El uso de aceites esenciales en la producción de cosméticos y productos relacionados puede tener varias ventajas, entre ellas ofrecer un agradable aroma, asegurando protección contra microorganismos y, en algunos casos, potenciando las propiedades dermatocósméticas y conservación del producto final.

### **2.2.8 Conservante sintético**

Según Almoughrabie (2020), los conservantes sintéticos, como los parabenos, el fenoxietanol y la imidazolidinil urea, se han utilizado durante décadas por sus múltiples beneficios. Estos conservantes son conocidos por su asequibilidad, actividad antibacteriana y fúngica de amplio espectro, compatibilidad con otros ingredientes y la capacidad de no interferir con la fragancia, el color u otros aspectos de una formulación particular. Sin embargo, aunque los conservantes sintéticos comunes pueden prolongar la vida útil del producto y mantenerlos libres de microbios han adquirido una reputación negativa entre los consumidores y su uso se ha vuelto más controvertido en los últimos años (Bentabet et al., 2021)

La popularidad mundial de los parabenos como conservantes se debe principalmente a su eficacia y actividad contra un amplio espectro de bacterias y hongos. Pueden inhibir el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras Gram positivas (+) y Gram negativas (-) en productos conservados. El contenido máximo de parabenos en los cosméticos está regulado por la Unión Europea, el Comité Científico sobre Seguridad del Consumidor (SCCS, sigla en inglés) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, sigla en inglés). El uso de parabenos en una

concentración inferior al 0,4 % para un solo compuesto y al 0,8 % para una mezcla se considera seguro. Sin embargo, según el Reglamento de la Comisión n.º 1004/2014, la concentración máxima de propilparabeno y butilparabeno no puede superar el 0,14 % para un solo compuesto y el 0,8 % para una mezcla con otros parabenos (Nowak et al., 2021).

## **2.2.9 CONSERVANTES NATURALES**

### **2.2.9.1 *Thymus vulgaris* L (tomillo)**

*Thymus vulgaris*, comúnmente conocido como "tomillo", se ha utilizado durante muchos siglos por sus propiedades aromatizantes, culinarias y medicinales. El género *thymus* es un grupo de plantas aromáticas, perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Se conocen 214 especies y 36 subespecies divididas en ocho secciones: *Micantes*, *Mastichina*, *Piperella*, *Teucrioides*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *Hyphodromi* y *Serpyllum*. *T. vulgaris* L. y *T. zygis* L. pertenecen al área del Mediterráneo occidental. *T. vulgaris* es nativa del sur de Europa, desde España hasta Italia (Halat et al., 2022).

Es un subarbusto perenne de hoja perenne con un tallo leñoso generalmente erguido. Las hojas están dispuestas en verticilos alrededor del tallo, siempre verdes y simples. Tienen forma ovalada, textura fina y un olor agradable. Constituyen principalmente la parte comestible para los humanos. Las flores son de tipo cima, de color púrpura y blanco, bisexuales y bilabiales con un cáliz glandular piloso que desprende un agradable aroma. Su floración se produce durante la primavera y el verano. *T. vulgaris* tiene una tasa de crecimiento moderada. En la madurez, alcanza de 0,5 a 1 m de altura y se extiende de 0,5 a 1 m y a veces 15 m en el suelo como una cubierta verde. Tarda de 2 a 5 años en alcanzar su altura máxima. Puede tolerar heladas y sequías y ambientes pobres y salados. Vive en suelos francos y arenosos, teniendo un pH neutro y alcalino. En el Líbano, *T. vulgaris* crece en grupos sobre rocas calcáreas. No necesita mucha agua, pero



requiere pleno sol. No tiene potencial invasivo y puede vivir un máximo de 25 años. *T. vulgaris* es el más afectado por la pudrición de la raíz. Finalmente, el tomillo se puede propagar a partir de semillas, esquejes o por estratificación (Halat et al., 2022).

### 2.2.9.2 Taxonomía

**Tabla 3.**  
Taxonomía de *Thymus vulgaris* L.

Nombre Científico	<i>Thymus vulgaris</i> L.
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Thymus
Especie	Vulgaris
Abreviación autorizada taxonomía	L.

**Fuente** (Halat et al., 2022).

### 2.2.9.3 Composición química

Una amplia variedad de compuestos químicos, así como aceites esenciales constituyen la composición principal de *Thymus vulgaris* (tomillo) que varía según el clima y la zona geográfica. Las investigaciones han informado que *Thymus vulgaris* (tomillo) contiene 56,53 % de monoterpenos, 28,69 % de hidrocarburos monoterpénicos, 5,04 % de hidrocarburos sesquiterpénicos y 1,84 % de sesquiterpenos oxigenados. Es rico en muchos flavonoides y

antioxidantes fenólicos como zeaxantina, luteína, pigenina, naringenina, luteolina y timonina (Halat et al., 2022).

*Thymus vulgaris* (tomillo) fresco tiene uno de los niveles más altos de antioxidantes y es rico en minerales y vitaminas que son esenciales para una salud óptima. En las hojas se concentran potasio, hierro, calcio, manganeso, magnesio y selenio, y el principal constituyente del aceite extraído es el timol. El timol es un componente fenólico importante, principalmente responsable de la actividad antioxidante del tomillo. El tallo florecido contiene derivados flavonoides como el apigenol y el luteolol, ácidos fenólicos como el cafeico y el rosmarínico, y taninos (Halat et al., 2022).

#### **2.2.9.4 Aceite esencial**

*T. vulgaris* contiene al menos seis quimiotipos de aceites esenciales: timol como componente principal, carvacrol, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, linalool,  $\beta$ -mirceno y terpinen-4-ol. Hoy en día, los aceites de plantas y extractos de *T. vulgaris*, así como el carvacrol, se utilizan con diversos fines, por ejemplo, como antisépticos médicos y agentes cicatrizantes de heridas, conservantes alimentarios y aromatizantes. En este sentido, el timol es un aditivo alimentario generalmente reconocido como seguro según la *Food and Drug Administration*. La mayoría de estas propiedades están relacionadas con su eficacia contra una amplia gama de bacterias, mohos, hongos y lombrices intestinales, así como a sus propiedades antioxidantes (Salehi et al., 2018).

#### **2.2.9.5 Actividad antimicrobiana y antifúngica**

Se ha observado eficacia antibacteriana contra varias especies bacterianas, entre ellas *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*. Se ha descrito actividad contra bacterias cariogénicas y periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis*,

*Selenomonas artemidis*, *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans*, posiblemente relacionada con la perforación de la membrana y el rápido flujo de componentes intracelulares. El timol ha mostrado actividad contra algunos hongos y levaduras, incluidos *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*, y suprime el crecimiento fúngico y la síntesis de aflatoxinas a dosis de 250 ppm in vitro (Basch et al., 2004).

#### **2.2.9.6 Salvia Officinalis L (salvia)**

*Salvia Officinalis L* (salvia) es una planta aromática de la familia *Lamiaceae* que se puede encontrar en todo el mundo. En total, 900 especies se distribuyen en todo el mundo, pero las especies comunes incluyen *S. officinalis* (salvia común), *S. miltiorrhiza* (salvia china), *S. lavandulaefolia* (salvia española), *S. fruticosa* (salvia griega), *S. sclarea* (clary sage) y *S. hispanica* (chía). Es una de las hierbas más populares utilizadas en la medicina tradicional, especialmente en la cultura mediterránea. Desde la Antigua Grecia y Roma hasta nuestros días. Las especies se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de una variedad de problemas que incluyen trastornos digestivos y circulatorios, bronquitis, tos, asma, angina, inflamación de la boca y la garganta, depresión y sudoración excesiva (Dinel et al., 2020)

Es una planta perenne aromática que puede alcanzar una altura de 70 cm. Tallos erectos y pubescentes. Pecíolos oblongos y ovados, menos lanceolados, con nervaduras distintas. Las flores de color blanco púrpura están agrupadas, la corola mide hasta 3 cm de largo, el labio superior es casi recto, el cáliz es más pequeño que la corola, con reflejos púrpura (Pizani et al., 2022).

#### **2.2.9.7 Taxonomía**

##### **Tabla 4.**

Taxonomía de *Salvia officinalis L.*

Nombre Científico	<i>Salvia officinalis</i> L.	
Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Orden	Lamiales	
Familia	Lamiaceae	
Género	Salvia	
Especie	officinalis	
Abreviación taxonomía	autorizada	L.

Fuente;(Schmiederer & Novak, 2020).

### 2.2.9.8 Composición química

Algunas investigaciones fitoquímicas de la salvia revelaron un gran número de compuestos bioactivos, entre los cuales los más importantes son el aceite esencial y los compuestos polifenólicos. Se han descrito diferentes quimiotipos para la salvia: alcanfor  $\alpha$  -tujona, 1,8-cineol, tujona; alcanfor  $\alpha$  -tujona,  $\beta$  -tujona, 1,8-cineol;  $\beta$  -tujona alcanfor, 1,8-cineol,  $\beta$  -tujona; 1,8-cineol, alcanfor -tujona,  $\beta$  -tujona;  $\alpha$  -tujona, alcanfor  $\beta$  -tujona 1,8-cineol (Damyanova et al., 2016).

### 2.2.9.9 Aceite esencial

El aceite esencial de *S. officinalis* contiene terpenos importantes como manool, viridiflorol, eucaliptol, borneol y tujona. A su vez, carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, flavonoides, polisacáridos, ácido tánico, ácido oleico, ácido ursónico, ácido ursólico, ácido fumárico, ácido clorogénico, ácido cafeico y sustancias estrogénicas ya han sido identificados en las hojas de *S. officinalis* (Tundis et al., 2020).

Estudios anteriores han revelado que los principales componentes del aceite esencial de *Salvia Officinalis L* (salvia) son  $\alpha$ -tujona, 1,8-cineol,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -tujona, alcanfor y borneol. Poseen una buena actividad antimicrobiana con respecto a bacterias, levaduras y hongos implicados en el deterioro de los alimentos y cosméticos (Damyanova et al., 2016). También se usa para el tratamiento de una variedad de enfermedades y se ha demostrado que posee propiedades citotóxicas, antimutagénicas, efectos, antioxidantes y neuroprotectores. (Tundis et al., 2020).

#### **2.2.9.10 Actividad antimicrobiana y antifúngica**

El aceite esencial de *Salvia Officinalis L* (salvia) tiene un amplio efecto antibacteriano que se debe no solo a un mecanismo de ruta especial, sino también a una serie de actividades en la superficie celular y en el citoplasma. Un pequeño número de autores han descrito cómo la *Salvia Officinalis L* (salvia) afecta tanto a las bacterias Gram-positivas como a las Gram-negativas. Entre los estudios realizados se destaca la actividad antimicrobiana contra *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, cepas patógenas de *Escherichia coli* y algunos hongos entre ellos *C. albicans*.

*Salvia officinalis* rompe la membrana celular y altera su permeabilidad, provocando la liberación de varios componentes citoplasmáticos, como compuestos macromoleculares, ATP y ADN (Gál et al., 2023).

#### **2.2.10 FORMAS COSMÉTICAS**

Según Abelan et al., (2022) las formulaciones cosméticas se clasifican en función de su estado físico, y se pueden identificar seis formulas cosméticas:

- a) Disoluciones: Son sistemas líquidos homogéneos, monofásicos, resultantes de la dispersión molecular de una o más componentes en otro, denominados solutos, y este

último como solvente. Esto requiere cierta afinidad dependiendo de las características de ambos componentes.

- b) Geles: Los geles son soluciones solidas monofásicas que se caracterizan por su rigidez elástica permanente y su alto contenido en líquidos hidrofílicos o lipofílicos, lo que les confiere un carácter blando y fácilmente deformable pero no derramable, generalmente son transparentes.
- c) Suspensiones: Son sistemas heterogéneos bifásicos en los que una fase externa monofásica líquida o semilíquida dispersa una fase interna sólida e insoluble, caracterizada por su pequeño tamaño de partícula que influye en la efectividad cosmética.
- d) Emulsiones: Las emulsiones son sistemas heterogéneos con dos (simples) o más fases líquidas (múltiples). Se componen de una fase hidrófila o lipófila continua y al menos una segunda fase dispersa dentro de la primera en forma de partículas extremadamente finas.
- e) Polvos: Los polvos son sustancias sólidas, orgánicas o inorgánicas reducidas a partículas diminutas. Cuando se someten a presión, los polvos se pueden compactar, lo que permite una estructura permanente que facilita la aplicación precisa en lugares específicos y en cantidades predeterminadas.
- f) Pastas: Las pastas son formas bifásicas semisólidas que consisten en un sistema monofásico líquido en el que se dispersa un sólido insoluble, como polvos micronizados. Dependiendo de la cantidad, puede ser una pasta oleosa o acuosa.

### **2.2.11 MÉTODO DE CHALLENGE TEST**

La prueba de eficacia de conservantes, prueba de Challenge o conocida también como PET, consiste en un procedimiento para determinar si un producto alimenticio, cosmético, farmacéutico o de otro tipo formulado se conserva adecuadamente para evitar la contaminación de productos

antes de su elaboración y durante su uso por parte del consumidor. Aunque las propiedades químicas, físicas y microbiológicas de un conservante son claramente importantes, no proporcionan información suficiente para predecir si un producto formulado se conservará adecuadamente (Russell, 2003).

Hay varios factores que influyen en la actividad de un conservante. Entre ellos se encuentran su concentración, el pH, la temperatura, el tipo, la naturaleza, el estado de los microorganismos, la presencia o ausencia de material orgánico sucio o de otras sustancias que interfieran y las posibles interacciones de un conservante con los envases y cierres. Estos aspectos deben tenerse en cuenta a la hora de elegir un agente antimicrobiano, como conservante, como parte integrante del desarrollo temprano de una formulación cosmética o farmacéutica.

En esencia, es un procedimiento en el que un producto es desafiado por la exposición a tipos específicos de microorganismos para determinar si se conserva adecuadamente. Se necesita una evaluación de la eficacia del conservante durante la vida útil prevista de ese producto. Los organismos de prueba deben ser representativos de los que probablemente se produzcan como contaminantes durante el uso y deben consistir en bacterias Grampositivas y Gramnegativas, mohos y levaduras. Las pruebas de provocación deben realizarse al principio, durante y al final de la vida útil del producto para asegurar la calidad artículo fabricado junto con el bienestar del consumidor (Russell, 2003).

### 3 CAPÍTULO III

#### 3.1 MARCO METODOLÓGICO

##### 3.1.1 Diseño de investigación

El diseño de investigación es de tipo experimental, debido a que se manipuló de dos variables para determinar la eficacia de los aceites esenciales *Thymus vulgaris L* (Tomillo) y *Salvia officinalis L* (salvia) como conservantes naturales, las diferentes concentraciones (0,5% y 1,5%) de los aceites corresponden a la variable independiente y la observación que establece la variable dependiente (logaritmo de crecimiento bacteriano).

##### 3.1.2 Unidad experimental

Se realiza un estudio longitudinal como unidad experimental por intervalos de tiempo (0,7,14,28). Se realiza un estudio longitudinal como unidad experimental por intervalos de tiempo (0,7,14,28). La cual consiste en la formulación de 7 shampoos en las que se les agrega los aceites esenciales de *Salvia Officinalis*, *Thymus vulgaris* y un conservante aprobado cosméticamente en diferentes concentraciones, haciendo siembras con inoculación de las cepas de tipo ATCC en cajas Petri por triplicado para realizar el conteo de microorganismo en los tiempos establecidos y finalmente determinar su eficacia como conservantes.

##### 3.1.3 Población y muestra

La población que se empleó son formulaciones cosméticas en diferentes concentraciones 0,5% y 1,5% de aceites esenciales como es el *Thymus vulgaris L* (tomillo) y la *Salvia officinalis* (salvia). Las muestras que se utilizaron son los inóculos (*E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231 y *A. brasiliensis* ATCC 16404).

##### 3.1.4 Variables



Las variables independientes son las concentraciones de los aceites esenciales como es el *Thymus vulgaris* L (tomillo) y *Salvia officinalis* L (salvia) y las variables dependientes es el logaritmo del crecimiento bacteriano de las diferentes cepas.

### **3.1.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Se utilizaron diversas herramientas para recolectar datos tales como: artículos científicos, bases de datos, libros, etc. De esta manera, se sintetizan los conocimientos necesarios sobre el tema presentado. Por otro lado, para la parte experimental, se utiliza la técnica de observación y conteo de colonias bacterianas y fúngicas mediante un contador de colonias digital, como evidencias se tomaron fotografías, de manera de recolectar los resultados obtenidos para el análisis estadístico pertinente.

### **3.1.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Para los datos obtenidos, se utilizó gráficos y tablas en el programa Excel para facilitar la interpretación de los resultados. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas denominas métodos de Kruskal-Wallis para análisis de varianza (ANOVA) y el método de Holm-Dunn para realizar comparaciones múltiples en software Rstudio.

### **3.1.7 Procedimientos experimentales**

El proyecto se desarrolló en los laboratorios de Ciencias de la Vida, de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca, Campus el Vecino, que contó con dos fases experimentales, la primera fase comprende la formulación de un cosmético (shampoo), por otro lado, la segunda fase contempló la evaluación de la efectividad de los aceites esenciales como posibles conservantes mediante la prueba de desafío (Challenge test) de acuerdo a las normativas existentes.

## **3.2 FASE 1. FORMULACIÓN DEL PRODUCTO COSMÉTICO**

Para el desarrollo de la formulación cosmética se elaboró un shampoo debido a que es una de las formulaciones más utilizadas y de uso externo, para el desarrollo de las formulaciones se basaron en investigaciones previas que se consideraban los parámetros del COSING, e indican los límites de restricción para el uso de aceites esenciales de *Salvia officinalis* (salvia) y *Thymus vulgaris* (tomillo) para incorporarla dentro de una formulación cosmética. Sin embargo, se debe considerar las recomendaciones establecidas según el Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 093 “Productos Cosméticos”, que nos indican que los porcentajes recomendados para el uso de conservantes debe estar en bajas concentraciones y el rango que se establece es de 0.4% al 2.5% aunque estas van a variar de acuerdo a las regulaciones de cada país.

En el siguiente trabajo se formuló un shampoo corriente de fácil remoción homogénea y cosméticamente aceptable por el consumidor, en el que se investigó cada uno de sus ingredientes para conocer acerca de sus restricciones en la base de datos COSING. Las concentraciones ideales fueron definidas tomando en consideración el rango propuesto por la INEN 093 y utilizando valores próximos entre los mínimos y máximos para determinar su eficacia.

**Tabla 5.**  
Información del aceite esencial *Thymus vulgaris* (tomillo)

Clasificación	Aceite esencial
INCI NAME	<i>Thymus vulgaris oil</i>
Función	Conservante, agente de enmascaramiento y perfumante

Fuente: INEN 093 “Productos Cosméticos”

**Tabla 6.**  
**Información del aceite esencial *Salvia officinalis* (salvia)**

Clasificación	Aceite esencial
INCI NAME	<i>Salvia officinalis oil</i>
	Conservante, agente de enmascaramiento y
Función	vigorizante

**Fuente:** INEN 093 “Productos Cosméticos”

### 3.2.1.1 Metodología

Para el desarrollo de la formulación cosmética se utilizó un proceso mixto, es decir se lo realizo en frío y caliente debido a que algunos ingredientes necesitaban calor para mezclarse (Espadero, 2017).

Kumar & Mali (2010) han demostrado que el pH de un shampoo es muy importante para mejorar y fortalecer la calidad del cabello, reducir la irritación de los ojos y estabilizar el equilibrio ecológico del cuero cabelludo. La tendencia actual de promover shampoo de bajo pH es una forma de minimizar el daño a tu cabello. La acidez suave previene la hinchazón y promueve el endurecimiento de las escamas, dando como resultado brillo. El rango establecido de pH es de 5,5 a 7. Para tomar la lectura del pH se lo hizo mediante el potenciómetro con sensor de pH, se sumergió el electrodo en la formulación sin tocar las paredes o el fondo.

La viscosidad de un shampoo juega un papel importante en la determinación de la estabilidad de su vida útil, la fluidez cuando se retira del paquete y cuando se aplica al cabello, y la consistencia del producto en el paquete (Malpani et al., 2020). Para determinar la viscosidad del shampoo se usó el viscosímetro rotacional, se colocó el número de husillo TR9, se ajustó la velocidad de rotación necesaria (10 rpm) y finalmente se realizó a temperatura ambiente.

En cuanto a los ingredientes empleados ninguno presentaba restricción para su posible aplicación. Los ingredientes utilizados para el shampoo se presentan en la siguiente Tabla 7:

**Tabla 7.**  
Formulación general del shampoo a desarrollarse

Componente	Nomenclatura INCI	Función	Porcentaje (%)	Restricciones
		Controlador		
Glicerina	<i>Glycerin</i>	de viscosidad/ Humectante	2%	s/r
Ácido cítrico	<i>Citric Acid</i>	Regulador de pH	0,30%	s/r
Cloruro de sodio	<i>Sodium Chloride</i>	Viscosante	2%	s/r
Cocamidopropil Betaína	<i>Cocamidopropylbetaine</i>	Tensoactivo/acrecentador de espuma	6%	s/r
Cocamide DEA	<i>Cocamide DEA</i>	Emulsionante	3%	s/r
Sodio lauril sulfato	<i>Sodium Laureth sulphate</i>	Espumante	13%	s/r
Agua	<i>Aqua</i>	Disolvente	c.s.p 100	s/r
Aceites esenciales	-	Conservante	Y1*	s/r

### **3.2.1.2 Procedimiento**

La formulación de shampoo se realizó a partir de cuatro etapas.

- Etapa 1, mezclo el sodio lauril sulfato (triturada) con agua destilada a 40 °C de manera suave sin formar espuma.
- Etapa 2, la glicerina, cocamidopropil betaína y cocamide DEA fueron calentados a 25 °C, de esta manera se vierte de una forma delicada la etapa 2 sobre la etapa 1.
- Etapa 3, el ácido cítrico y cloruro de sodio se añadió en la etapa 1 + etapa 2.
- Etapa 4, se colocó los conservantes naturales (aceites esenciales) en sus concentraciones a 0,5% y 1,5%. Se procedió a homogeneizar la formulación de shampoo en el equipo de agitación Shaker durante 30 min y dejar reposar 24 horas.

## **3.3 FASE 2. ENSAYO PARA EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS ACEITES ESENCIALES COMO CONSEVARNTES (Challenge Test)**

### **3.3.1 Estándar internacional ISO 11930:2019**

La norma ISO 11930:2019 trata sobre la evaluación de la protección antimicrobiana en productos cosméticos. Los métodos de análisis se describen en compendios y guías oficiales sobre el análisis microbiológico de medicamentos y cosméticos. Los métodos descritos en diversas farmacopeas (americana, brasileña, europea y japonesa) están dirigidos principalmente a productos farmacéuticos (ISO 11930, 2019).

La prueba se realizó contaminando el producto con microorganismos especificados en la norma internacional ISO 11930:2019, como se indica en la tabla 8. Todos estos microorganismos están certificados por la ATCC. Posteriormente, se evaluó la variación de la carga microbiana mediante el método de conteo de colonias y se cuenta el número de organismos viables después de los intervalos de tiempo predeterminados (0, 7, 14, 28 días) (ISO 11930, 2019).

**Tabla 8.**

Microorganismos ATCC establecidos en la norma ISO 11930:2019

Microorganismo	Cepa ATCC
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Escherichia coli</i>	8739
<i>Candida albicans</i>	10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404

**Fuente:** (ISO 11930, 2019)

Para la prueba Challenge se siguió el siguiente procedimiento:

- A. Activación de cepas liofilizadas ATCC.
- B. Preparación de los inóculos de cada cepa ATCC.
- C. Inoculación de muestras.
- D. Verificación de eficacia de conservantes a intervalos específicos según la norma ISO 11930:2019.
- E. Evaluación de resultados conteo de colonias (recuento en placa).

### 3.3.2 A. Activación de cepas liofilizadas ATCC

Cada cepa ATCC liofilizada se cultivó en placas de Petri con los medios adecuados: Agar tríptico de soya (TSA), Agar dextrosa Sabouraud (SDA), Agar papa dextrosa (PDA). Estas cepas se utilizaron como colonia madre a partir de la cual se inició la prueba de provocación. Para reactivar las cepas ATCC, los viales de perlas de cepa ATCC se descongelan a temperatura ambiente. El vial fue apretado en la tapa por la parte superior del *KWIK-STIK*<sup>TM</sup> para liberar el líquido humectante y liberar las bacterias.

Posteriormente, se empleó una resiembra de las cepas ATCC en placas de Petri con medios de cultivo específicos para cada microorganismo. Se incubaron las cajas Petri en la estufa en los tiempos indicados, como se establece en la tabla 9:

**Tabla 9.**  
Activación de cepas liofilizadas ATCC

Microorganismo	Cepa ATCC	Medio Selectivo	Temperatura (°C)	Tiempo
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	TSA	33 ± 2	24 a 48 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	TSA	33 ± 2	24 a 48 h
<i>Escherichia coli</i>	8739	TSA	33 ± 2	24 a 48 h
<i>Candida albicans</i>	10231	SDA	33 ± 2	24 a 48 h
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	PDA	23 ± 2	5 a 7 días

Elaborado por: Autoras

### 3.3.3 B. Preparación de los inóculos de cada cepa ATCC

La medición de la absorbancia se realizó con un espectrofotómetro, para preparar el inóculo microbiano estandarizado de la ATCC para la prueba de provocación, según lo recomendado por el Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antifúngica del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). En el método espectrofotométrico, el haz de luz transmitido a través de la suspensión de microorganismos está relacionado con la turbidez presente en la suspensión. Es un método estandarizado para el conteo de microorganismos (Siller et al., 2017).

Las condiciones enumeradas bibliográficamente establecen que la longitud de onda de 625 nm da una absorbancia de 0,08 a 0,11, que corresponde a 1-2x  $10^8$  UFC/mL en bacterias, y una longitud de onda de 530 nm da una absorbancia de 0,13 a 0,16 que corresponde a 1-5 x  $10^6$  UFC/mL en hongos y levaduras (Núñez et al., 2020).

Para Kragh et al., (2018) se utiliza un cultivo Overnight para la obtención de microorganismos en fase de crecimiento, el propósito de utilizar aquel cultivo es para asegurar que se obtengan colonias jóvenes de los diferentes microorganismos utilizados para la evaluación.

Se tomó una porción de colonias morfológicamente similares de cada cepa ATCC activada de cada placa de Petri y se incubó durante 18 horas a 37 °C en un tubo de ensayo que contiene 5 mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB). Luego se colocó en la centrifuga por 20 minutos a 3000 RPM, separando el sedimento, descartando el sobrenadante y utilizando la cantidad requerida de suero salino estéril, obteniendo así la densidad óptica determinada por la lectura espectrofotométrica a través del espectrofotómetro con las longitudes de onda y absorbancias detalladas para cada microorganismo. Posteriormente, se realizó la interpolación de los resultados



obtenidos para la determinación de la UFC/mL según las medidas obtenidas para bacterias y para hongos y levaduras.

Se realizaron diluciones adicionales del inóculo antes de la inoculación de los microorganismos, ya que la norma ISO 11930:2019 especifica que el inóculo en el tiempo cero debe tener una carga bacteriana de  $10^6$  UFC /mL para bacterias y  $10^5$  UFC /mL para hongos, utilizando solución salina estéril como diluyente.

- $10^6$  UFC/mL *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027
- $10^6$  UFC /mL *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- $10^6$  UFC /mL *Escherichia coli* ATCC 8739
- $10^5$  UFC /mL *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- $10^5$  UFC /mL *Candida albicans* ATCC 10231

#### **3.3.4 C. Inoculación de muestras**

De acuerdo con las muestras, se preparó el número adecuado de frascos, se agregó a cada uno 30 mL de la formulación del shampoo a ensayar y dispenseo 0,3 mL de inóculo de cada uno de los microorganismos ATCC (establecido por la norma ISO 11930:2019, correspondiente al 1% del tamaño de la muestra entregada), luego se etiquetaron. Finalmente, cada vial se homogenizo en el agitador durante 15 minutos para garantizar la homogeneización del inóculo. Los viales inoculados se mantuvieron entre 20 °C y 25 °C durante 28 días, lo que corresponde a la duración de Challenge test.

### 3.3.5 D. Verificación de eficacia de conservantes a intervalos específicos según la norma ISO 11930:2019.

Las técnicas de conteo de placas son sensibles, relativamente simples y ampliamente utilizadas para la enumeración de bacterias y otros microorganismos. El método habitual para contar las unidades formadoras de colonias es el siguiente: hacer diluciones seriadas 1/10 de una suspensión bacteriana o muestra de prueba y sembrar volúmenes medidos de varios para obtener colonias separadas (Valverde, 2019).

La siembra se puede realizar: a) por difusión o diseminación: en la superficie del medio ya gelificado y seco, en volúmenes de 0,1- 0,2 mL de las diluciones apropiadas, o b) en profundidad: incorporación del inóculo en un volumen de medio fundido mantenido a temperaturas compatibles con la viabilidad microbiana (alrededor de 45 °C), que luego se vierte en una placa de Petri y se deja gelificar (Valverde, 2019).

Los intervalos de control de supervivencia se realizaron inmediatamente después de la inoculación en los siguientes momentos:

- $T_0$  = Inmediatamente después de la inoculación.
- $T_2$  = Después de 48 horas.
- $T_7$  = después de 7 días.
- $T_{14}$  = después de 14 días.
- $T_{28}$  = a los 28 días.

De cada envase inoculado se extrajo 0,1 mL y se distribuyó uniformemente en placas Petri que contenían los medios de cultivo recomendados para cada microorganismo. La técnica de diseminación o difusión se usó con un asa de Digrafsky y se realizó un barrido. Se dejó incubar en

las condiciones respectivas y transcurrido el tiempo establecido se realizaron las lecturas para dar los resultados de los microorganismos viables obtenidos en los intervalos de tiempo establecidos, expresados en: Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL).

### **3.3.6 E. Evaluación de resultados conteo de colonias (recuento en placa).**

Los resultados se interpretaron en base a la reducción logarítmica del número de microorganismos viables determinados en los tiempos preestablecidos, con respecto al valor correspondiente al inóculo inicial.

La reducción logarítmica se calcula utilizando la siguiente Ecuación 1:

#### **Ecuación 1.**

Cálculo para la reducción logarítmica

$$**Red Log = Log N_0 - Log N_x**$$

Donde:

$N_0$ : número de microorganismos inoculados en  $T_0$

$N_x$ : número de microorganismos supervivientes en cada tiempo de muestreo especificado.

## 4 CAPÍTULO IV

### 4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1.1 Elaboración de las fórmulas cosméticas - shampoo.

Se elaboraron 7 formulaciones de 250 mL cada una. Las 7 formulaciones se muestran en la siguiente Tabla 10:

**Tabla 10.**  
Formulaciones de shampoo a evaluar

NÚMERO DE FÓRMULA	CONSERVANTE	CONCENTRACIÓN	
F 1	AE Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> L)	0,50%	
F 2	AE Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> L)	1,50%	
F 3	AE Salvia ( <i>Salvia officinalis</i> L)	0,50%	
F 4	AE Salvia ( <i>Salvia officinalis</i> L)	1,50%	
F 5	Sharomix (conservante comercial)	0,5% positivo)	(Blanco
F 6	Sharomix (conservante comercial)	1,5% positivo)	(Blanco
F 7	Sin conservante	Blanco negativo	

Elaborado por: Autoras

Los detalles de cada formulación individual incluyen: nombres de ingredientes basados en la nomenclatura INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients), porcentajes de uso previsto, gramos de ingredientes en un paquete individual de 250 ml y la función de cada ingrediente en la formulación descrita en la Tabla 11.

**Tabla 11.**  
Formulaciones con sus respectivas concentraciones

Nomenclatura INCI	Función	Porcentaje (%)	Cantidad para 250 mL
Glycerin	Controlador de viscosidad/ Humectante	2	5
Citric Acid	Regulador de pH	0,3	0,75
Sodium Chloride	Viscosante	2	5
Cocamidopropylbetaine	Tensoactivo/acrecentador de espuma	6	15
Cocamide DEA	Emulsionante	3	7,5
Sodium Laureth sulphate	Espumante	13	32,5
Aqua	Disolvente	c.s.p 250	
<b>ADITIVOS</b>			
<i>Thymus vulgaris L oil</i>	Conservante	0,5	1,25
<i>Thymus vulgaris L oil</i>	Conservante	1,5	3,75
<i>Salvia officinalis L oil</i>	Conservante	0,5	1,25
<i>Salvia officinalis L oil</i>	Conservante	1,5	3,75
Sharomix	Conservante	0,5	1,25
Sharomix	Conservante	1,5	3,75

**Elaborado por:** Autoras

Se obtuvo una formulación de shampoo exitosa que cumplía con todos los requisitos necesarios para su elaboración. Cumpliendo con los requerimientos establecidos en el INCI y COSING.

#### **4.1.2 Control de calidad de las fórmulas (shampoos)**

##### **4.1.2.1 Determinación de pH y Viscosidad**

En la siguiente Tabla 12 se muestran los resultados de la viscosidad y del pH de las 7 formulaciones, con sus respectivos conservantes y concentraciones a evaluar.

**Tabla 12.**  
Resultados de viscosidad y pH de las diferentes formulaciones

Número de Fórmula	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	Parámetros referenciales
Viscosidad (cP)	4465	4523	5612	5748	6184	6223	4762	Min 1250cP- Max 9000cP
pH	6,07	6,13	6,21	6,47	6,58	6,65	5.8	5,5-7

**Elaborado por:** Autoras

**Nota: cP:** centipoise

F1: AE Tomillo (*Thymus vulgaris L*) (0,5%); F2: AE Tomillo (*Thymus vulgaris L*) (1,5%); F3: AE Salvia (*Salvia officinalis*) (0,5%); F4: AE Salvia (*Salvia officinalis*) (1,5%); F5: Sharomix (0,5%); F6: Sharomix (1,5%)

Los valores reportados tanto de viscosidad como de pH cumplen con los rangos establecidos en el Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 093 “Productos cosméticos” con la finalidad de proteger la vida, la salud y seguridad de las personas. El valor de referencia para pH es de 5,5 a 7, y los valores para viscosidad del producto es de 1250cP a 9000cP, por lo tanto, los resultados de las 7 formulaciones cumplen con lo antes mencionado.

#### **4.1.3 Resultados de la eficacia de los aceites esenciales como conservantes (Challenge Test)**

##### **4.1.3.1 Preparación de los inóculos de cada cepa ATCC**

Las condiciones enumeradas bibliográficamente establecen que la longitud de onda de 625 nm da una absorbancia de 0,08 a 0,11, que corresponde a  $1 - 2 \times 10^8$  UFC/mL en bacterias, y una longitud de onda de 530 nm da una absorbancia de 0,13 a 0,16 que corresponde a  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL en hongos y levaduras, en la siguiente tabla 13 se muestran los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancia de los microorganismos ATCC.

**Tabla 13.**  
Lecturas de absorbancia de los microorganismos ATCC

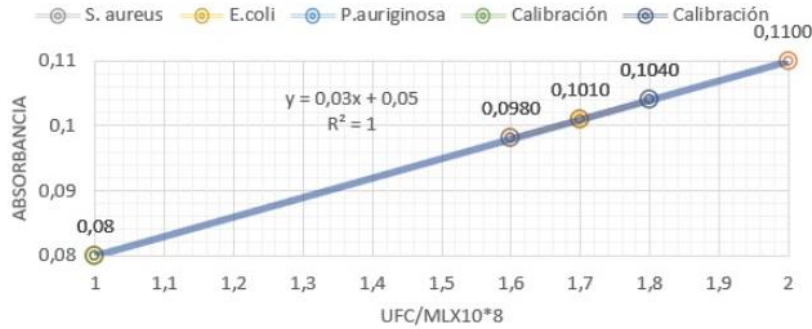
Microorganismos	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
Longitud de onda (nm)	625	625	625	530	530
Absorbancia	0.08-0.11	0.08-0.11	0.08-0.11	0.13-0.16	0.13-0.16
Cantidad (UFC/mL)	1-2x10*8	1-2x10*8	1-2x10*8	1-5x 0*6	1-5 x 10*6
Resultado	0,104	0,098	0,101	0,152	0,145

Elaborado por: Autoras

Utilizando los resultados de las medidas de absorbancia para cada uno de los microorganismos ATCC, se realiza la interpolación de datos para determinar la ecuación de la línea (recta) y calcular las UFC/mL presentes en el inóculo de cada microorganismo.

Las ilustraciones 1 y 2 muestran la interpolación de las lecturas de absorbancia y los valores de UFC/mL determinados según el inóculo de bacterias, hongo y levadura ATCC utilizados.

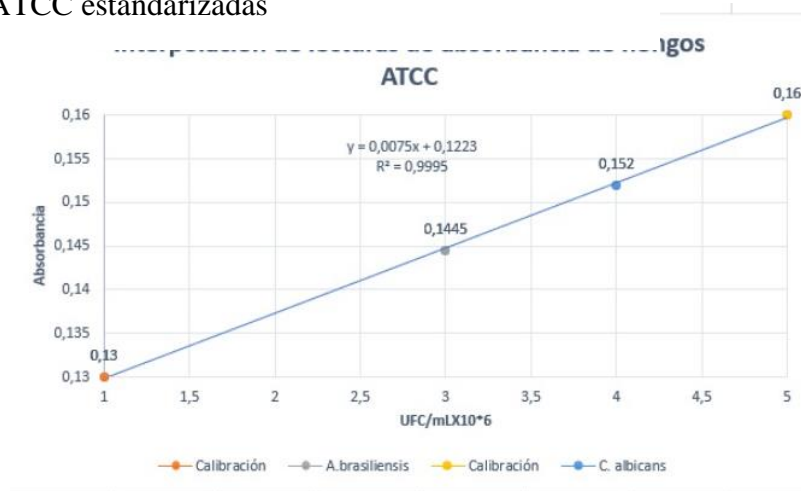
**Ilustración 1.**  
Interpolación de lecturas de absorbancia de bacterias ATCC estandarizadas



Elaborado por: Autoras

## Ilustración 2.

Interpolación de lecturas de absorbancia de hongos y levaduras ATCC estandarizadas



Elaborado por: Autoras

Una vez que se obtienen los resultados de las ecuaciones lineales y las lecturas de absorbancia para bacterias, hongos y levaduras ATCC, se pueden calcular las UFC/mL presentes en cada inóculo microbiano.

**Tabla 14.**

Cálculo de las UFC/mL de los inóculos microbianos ATCC a partir de lecturas de absorbancia

Microorganismos	BACTERIAS			HONGOS LEVADURAS		Y
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	
Lectura de absorbancia	0,104	0,098	0,101	0,152	0,1445	
Ecuación de la recta	y = 0,03x + 0,05			y=0,0075 x+0,1223		
Fórmula para determinación de UFC/mL	x=(y-0,05)/0,03			x=(y-0,1223)/0,0075		
	UFC/mL x 108			UFC/mL x 106		
	1,8	1,6	1,7	1,18	1,12	

Elaborado por: Autoras



#### 4.1.4 Resultados de la eficacia de la acción antimicrobiana de los conservantes en las formulaciones (Challenge Test)

La verificación del crecimiento microbiano en las formulaciones inoculadas se realizó con el siguiente cronograma representada en la tabla 15.

**Tabla 15.**

Cronograma de trabajo para comprobar el crecimiento microbiano

TIEMPOS	FECHAS
0 horas	7 de junio de 2023
48 horas	9 de junio de 2023
7 días	14 de junio de 2023
14 días	21 de junio de 2023
28 días	5 de Julio de 2023

Elaborado por: Autoras

#### 4.1.4.1 FÓRMULA 1: Fórmula de shampoo con AE *Thymus vulgaris L* (tomillo) 0,5% como conservante.

**Tabla 16.**

Contaje microbiano Fórmula 1 AE *Thymus vulgaris L* (tomillo) (0,5%)

	T0	T2	T7	T14	T28
Microorganismos	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X10*6	0	0	208	299
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X10*6	0	0	Incontable: 1,6X10*6	Incontable: 1,6X10*6
<i>Escherichia coli</i>	1,7X10*6	0	0	Incontable 1,7X10*6	Incontable 1,7X10*6
<i>Candida albicans</i>	1,18X10*5	0	0	57	205
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X10*5	0	0	0	0

Elaborado por: Autoras

**Tabla 17.**

Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 1 *Thymus vulgaris L* (tomillo) (0,5%)

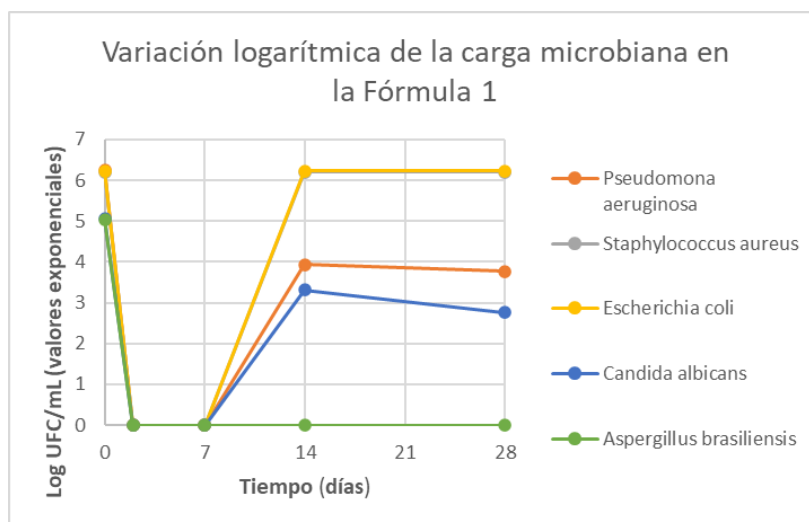
Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SC	SC	3 log	3 log
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	SC	6 log	6 log
<i>Escherichia coli</i>	SC	SC	6 log	6 log
<i>Candida albicans</i>	SC	SC	3 log	2 log
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SC	SC	SC	SC

Elaborado por: Autoras

Nota: SC: sin crecimiento microbiano.

### Ilustración 3.

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 1



Elaborado por: Autoras

Fórmula 1: AE *Thymus vulgaris L* (tomillo) (0,5%).

#### 4.1.4.2 FÓRMULA 2: Fórmula de shampoo con AE *Thymus vulgaris L* (tomillo) 1,5% como conservante.

**Tabla 18.**  
Contaje microbiano Fórmula 2 AE Tomillo (*Thymus vulgaris L*) (1,5%)

Microorganismos	T0	T2	T7	T14	T28
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X10*6	0	0	73	377
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X10*6	0	0	Incontable: 1,6X10*6	Incontable: 1,6X10*6
<i>Escherichia coli</i>	1,7X10*6	0	0	70	Incontable 1,7X10*6
<i>Candida albicans</i>	1,18X10*5	0	0	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X10*5	0	0	0	0

Elaborado por: Autoras

**Tabla 19.**  
Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 2 AE *Thymus vulgaris L* (tomillo) (1,5%)

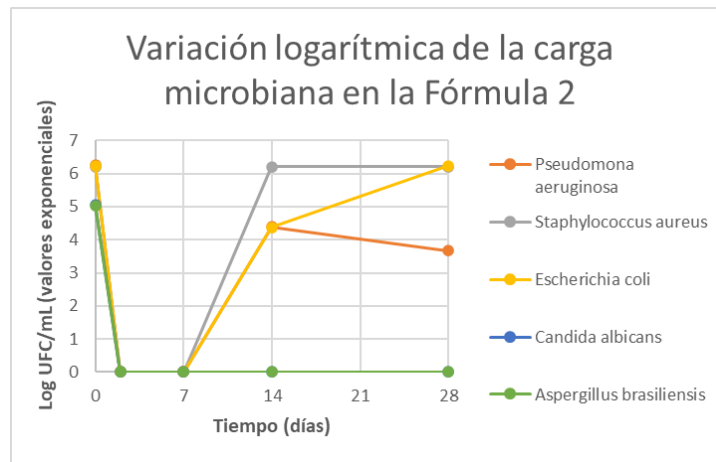
Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SC	SC	4 log	3 log
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	SC	6 log	6 log
<i>Escherichia coli</i>	SC	SC	4 log	6 log
<i>Candida albicans</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SC	SC	SC	SC

Elaborado por: Autoras

SC: sin crecimiento microbiano.

**Ilustración 4.**

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 2.



Elaborado por: Autoras

Fórmula 2: AE Tomillo (*Thymus vulgaris L*) (1,5%)

**4.1.4.3 FÓRMULA 3: Fórmula de shampoo con AE *Salvia officinalis* (salvia) (0,5%) como conservante.**

**Tabla 20.**

Contaje microbiano Fórmula 3 AE *Salvia officinalis* (salvia) (0,5%)

Microorganismos	T0 UFC/mL	T2 UFC/mL	T7 UFC/mL	T14 UFC/mL	T28 UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X10*6	0	0	132	194
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X10*6	0	0	76	96
<i>Escherichia coli</i>	1,7X10*6	0	0	Incontable 1,7X10*6	Incontable 1,7X10*6
<i>Candida albicans</i>	1,18X10*5	0	0	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X10*5	0	0	0	0

Elaborado por: Autoras

**Tabla 21.**

Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 3 AE *Salvia officinalis* (salvia) (0,5%)

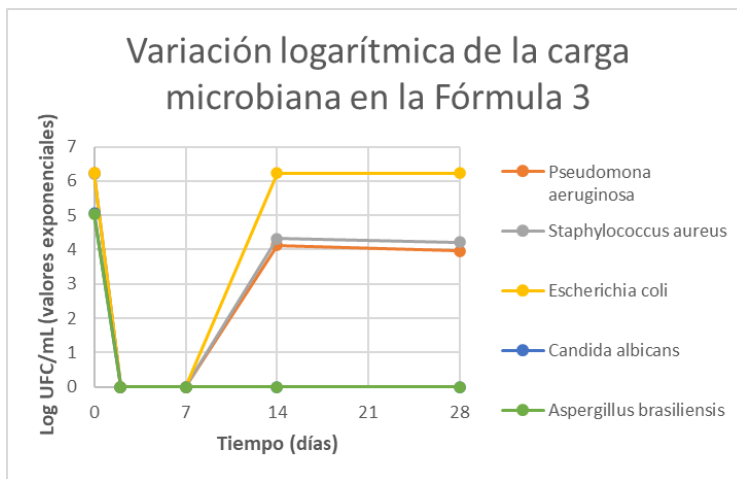
Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SC	AC	4 log	3 log
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	AC	4 log	4 log
<i>Escherichia coli</i>	SC	SC	6 log	6 log
<i>Candida albicans</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SC	SC	SC	SC

Elaborado por: Autoras

Notas:SC sin crecimiento microbiano.

**Ilustración 5.**

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 3



Elaborado por: Autoras

Fórmula 3: AE *Salvia officinalis* (salvia) (0,5%)

**4.1.4.4 FÓRMULA 4: Fórmula de shampoo con AE *Salvia officinalis* (salvia) (1,5%) como conservante.**

**Tabla 22.**Contaje microbiano Fórmula 4 AE *Salvia officinalis* (salvia) (1,5%)

Microorganismos	T0	T2	T7	T14	T28
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X10*6	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X10*6	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1,7X10*6	0	0	0	93
<i>Candida albicans</i>	1,18X10*5	0	0	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X10*5	0	0	0	0

Elaborado por: Autoras

**Tabla 23.**Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 4 AE *Salvia officinalis* (salvia) (1,5%)

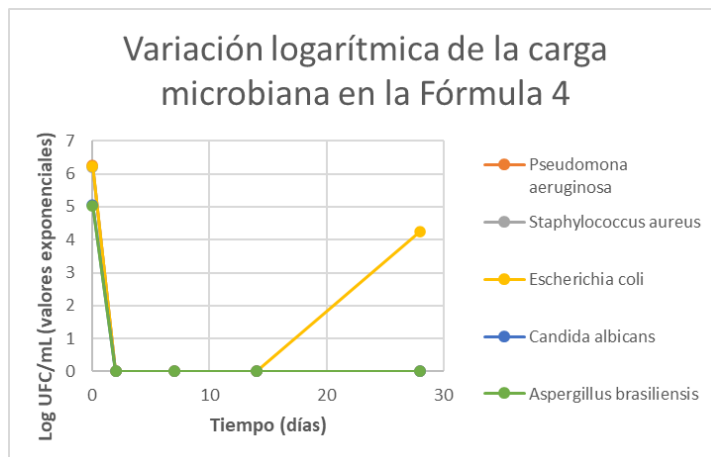
Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Escherichia coli</i>	SC	SC	SC	4 log
<i>Candida albicans</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SC	SC	SC	SC

Elaborado por: Autoras

**Nota:** SC sin crecimiento microbiano.

### Ilustración 6.

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 4.



Elaborado por: Autoras

Fórmula 4: *AE Salvia officinalis (salvia) (1,5%)*

#### 4.1.4.5 FÓRMULA 5: Fórmula de shampoo con Sharomix (0,5%) como conservante.

Tabla 24.

Contaje microbiano Fórmula 5 Sharomix (0,5%)

Microorganismos	T0 UFC/mL	T2 UFC/mL	T7 UFC/mL	T14 UFC/mL	T28 UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1,7X10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	1,18X10 <sup>5</sup>	0	0	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X10 <sup>5</sup>	0	0	0	0

Elaborado por: Autoras

**Tabla 25.**

Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 5 Sharomix (0,5%)

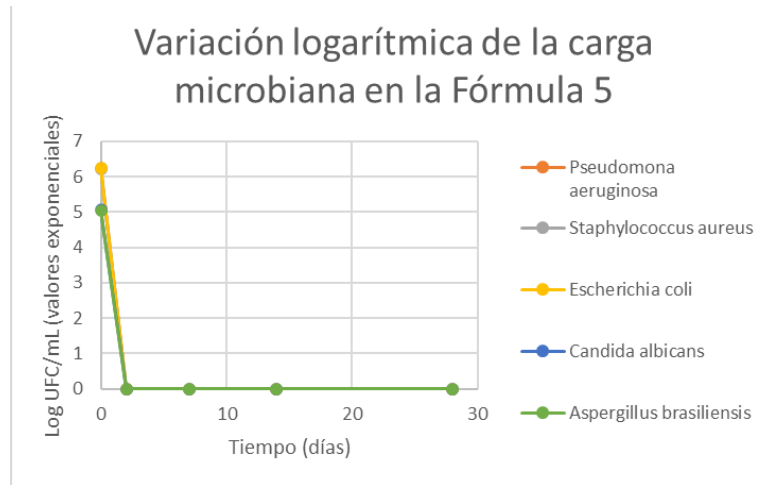
Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Escherichia coli</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Candida albicans</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SC	SC	SC	SC

Elaborado por: Autoras

Nota: SC sin crecimiento microbiano.

**Ilustración 7.**

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 5.



Elaborado por: Autoras

Fórmula 5: Sharomix (0,5%).



#### 4.1.4.6 FÓRMULA 6: Fórmula de shampoo con Sharomix (1,5%) como conservante.

**Tabla 26.**

Contaje microbiano Fórmula 6 Sharomix (1,5%)

Microorganismos	T0 UFC/mL	T2 UFC/mL	T7 UFC/mL	T14 UFC/mL	T28 UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X106	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X106	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1,7X106	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	1,18X105	0	0	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X105	0	0	0	0

Elaborado por: Autoras

**Tabla 27.**

Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 6 Sharomix (1,5%)

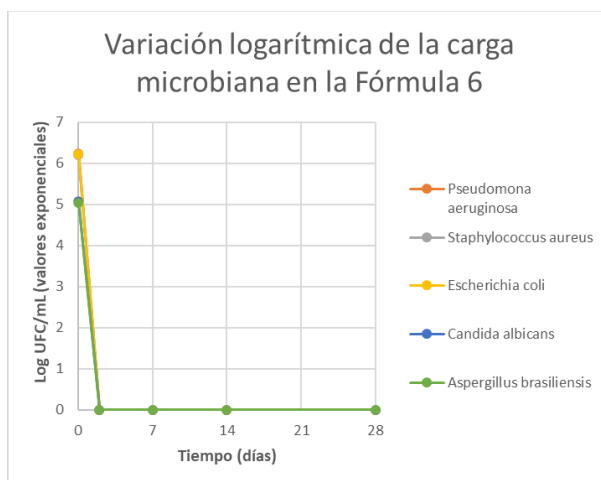
Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Escherichia coli</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Candida albicans</i>	SC	SC	SC	SC
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SC	SC	SC	SC

Elaborado por: Autoras

SC: sin crecimiento microbiano.

#### **Ilustración 8.**

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 6.



Elaborado por: Autoras

Fórmula 6: *Sharomix* (1,5%)

#### 4.1.4.7 FÓRMULA 7: Fórmula de shampoo sin conservante.

**Tabla 28.**  
Contaje microbiano Fórmula 7 Sin conservante

Microorganismos	T0	T2	T7	T14	T28
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1,8X10*6	Incontable: 1,8X10*6	Incontable: 1,8X10*6	Incontable: 1,8X10*6	Incontable: 1,8X10*6
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6X10*6	Incontable: 1,6X10*6	Incontable: 1,6X10*6	Incontable: 1,6X10*6	Incontable: 1,6X10*6
<i>Escherichia coli</i>	1,7X10*6	Incontable: 1,7X10*6	Incontable: 1,7X10*6	Incontable: 1,7X10*6	Incontable: 1,7X10*6
<i>Candida albicans</i>	1,18X10*5	Incontable: 1,18X10*5	Incontable: 1,18X10*5	Incontable: 1,18X10*5	Incontable: 1,18X10*5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,12X10*5	Incontable: 1,12X10*5	Incontable: 1,12X10*5	Incontable: 1,12X10*5	Incontable: 1,12X10*5

Elaborado por: Autoras

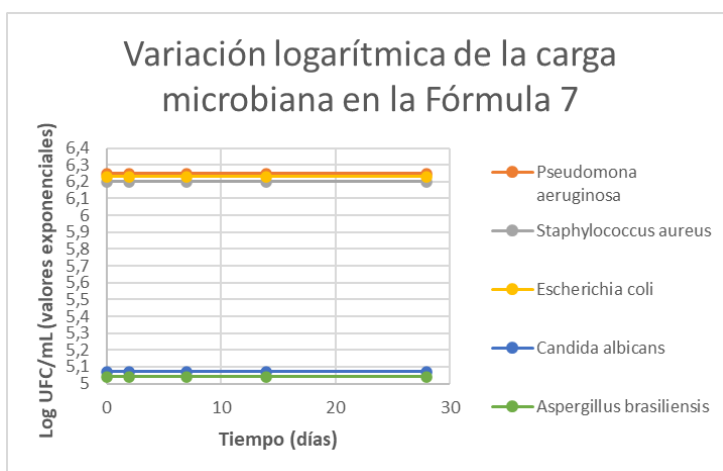
**Tabla 29.**

Reducción Logarítmica de crecimiento microbiano Fórmula 7 Sin conservante

Microorganismos	T2	T7	T14	T28
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	6 log	6 log	6 log	6 log
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 log	6 log	6 log	6 log
<i>Escherichia coli</i>	6 log	6 log	6 log	6 log
<i>Candida albicans</i>	5 log	5 log	5 log	5 log
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	5 log	5 log	5 log	5 log

**Elaborado por:** Autoras**Ilustración 9.**

Variación logarítmica de la carga microbiana en la Fórmula 7.

**Elaborado por:** Autoras

Fórmula 7: Sin conservante

**4.2 Análisis Estadístico**

En primer lugar, se realizaron pruebas no paramétricas de los datos utilizando el software estadístico Rstudio. La prueba de Shapiro-Wilk asegura que los datos cumplieran con el supuesto

de normalidad, arrojando un valor p de 5,634e-07, lo que indica que los datos no siguieron una distribución normal. En consecuencia, se aplicaron modelos no paramétricos para evaluar si había una diferencia significativa entre los conservantes aplicados en las formulaciones.

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias relevantes entre las formulaciones, arrojando un valor de p de 0,001931. Se aceptó la hipótesis alternativa, lo que sugiere que al menos uno de los conservantes hizo una diferencia significativa en la inhibición microbiana, como se muestra en la tabla 30.

Finalmente, se aplicó el método de Holm para realizar las comparaciones múltiples después de haber realizado una prueba de Kruskal – Wallis, dando como resultado que la fórmula 4 (F4), la cual corresponde a la concentración del 1,5% del aceite esencial de *Salvia officinalis* (Salvia), es la que obtuvo mayor eficacia como conservante en la inhibición microbiana en las diferentes cepas ATCC aplicadas del estándar internacional ISO 11930:2019. Como se establecen en la tabla 31.

**Tabla 30.**  
Análisis estadístico en R Studio por la prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal – Wallis		
Chi-squared = 14.871, df = 3,		p –
value = 0.001931		
Contraste	Diferencia	Valor p
F1-F2	-2.8333	0.9663
F1-F3	-5.1667	0.6030
F1-F4	9.3333	0.0836
F2-F3	-2.3333	0.9663
F2-F4	12.1667	0.0130
F3-F4	14.5	0.0020

**Elaborado por:** Autoras

**Tabla 31.**

Análisis estadístico en R Studio por el método de Kruskal-Wallis

Valores p ajustados mediante el método de Holm		
	Rangos medios	Grupos
F3	18.00	a
F2	15.67	a
F1	12.83	ab
F4	3.50	b

**Elaborado por:** Autoras

Investigaciones anteriores con aceites esenciales de diferentes plantas han demostrado que, cuando se incorporan a formulaciones cosméticas, exhiben un comportamiento de crecimiento microbiano aceptable (Selim, 2011) en comparación con estudios que utilizan extractos (Inac & Maskan, 2012). Por el contrario, los resultados obtenidos en este estudio demuestran la eficacia de los aceites esenciales como conservantes contra los microorganismos, siendo *Salvia officinalis* (*Salvia*) al 1,5 % la que presenta el mayor potencial de inhibición microbiana.

## 5 CAPÍTULO V

### 5.1 CONCLUSIONES

De la investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones:

El uso de conservantes naturales como lo son los aceites esenciales, han sido muy exitosos a la hora de formular productos cosméticos. Los ingredientes utilizados fueron revisados y seleccionados en la base de datos CONSING, adicionándolo como posible conservante al aplicar aceites esenciales de *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* en concentraciones de 0.5% y 1.5 % respectivamente. Cumpliendo los parámetros establecidos en el Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 093, relacionado el pH y viscosidad.

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Salvia officinalis* (salvia) incorporados en una formulación cosmética a diferentes concentraciones presentan propiedades antibacterianas y antifúngicas. El aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo) como *Salvia officinalis* L (salvia) a concentraciones 0.5% y 1.5% no presentaron crecimiento microbiano hasta el día 7. En el día 14 se evidencio crecimiento microbiano en las bacterias *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, en los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) en las concentraciones 0,5% y 1,5%, y en el aceite esencial de *Salvia officinalis* (salvia) al 0,5%: en el hongo *Candida albicans* ATCC 10231 en el aceite esencial *Thymus vulgaris* (tomillo) al 0,5%. En el día 28 se presentó crecimiento microbiano en todas las bacterias con los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Salvia officinalis* (salvia) en concentraciones 0,5% y 1,5%.

Los análisis realizados en la investigación, se demostró que el aceite esencial de *Salvia officinalis* (Salvia) al 1,5% es el más efectivo como conservante frente a las bacterias *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 y hongos *Candida albicans* ATCC, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, con un nivel de confianza del 95%, en el shampoo se pudo observar la diferencia significativa en los valores promedio evaluados, por lo tanto, desde el punto de vista estadístico (p valor 5,634e-07), se puede concluir que los valores no cumplieron con la distribución normal, luego se llevó a cabo las pruebas no paramétricas como es el método Holm y la prueba de Kruskal – Wallis, concluyendo que la concentración del 1,5% del aceite esencial de *Salvia officinalis* (Salvia), es la que obtuvo mayor eficacia como conservante en la inhibición microbiana en las diferentes cepas ATCC aplicadas del estándar internacional ISO 11930:2019.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

Se recomienda continuar investigando en el campo de la cosmética orgánica y natural, y aplicar las formulaciones desarrolladas, en base a normativas que aseguren el origen de sus materias primas para que se respeten los parámetros de calidad. Para complementar el desarrollo del producto formulado, se recomienda realizar estudios toxicológicos y de hipersensibilidad del cuero cabelludo antes de proceder a la producción para consumo humano.

Considere también otros productos botánicos cuyos estudios indiquen propiedades anti fúngicas, ya que estos podrían ser candidatos potenciales para mejorar la fórmula desarrollada. Se sugiere que en las siguientes investigaciones se realicen pruebas o evaluaciones a una población específica, para determinar sus efectos secundarios al tener contacto con el cuero cabelludo a pesar de que la base de datos COSING e INCI no indiquen restricciones con respecto al uso de los conservantes empleados en el estudio.

Así mismo, continuar con el estudio con el conservante natural de *Salvia officinalis* al 1,5%, realizando muestreos a poblaciones con fines de uso personal o a su vez seguir adquiriendo datos sobre los bioactivos presentes en los aceites esenciales que permitan su función como

conservantes frente a los microorganismos utilizados para posteriores aplicaciones en la prueba de Challenge test.

Se requiere que el proceso y las pruebas sean lo más asépticos posibles para que no haya contaminación cruzada y tomar en cuenta que para el análisis estadístico se requiere realizar más de 3 muestras en cada microorganismo para de esta manera obtener un mayor número de datos y ser implementadas en Rstudio con el fin de que el análisis sea efectivo.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelan, U. S., de Oliveira, A. C., Cacoci, É. S. P., Martins, T. E. A., Giaccon, V. M., Velasco, M. V. R., & Lima, C. R. R. D. C. (2022). Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(4), 1407-1418. <https://doi.org/10.1111/jocd.14286>
- Almoughrabie, S. (2020). Evaluación y predicción de la actividad antimicrobiana de conservantes en formulaciones cosméticas (Tesis de doctorado, Université Paris-Saclay).
- Barros, C. y Barros, RBG (2020). Cosmética natural y ecológica: Definición y conceptos. <https://doi.org/10.20944/preprints202005.0374.v2>
- Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A., & Sollars, D. (2004). Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Thymol. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4(1), 49-67. [https://doi.org/10.1300/j157v04n01\\_07](https://doi.org/10.1300/j157v04n01_07)
- Bentabet, N., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z. y Rahmoun, N. (2021). Evaluación de las propiedades conservantes de extractos de raíces de *Echium vulgare* y *Fredolia aretioides* en formulaciones de champú con y sin EDTA. *Fitoterapia*, 19 (1), 36-44. <https://doi.org/10.3166/phyto-2021-0247>
- Damyanova, S., Mollova, S., Stoyanova, A., & Gubenia, O. (2016). Chemical composition of *Salvia officinalis* L. essential oil from Bulgaria. *Ukrainian Food Journal*, 5(4), 695-700. <https://doi.org/10.24263/2304-974x-2016-5-4-8>
- Dinel, A., Lucas, C., Guillemet, D., Layé, S., Pallet, V., & Joffre, C. (2020). Chronic supplementation with a mix of *salvia officinalis* and *salvia lavandulaefolia* improves Morris water maze learning in normal adult C57BL/6J mice. *Nutrients*, 12(6), 1777. <https://doi.org/10.3390/nu12061777>
- Dubey, D., Chopra, D., Singh, J., Srivastav, AK, Kumari, S., Verma, A. y Ray, RS (2017). El metilparabeno fotosensibilizado induce la apoptosis a través de la vía dependiente de la caspasa

bajo exposición UVB ambiental en células de la piel humana. *Toxicología alimentaria y química*, 108, 171-185.

Ecocert, «Certificación COSMOS,» Ecocert, [En línea]. Available: <https://www.ecocert.com/es/detaile-de-certification/cosmeticos-ecologicos-o-naturalescosmos->.

Espadero, M. (2017). Evaluación in vivo de la eficiencia cosmética de dos formulaciones elaboradas con Ocotea Quixos (Ishpingo). Universidad Politécnica Salesiana Unidad de Posgrados. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14897/1/UPS-CT007321.pdf>

Favero, Y., Silva, L. D., Almeida, D., Pereira, O. R., & Sousa, M. J. (2019). Desenvolvimento e análise de estabilidade de um gel anti-idade com extracto hidroalcoólico de *Salvia officinalis*. In III Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias (IICNESA). Instituto Politécnico de Viseu. <http://hdl.handle.net/10198/21208>

Ferreira, M. R. S., Lourenço, F. R., Ohara, M. T., Bou-Chacra, N. A., & Pinto, T. D. J. A. (2014). An innovative challenge test for solid cosmetics using freeze-dried microorganisms and electrical methods. *Journal of microbiological methods*, 106, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.009>

Flor, J., Mazin, MR y Ferreira, LA (2019). Cosmética natural, ecológica y vegana. *Cosméticos y Tocadores (São Paulo-Brasil)*. Disponible en: [www. cosmetica en línea. Com. br](http://www.cosmetica.br) , 31.

Gál, R., Čmiková, N., Polaští-ková, A., & Kačániová, M. (2023). Antilisterial and antimicrobial effect of *salvia officinalis* essential oil in beef Sous-Vide meat during storage. *Foods*, 12(11), 2201. <https://doi.org/10.3390/foods12112201>

García, G., Tzián, C., & Zamora. (2017, julio). ELABORACIÓN DE GEL Y SHAMPOO PARA EL CONTROL DE LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA CASPA (DERMATITIS

SEBORREICA) ELABORADO A PARTIR DE EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*): ESTUDIO PILOTO. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA.  
[https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/948654/elaboracion-de-gel-y-shampoo-para-el-control-de-las-manifestaci\\_k3KMiYS.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/948654/elaboracion-de-gel-y-shampoo-para-el-control-de-las-manifestaci_k3KMiYS.pdf)

Gubitosa, J., Rizzi, V., Fini, P., & Cosma, P. (2019). Hair care cosmetics: From traditional shampoo to solid clay and herbal shampoo, a review. *Cosmetics*, 6(1), 13.  
<https://doi.org/10.3390/cosmetics6010013>

Guerrero, P (2017). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como conservante en una emulsión O/W de uso tópico. Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Química Farmacéutica. Carrera de Química Farmacéutica. Quito: UCE. 87 p.  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14142>

Guzmán, E., & Lucia, A. (2021). Essential Oils and Their Individual Components in Cosmetic Products. *Cosmetics*, 8(4), 114. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040114>

Halat, D. H., Krayem, M., Khaled, S., & Younes, S. (2022). A focused insight into thyme: biological, chemical, and therapeutic properties of an indigenous Mediterranean herb. *Nutrients*, 14(10), 2104.  
<https://doi.org/10.3390/nu14102104>

Inanç, T., & Maskan, M. (2012). The potential application of plant essential oils/extracts as natural preservatives in oils during processing: a review. *Journal of Food Science and Engineering*, 2(1), 1.

Herman, A. (2019). Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products. *Current microbiology*, 76(6), 744-754. <https://dx.doi.org/10.29228/jrp.117>

Hoang, H. T., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: Recent applications, challenges and perspectives. *Cosmetics*, 8(4), 106. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>

International Organization for Standardization. (2019). ISO 11930:2019

Jain, N. (2023). Breaking the Boondocks of Cosmetology with Antimicrobial Peptides.

Joshi, S., Pandey, R. D., Bhattarai, R., & Gharti, B. B. (2021). Antimicrobial activity of essential oil and crude organic extracts of *Salvia officinalis* L. leaves from Nepal. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 6(2).

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](https://doi.org/10.1128/AEM.02264-17).

Kumar, A., & Mali, R. R. (2010). Evaluation of prepared shampoo formulations and to compare formulated shampoo with marketed shampoos. *Evaluation*, 3(1), 025.

Laguna, C., de la Cuadra, J., Martín-González, B., Zaragoza, V., Martínez-Casimiro, L., & Alegre, V. (2009). Allergic Contact Dermatitis to Cosmetics. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 100(1), 53-60

Malpani, T., Jeithliya, M., Pal, N., & Puri, P. (2020). Formulation and evaluation of Pomegranate based herbal shampoo. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 1439-1444. [www.phytojournal.com](http://www.phytojournal.com)

- Mira Naranjo, J. C. (2017). Eficacia antimicrobiana in vitro del extracto de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus* (Bachelor's thesis).
- Montero-Recalde, Mayra, Mira, Juan Carlos, Avilés-Esquivel, Diana, Pazmiño-Miranda, Pilar, & Erazo-Gutiérrez, Ramiro. (2018). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2), 588-593. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520>
- Mosquera Tayupanta, T. D. L. Á. (2014). Estudio comparativo de la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite de romero (*Rosmarinus officinalis* Lamiaceae) utilizados como conservantes en una formulación cosmética (Master's thesis).
- Mouaz, H., y Laala, F. (2021). Diseño y evaluación de bálsamo labial (Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias de la Naturaleza y la Vida).
- Naufalin, R. (2019). Natural preservation opportunities and challenges in improving food safety. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2094, No. 1). AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/1.5097501>
- Núñez Solano, A. A., Cerecero Aguirre, P., Sánchez Vargas, L. O., Robles Navarro, J. B., & Bermeo Escalona, J. R. (2020). Efecto antimicrobiano de curcumina sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. *Nova scientia*, 12(25). <https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2474>
- Pizani, R. S., Viganó, J., de Souza Mesquita, L. M., Contieri, L. S., Sanches, V. L., Chaves, J. O., & Rostagno, M. A. (2022). Beyond aroma: A review on advanced extraction processes from

rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) to produce phenolic acids and diterpenes. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.07.001>

Poulios, E., Giaginis, C., & Vasios, G. K. (2019). Current advances on the extraction and identification of bioactive components of sage (*Salvia* spp.). *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(10), 845-857. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190722130440>

Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual review of food science and technology*, 10, 365-387. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>

Rathee, P., Sehrawat, R., Rathee, P., Khatkar, A., Akkol, E. K., Khatkar, S., ... & Sobarzo-Sánchez, E. (2023). Polyphenols: Natural Preservatives with Promising Applications in Food, Cosmetics and Pharma Industries; Problems and Toxicity Associated with Synthetic Preservatives; Impact of Misleading Advertisements; Recent Trends in Preservation and Legislation. *Materials*, 16(13), 4793. <https://doi.org/10.3390/ma16134793>

Registro Oficial Ecuador (Viernes 4 de Diciembre de 2015) Registro Oficial N° 121. Reglamento Técnico Ecuatoriano INEN PRODUCTOS COSMETICOS. Quito, Pichincha, Ecuador: Editora Nacional

Rodríguez García, C. (2022). Desarrollo de producto cosmético natural a base de aceite esencial de té verde, extracto de albahaca y de probióticos y prebióticos generados de la fermentación de arroz a partir de *Lactobacillus Plantarum* (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).

Russell, A. D. (2003). Challenge testing: Principles and practice. *International Journal of Cosmetic Science*, 25(3), 147-153. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2003.00179.x>

- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Del Mar Contreras, M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N. N., Kobarfard, F., & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1688-1706. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>
- Selim, S. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (vre) and *Escherichia coli* o157: h7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian journal of microbiology*, 42, 187-196. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010005000005>
- Scuteri, D., Hamamura, K., Sakurada, T., Watanabe, C., Sakurada, S., Morrone, L. A., ... & Corasaniti, M. T. (2021). Efficacy of essential oils in pain: A systematic review and meta-analysis of preclinical evidence. *Frontiers in pharmacology*, 12, 640128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.640128>
- Schmiderer, C., & Novak, J. (2020). *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill.: Dalmatian and Three-Lobed Sage. *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants*, 523-537. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_16)
- Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2017). Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(5), 303-313. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.010>
- Soler de la Vega Ana Cristina. (2016). Toxicidad de los Parabenos y su uso en cosméticos. Recuperado de: <http://upcommons.upc.edu/handle/2117/99113>

- Souza, LLFD, Víctor, C., Dumont, JJR y Maia, LM (2023). Cosmética Orgánica y el Uso de Apelaciones Emocionales. *Revista de Administração Contemporânea*. <https://doi.org/10.1590/1982-7849rac2023220089.en>
- Tayupanta, TM, Jara, AM y Maldonado, ME (2020). Extractos naturales una alternativa conservante en la industria cosmética. *Revista Ibérica de Sistemas y Tecnologías de Información*, (E30), 139-149.
- Tundis, R., Leporini, M., Bonesi, M., Rovito, S., & Passalacqua, N. G. (2020). *Salvia officinalis* L. from Italy: A comparative chemical and biological study of its essential oil in the Mediterranean context. *Molecules*, 25(24), 5826. <https://doi.org/10.3390/molecules25245826>
- Valverde Caballero, M. (2019). Caracterización fisicoquímica y actividad antifúngica del aceite esencial de laurel (*laurus nobilis*) en hongos aislados de tallarines de casa. <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/unamba/732>
- Wallack, G. (2019). Rethinking FDA'S regulation of cosmetics. *Harv. J. on Legis.*, 56, 311.
- Wang, Q., Cui, S., Zhou, L., He, K., Song, L., Liang, H., & He, C. (2019). Effect of cosmetic chemical preservatives on resident flora isolated from healthy facial skin. *Journal of cosmetic dermatology*, 18(2), 652-658. <https://doi.org/10.1111/jocd.12822>
- Wohlrab, J., Staubach, P., Augustin, M., Eisert, L., Hünerbein, A., Nast, A., Reimann, H., Strömer, K., & Mahler, V. (2018b). S2K-Leitlinie zum Gebrauch von Präparationen zur lokalen Anwendung auf der Haut (Topika). *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 16(3), 376-392. [https://doi.org/10.1111/ddg.13473\\_g](https://doi.org/10.1111/ddg.13473_g)



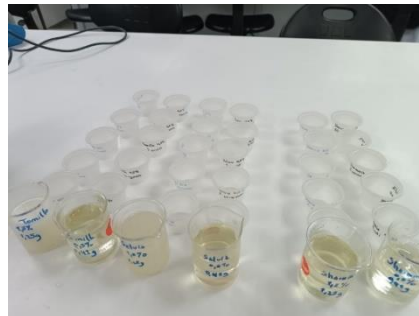
## ANEXOS

**Ilustración 10.**  
Formulación cosmética madre



Fuente: Autor

**Ilustración 11.** Preparación de shampoos con sus respectivos conservantes



Fuente: Autor

### **Ilustración 12**

.Inoculación de los microorganismos en los shampoos



**Fuente:** Autor

### **Ilustración 13.**

Incubación de los shampoos en intervalos de tiempo de 0,7,14,28 días



**Fuente:** Autor

**Ilustración 14.**  
Inoculación de microorganismo en cajas Petri



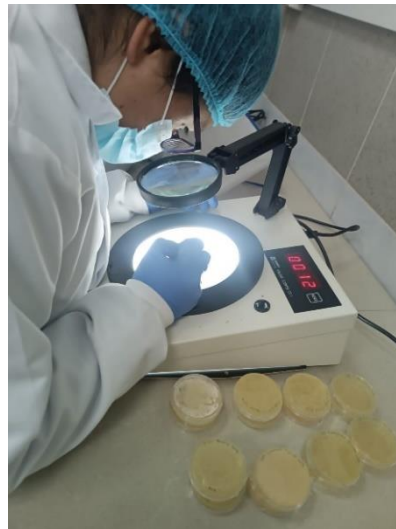
**Fuente:** Autor

**Ilustración 15.**  
Sembrado de inóculos por diseminación



**Fuente:** Autor

**Ilustración 16.**  
Conteo de colonias formadoras de microorganismo.



**Fuente:** Autor