



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE UNA EMULSIÓN DERMOCOSMÉTICA CON ACEITE DE CANNABINOIDES PARA DETERMINAR SU ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA

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

AUTORA: MARÍA BELÉN VILLAVICENCIO VILLAVICENCIO

TUTORA: DRA. MÓNICA JUDITH ESPADERO BERMEO, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, María Belén Villavicencio Villavicencio con documento de identificación N° 0105604375, manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo 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, 19 de marzo del 2024

Atentamente,



María Belén Villavicencio Villavicencio

0105604375

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

Yo, María Belén Villavicencio Villavicencio con documento de identificación N° 0105604375, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Evaluación *in vitro* de una emulsión dermocosmética con aceite de cannabinoides para determinar su actividad fotoprotectora”, el cual ha sido desarrollado para optar por 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, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 19 de marzo del 2024

Atentamente,



María Belén Villavicencio Villavicencio

0105604375

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 UNA EMULSIÓN DERMOCOSMÉTICA CON ACEITE DE CANNABINOIDES PARA DETERMINAR SU ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA*, realizado por María Belén Villavicencio Villavicencio con documento de identificación N° 0105604375, 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, 19 de marzo del 2024

Atentamente,



Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo, Mgtr.

0103645412

ÍNDICE

ÍNDICE.....	V
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del Problema	2
1.2. Pregunta de Investigación	3
1.3. Delimitación del Problema.....	3
1.4. Justificación	3
1.5. Objetivos	4
1.5.1. General.....	4
1.5.2. Específicos	4
1.6. Hipótesis	5
1.6.1. Hipótesis Nula.....	5
1.6.2. Hipótesis Alternativa.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
2. MARCO DE REFERENCIA.....	6
2.1. Antecedentes Investigativos.....	6
2.2. Bases Teóricas	7
2.2.1. <i>Cannabis sativa</i> L.	7
2.2.1.1. Taxonomía	8

2.2.1.2.	Fitocannabinoides	8
2.2.1.3.	Otros constituyentes no cannabinoides	9
2.2.1.4.	Usos.....	10
2.2.1.5.	Legislación en el Ecuador	11
2.2.2.	Industria cosmética	11
2.2.2.1.	Productos cosméticos.....	12
2.2.2.2.	Emulsiones	12
2.2.2.3.	Emulsiones Protectoras Solares	13
2.2.2.4.	Estabilidad de las emulsiones.....	13
2.2.3.	Radiación Solar Ultravioleta.....	15
2.2.3.1.	Factor de protección solar	16
2.2.3.2.	Efectos de la Radiación Solar en Humanos	17
2.2.3.3.	Activos naturales frente a la radiación UV	18
2.2.3.4.	Antioxidantes	18
CAPÍTULO 3.....		20
3.	MARCO METODOLÓGICO	20
3.1.	Nivel de Investigación	20
3.2.	Diseño de investigación	20
3.3.	Unidad Experimental	20
3.4.	Variables	20
3.5.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	21
3.6.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	21
3.7.	Procedimientos experimentales.....	21

3.7.1.	Fase 1: Formulación de la emulsión dermocosmética.....	22
3.7.2.	Fase 2: Determinación de la capacidad antioxidante y fotoprotectora.....	24
3.7.3.	Fase 3: Análisis Estadístico.....	27
CAPÍTULO 4.....		28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.	Fórmula cosmética.....	28
4.1.1.	Determinación pH.....	29
4.1.2.	Pruebas de Estabilidad.....	29
4.2.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	39
4.3.	Evaluación del factor de protección solar.....	42
4.4.	Análisis Estadístico.....	43
CAPÍTULO 5.....		46
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....		48
ANEXOS.....		58

Índice de Figuras

Figura 1: Requisitos microbiológicos de los productos cosméticos	24
Figura 2: Curva de calibración del ácido ascórbico	40
Figura 3: Curva de calibración para la cuantificación del porcentaje de captación del radical DPPH con el tratamiento al 1%	41
Figura 4: Curva de calibración para la cuantificación del porcentaje de captación del radical DPPH con el tratamiento al 3%	41
Figura 5: Curva de calibración para la cuantificación del porcentaje de captación del radical DPPH con el tratamiento al 5%	42
Figura 6: Diagrama de cajas de los tratamientos frente a la media de absorbancias	44
Figura 7: Emulsión dermocosmética madre.....	58
Figura 8: Preparación de las emulsiones con diferentes concentraciones de principio activo	58
Figura 9: Resultados de la exposición de las emulsiones con diferentes concentraciones de principio activo a centrifugación.....	59
Figura 10: Preparación de las emulsiones para las pruebas de estabilidad acelerada	59
Figura 11: Preparación de las diluciones de ácido ascórbico para espectrofotometría Visible a 517nm	60
Figura 12: Preparación de las diluciones de los tratamientos para espectrofotometría Visible a 517 nm	60
Figura 13: Preparación de medios de cultivo para el control microbiológico	61
Figura 14: Resultados del análisis microbiológico	61
Figura 15: Preparación de las diluciones para evaluación espectrofotométrica UV-VIS de 290-320 nm de las muestras	61

Índice de Tablas

Tabla 1: Taxonomía de <i>Cannabis sativa</i> L.....	8
Tabla 2: Constituyentes de <i>Cannabis sativa</i> L. por clase química	9
Tabla 3: Clasificación de la radiación ultravioleta	16
Tabla 4: Nivel de fotoprotección por el método COLIPA.....	17
Tabla 5: Fórmula para el desarrollo de una emulsión cosmética.....	22
Tabla 6: Soluciones de ácido ascórbico para la curva de calibración.....	25
Tabla 7: Formulación madre para una emulsión o/w con principio activo.....	28
Tabla 8: Resultados de estabilidad acelerada a 40°C	32
Tabla 9: Resultados de estabilidad acelerada a 2°C	33
Tabla 10: Resultados de estabilidad acelerada a temperatura ambiente	34
Tabla 11: Resultados de control microbiológico	38
Tabla 12: Porcentaje de captación del radical DPPH	39
Tabla 13: Factor de protección solar para cada tratamiento	43
Tabla 14: Análisis comparativo de las diferencias entre tratamientos.....	45

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicarlo a mi madre principalmente, por ser la mujer que me dio mucho más que la vida me amó, me crió y me enseñó a ser la mejor versión de mi a pesar de las adversidades del mundo hasta donde pudo.

A la Vida de mi vida por acogerme en su manto amoroso y darme tantos años de su tiempo como si fuera una hija más, gracias a ella nunca me faltó un consuelo, una alegría, un cariño. Y por último a mi viejito Luis que me acompañan desde el cielo, por dedicarme tanto tiempo y educarme para ser una mujer capaz de poderse comer el mundo.

Los amo y los extraño, esto es por y para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, quien fue la persona que nunca permitió que me rindiera y me alentó a siempre dar lo mejor de mí. Él, que fue mi apoyo en todo momento y a pesar de nuestras diferencias nunca me desamparó.

A mis hermanos, por la comprensión y el cariño en todo este camino universitario.

A mi familia que siempre me ha creído capaz de salir adelante y por apoyarme incluso en los momentos más difíciles para que todo sea de lo mejor.

A mi novio por la paciencia y el amor durante todo este tiempo.

A mi tía Tamara quien fue mi consuelo cuando lo necesitaba, mi consejera y otro pilar en mi vida estudiantil.

A mis docentes Inés, Myriam, Jhison, Pablo y Silvia quienes me formaron con mucho cariño y me impartieron sus conocimientos para poder desarrollarme como persona y como profesional.

A mi tutora por la paciencia, el empeño y el tiempo para desarrollar esta investigación.

A Sandy por su ayuda durante todo el proceso de elaboración del proyecto.

RESUMEN

La investigación de mecanismos de protección contra los efectos adversos de la radiación solar ultravioleta se ha convertido en uno de los principales objetivos de la industria cosmética, creando formas cosméticas que cumplan con los requerimientos de la población actual mediante el uso de filtros solares que absorban, reflejen o dispersen los rayos UV en base a compuestos sintéticos y naturales. El objetivo de la presente investigación es evaluar la influencia de las concentraciones de cannabinoides través de una emulsión dermocosmética para determinar la actividad fotoprotectora de manera *in vitro*.

Para lograr esto, se formula una emulsión dermocosmetica con concentraciones de 1, 3 y 5% de aceite de cannabinoides evaluando su estabilidad y control microbiológico. Seguido de un análisis de capacidad antioxidante por el método de captación de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracilo), y el factor de protección solar por el método de Mansur.

La emulsión formulada fue de carácter aceite en agua (o/w), siendo los tratamientos al 1 y 3% los que mejores resultados dejaron en estabilidad. La actividad microbiológica se encontró dentro de los límites de las normativas vigentes. El porcentaje de absorción del radical libre dio un IC50 de 9.522 para el tratamiento con el 1% de principio activo, 3.599 para el 3% e indeterminado para el 5%. Y el factor de protección solar arrojó valores de 0.07, 0.09 y 0.13 para los diferentes tratamientos ya mencionados respectivamente; resultando en un estudio no paramétrico en donde el tratamiento al 3% poseía mayor diferencia significativa con respecto a la formulación base sin principio activo.

Los resultados reflejados en este trabajo experimental demuestran que el uso de los derivados de *Cannabis sativa* L. en formulaciones cosméticas es un campo con mucho potencial para investigar a futuro.

Palabras Claves: aceites cannabinoides, radiación solar ultravioleta, fotoprotección

ABSTRACT

The research of protection mechanisms against the adverse effects of ultraviolet radiation has become one of the main objectives of the cosmetic industry, creating cosmetic forms that please the requirements of the current population through the use of sunscreens that absorb, reflect or scatter UV rays based on synthetic and natural compounds. The objective of the present research is to evaluate the influence of cannabinoid concentrations through a dermocosmetic emulsion to determine the photoprotective activity in vitro.

The form of the emulsion was oil in water (o/w), with the 1% and 3% treatments being the ones that gave the best results in terms of stability. The microbiological activity was found to be within the limits of current regulations. The percentage of free radical absorption gave an IC50 of 9.522 for the treatment with 1% of active ingredient, 3.599 for 3% and undetermined for 5%. The sun protection factor yielded values of 0.07, 0.09 and 0.13 for the different treatments mentioned above, respectively, resulting in a non-parametric study in which the 3% treatment had a greater significant difference with respect to the base formulation without active ingredient.

The results reflected in this experiment demonstrate that the use of *Cannabis sativa* L. derivatives in cosmetic formulations is a field with great potential for future research.

Key words: cannabinoid oils, ultraviolet solar radiation.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La historia de la cosmética abarca tiempos muy remotos como en Roma o Egipto donde se solía usar compuestos naturales para enmascarar olores o suavizar la piel. Así mismo el uso de aceites y/o extractos para el cuidado de la piel era muy común (Chaudhri & Jain, 2009). La evolución de lo que hoy conocemos como industria cosmética ha sido drástica, pues cada vez se pretende solventar más problemáticas o vanidades que la población encuentra en el mundo actual.

Hoy en día varias ciencias han tomado fuerza en la formulación e innovación del desarrollo de cosméticos priorizando lo natural sobre lo sintético, lo *in silico* sobre lo *in vivo* y un sin fin de factores que pretenden mejorar los procesos sin afectar tanto al ambiente como al consumidor.

La fitocosmética pretende usar ingredientes de origen natural como alternativa, acrecentando este mercado en Europa, Asia y Estados Unidos mayoritariamente, pues el aprovechamiento de metabolitos como terpenos, fenoles, flavonoides, taninos, entre otros proveniente de las plantas como principios activos por sus propiedades, beneficia al desarrollo más rápido de un producto, comparado con el tradicional, debido a que al no tratarse de químicos experimentales sintéticos se puede reducir el riesgo y lanzar productos más seguros (Costa, 2015)

Uno de los productos cosméticos que más ha tomado fuerza son las cremas protectoras solares, ya que su función principal es proteger la piel del daño provocado por la radiación ultravioleta mediante ingredientes activos que reflejan, absorben o dispersan los rayos UV antes de que estos penetren sus capas más profundas y causen eritemas, fotocarcinogénesis o fotoenvejecimiento prematuro (Tanner, 2006). Muchos de los ingredientes utilizados para las

formulaciones de protectores solares usan filtros sintéticos que pueden presentar toxicidad al penetrar al sistema circulatorio o reacciones cutáneas adversas (Lodén et al., 2011)

Por estas razones, hoy por hoy se han dado muchos avances científicos sobre el uso de activos naturales que sustituyan los comerciales y protejan a la piel de los daños causados por la radiación UV; algunos de estos son el estudio de Inocente Camones et al., (2014) con la *Myrciaria dubia*, conocida como camu-camu , así como el *Lepidium meyenii* o maca de Castañeda, (2019) o el *Piper aduncum* L. conocido como matico de Alayo Mendoza et al., (2018); entre otra infinidad de especies vegetales que por su estructura pueden presentar virtudes en la elaboración de nuevos productos biológicos.

1.1. Planteamiento del Problema

Aproximadamente 300 millones de personas alrededor del mundo usan en una o varias formas el Cannabis (Turner et al., 1980) pues los fitocannabinoides de esta planta son únicos en su especie y presentan propiedades extensas en campos medicinales/terapéuticos, textiles, recreativos, volviéndose un tema de interés incluso gubernamental, ya que en la actualidad las restricciones del uso de Cannabis han disminuido, siendo el THC (fito cannabinoide psicoactivo predominante) el único que por su naturaleza es restringido en varias partes del mundo.

La planta de *Cannabis sativa* L. posee también metabolitos secundarios dentro de su estructura como flavonoides, terpenos, fenoles (no cannabinoides); adicional a los fitocannabinoides, de estructura terpeno fenólica (Ángeles López et al., 2014), que se relacionan directamente con la radiación ultravioleta, pues se cree que estos son capaces de actuar en la cascada de señalización redox, inhibiendo el posible daño al ADN ya que pueden prevenir la formación de radicales libres inducidos por la radiación. (Svobodová et al., 2003)

Es por esto, que es importante explotar los beneficios de esta y otras plantas como alternativa natural por las ventajas que presentan en sus costos, compatibilidad con varios tipos de piel y otros beneficios adicionales a la vez (Bhattacharjee et al., 2021), frente a los productos de protección solar sintéticos los cuales son más prevaleciente en el mercado moderno, pues estos al no ser absorbidos por la piel pueden llegar a tener consecuencias negativas como bioacumularse en ecosistemas, principalmente marinos, afectando a la cadena trófica y convirtiéndose en un problema de contaminación ambiental (Tovar-Sánchez et al., 2020).

1.2. Pregunta de Investigación

¿Las diferentes concentraciones de aceite de cannabinoides influyen en la actividad fotoprotectora de la emulsión?

1.3. Delimitación del Problema

La investigación titulada Evaluación *in vitro* de una emulsión dermocosmética con aceite de cannabinoides para determinar su actividad fotoprotectora se realiza en los Laboratorios de Ciencias de la Vida pertenecientes a la Universidad Politécnica Salesiana campus El Vecino en la ciudad de Cuenca en los meses de octubre 2022 - febrero 2023.

1.4. Justificación

Considerando la situación que atraviesa el mundo actual en cuanto al aumento de radiación ultravioleta, Agustí, (2007) afirma que “por cada 1% de reducción de la capa de ozono, aumentaron aproximadamente entre un 1 y 2% la transmisión de luz UV-B a la superficie terrestre” la cual en conjunto con la radiación UV-A son aquellas que menos absorbe la capa atmosférica protectora y las que más llegan a ser perjudiciales para la salud humana (EPA, 2001) las consecuencias pueden ir desde envejecimiento prematuro de la piel, hasta los temidos cánceres. Pues en base a lo dicho por Basset-Seguín & Herms, (2020), los carcinomas

basocelulares son uno de los cánceres de piel más frecuentes en la población adulta de piel clara mayor de 50 años.

Para afrontar esta exposición constante y retrasar los posibles efectos adversos, la industria cosmética ha venido formulando una infinidad de productos que protejan la piel de la radiación solar; sin embargo, muchas de sus formulaciones son de carácter químico inorgánico prevaleciendo compuestos como el óxido de zinc o el dióxido de titanio en nano cantidades (Haider et al., 2019) los cuales pueden llegar a ser agresivos en algunos tipos de piel e incluso infiltrarse de forma xenobiótica a los ambientes. Es por esto, que se pretende buscar una alternativa más orgánica al demostrar que los principios activos del aceite de cannabinoides podrían cumplir como un “eco protector solar” (Bonet & Garrote, 2011)

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Evaluar la influencia de las concentraciones de cannabinoides en la actividad fotoprotectora *in vitro* de una emulsión dermocosmética

1.5.2. Específicos

- Elaborar una emulsión dermocosmética a través de formulaciones magistrales con diferentes concentraciones de aceite de cannabinoides garantizando un producto susceptible para el uso tópico.
- Determinar la capacidad antioxidante y fotoprotectora de la emulsión dermocosmética mediante métodos de laboratorio obteniendo datos para su posterior análisis.
- Analizar los resultados obtenidos mediante modelos estadísticos determinando si existe una influencia de la concentración de cannabinoides en la actividad fotoprotectora.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis Nula

La emulsión elaborada con aceite de cannabinoides a diferentes concentraciones no llega a presentar actividad fotoprotectora

1.6.2. Hipótesis Alternativa

La emulsión elaborada con aceite de cannabinoides a diferentes concentraciones presenta actividad fotoprotectora

CAPÍTULO 2

2. MARCO DE

REFERENCIA 2.1. Antecedentes

Investigativos

Existen estudios sobre efectos de *Cannabis sativa* L. tanto en productos cosméticos como en problemas dermatológicos, no se han podido esclarecer científicamente los efectos de estos principios activos contra la radiación solar. Sin embargo, autores como Atalay et al., (2019) afirman que las estructuras fenólicas, más específicamente los grupos hidroxilos del anillo fenólico encontradas en esta especie, son las encargadas de interrumpir las reacciones en cadena de los radicales libres, transformándolos a su forma menos activa. Siendo por esto que Baswan et al., (2020) hablan sobre un estudio *in vitro* utilizando queratinocitos humanos en donde el CBD era capaz de penetrar en las células y equilibrar la respuesta de estrés oxidativo resultante de la radiación ultravioleta B (UVB).

Singh et al., (2019) en su estudio donde trata la evaluación del potencial antienvjecimiento de las emulsiones cosméticas a base de aceite de semillas de zanahoria, utiliza métodos como el de Mansur para determinar su FPS y el del radical DPPH para determinar su capacidad antioxidante; ya que Munteanu & Apetrei, (2021) afirman que la prueba de DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracilo) es una técnica sencilla que se aplica habitualmente para evaluar la actividad antioxidante de los extractos vegetales, pues se basa en la donación de electrones de los antioxidantes para neutralizar el radical; donde existe una decoloración del radical como indicador de la actividad antioxidante.

En un estudio realizado por Kaur & Saraf, (2010) sobre la evaluación de la capacidad de absorción de rayos UV de aceites herbales utilizados en protectores solares de manera *in vitro*, determinó que el método espectrofotométrico UV-VIS propuesto por Mansur et al., (1986) es el ideal, puesto que es sencillo, rápido, emplea reactivos de bajo costo y puede utilizarse en la de los valores FPS de diferentes formas cosméticas.

Por otro lado, Geoffrey et al., (2019) en su artículo “productos de protección solar” sugieren que para desarrollar un protector solar hay que tomar en cuenta las propiedades tanto físicas (análisis organoléptico, pruebas de estabilidad, determinación del pH) como químicas (fotoestabilidad, compatibilidad) de los constituyentes que se pretende incluir en la formulación; así como el análisis del producto final en lo que refiere al control microbiológico.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. *Cannabis sativa* L.

El origen de esta planta no es muy claro, pues su dispersión es muy amplia por toda Asia y Europa, lugares en donde data su domesticación primaria desde hace mucho tiempo atrás. El ser humano ha estado atraído por los numerosos beneficios que esta especie puede brindar como son las fibras textiles, alimentos, aceites, medicinas, entre otros (Ranalli, 1999). Actualmente las plantas de *Cannabis sativa* L. pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats desde muy bajos de altura sobre el nivel del mar, hasta algunos otros montañosos y ha sido foco actual de investigaciones para el campo de la salud, pues se ha visto que esta planta puede ayudar en problemáticas tanto dérmicas como incluso neurológicas (Novak & Blüthner, 2020).

2.2.1.1. Taxonomía

Kinghorn et al., (2017) define a la taxonomía de estas plantas como en la Tabla 1:

Tabla 1:

Taxonomía de Cannabis sativa L.

Nombre Científico	<i>Cannabis sativa L.</i>
Reino	Plantae (plantas)
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas de semillas)
División	Magnoliophyta (planta floral)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Hamamelididae
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Género	Cannabis
Especie	sativa
Abreviación autorizada taxonómica	L.

Fuente: (Kinghorn et al., 2017)

2.2.1.2. Fitocannabinoides

La especie *Cannabis sativa L.* contiene un aproximado de 120 fitocannabinoides; metabolitos terpenofenolicos únicos que constituyen un aproximado del 24% del total de la planta y pueden ser aislados tanto en su forma natural como de aquellos ejemplares secos. Actualmente se han clasificado estos en 11 tipos generales como se presentan en la Tabla 2 (Chandra et al., 2017).

Tabla 1:*Constituyentes de Cannabis sativa L. por clase química.*

Clase química	2005	2015
Delta-9-trans tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)	9	23
Delta-8 tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC)	2	5
Cannabigerol (CBG)	8	16
Cannabicromeno (CBC)	6	9
Cannabidiol (CBD)	7	7
Cannabinoidiol (CBND)	2	2
Cannabielsoína (CBE)	5	5
Cannabiciclol (CBL)	3	3
Cannabinol (CBN)	7	11
Cannabitriol (CBT)	9	9
Tipo Misceláneo	14	30
Total Cannabinoides	72	120
Total No Cannabinoides	419	445
Total	491	565

Fuente: (Kinghorn et al., 2017)

2.2.1.3. Otros constituyentes no cannabinoides

Existen al menos 445 compuestos no cannabinoides dentro de *Cannabis sativa L.* de los cuales Brenneisen, (2007) destacan a los terpenos que al menos 140 han sido estudiados en

esta especie y su rendimiento depende del tipo de Cannabis (droga, fibra) polinización; sexo, edad y la parte de la planta; tipo de cultivo; momento y condiciones de la cosecha; secado; y almacenamiento. En el aceite esencial de Cannabis se pueden encontrar concentraciones desde el 47.9 y 92.1% de monoterpenos, 7% de sesquiterpenos y aproximadamente un 1% de otros compuestos. Flavonoides, identificando al menos 23 comunes en el Cannabis, únicos ya que confieren propiedades medicinales potenciales para estudio. Fenoles no cannabinoides, aproximadamente conocidos 34 fenoles no cannabinoides, 9 con estructura de tipo espiro, 9 dihidroestilbenos, 3 dihidrofenantrenos, 6 fenoles y glucósidos fenólicos; todos estos de suma importancia, pues serán aquellos que concedan la capacidad fotoprotectora de la planta para su posterior investigación. A esto se incluyen otros hidrocarburos, ácidos grasos, alcoholes simples, carbohidratos, compuestos nitrogenados, aldehídos y cetonas (Radwan et al., 2021).

2.2.1.4. Usos

La versatilidad de la planta de *Cannabis sativa* L. es un factor característico de la misma, con esto se explica las extensas aplicaciones en diferentes industrias a lo largo del tiempo y por todo el mundo, como lo afirma Balant et al., (2021) que describe que el uso medicinal predomina en un 75.41% por sobre otros, como el alimenticio con un 7.29% e incluso el recreativo con un 8.35%.

Los usos de esta planta datan de hace más de 10.000 años como parte de textiles y alimentos (Charitos et al., 2021); actualmente el mercado del cáñamo (planta no psicoactiva) abarca más de 25 mil productos en lo que trata de ropa, cuerdas, muebles, aceites (para industria y consumo), cosméticos, nutraceuticos, etc. Al igual que su uso terapéutico/medicinal se ha venido perfeccionando a lo largo de los siglos siendo capaces de estudiar el sistema endocannabinoide por el cual se han desarrollado fármacos para un gran número de trastornos o enfermedades (Fraguas-Sánchez & Torres-Suárez, 2018); logrando tras su respectiva

aprobación por las entidades regulatorias Federal Drug Administration (FDA) y Agencia Europea de Medicinas (EMA) para sacarlos finalmente al mercado.

2.2.1.5. Legislación en el Ecuador

Ecuador es un país con una ubicación estratégica para el cultivo de plantas de la familia *Cannabaceae* por sus condiciones climáticas, hidrográficas, etc. Sin embargo, según el Código Orgánico Integral Penal [COIP], (2014) en sus artículo 219 y 222 estipula que será privada de libertad aquella persona que produzca, siembre o coseche sustancias catalogadas sujetas a fiscalización. A pesar de ello, el pasado 2020 se dió una reforma de este código donde se excluía al cáñamo (*Cannabis* no psicoactivo) de esta categoría y despenaliza la siembra y cultivo de sustancias sujetas a fiscalización que justifiquen fines terapéuticos o investigativos, incluso para uso industrial no farmacéutico; siendo el ARCSA (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria) aquella entidad regulatoria de productos que contengan *Cannabis* no psicoactivo para medicamentos, alimentos, suplementos alimenticios, cosméticos, plaguicidas, etc. mediante la “Normativa técnica sanitaria para la regulación y control de productos terminados de uso y consumo humano que contengan cannabis no psicoactivo o cáñamo, o derivados de cannabis no psicoactivo o cáñamo” (ARCSA, 2021)

2.2.2. Industria cosmética

La industria cosmética ha tenido un crecimiento abismal durante los años post 2020, puesto que gracias a la pandemia generada por el Covid-19 en el 2020 se generó una pérdida económica de al menos el 10% en relación con el año anterior (Orús, 2022); no obstante con datos de Statista Market Forecast, (2022) se espera que entre el 2023 al 2027 el mercado cosmético crecerá un 3.8% anualmente, dando un ingreso aproximado de 74,34 millones de dólares por persona en relación con la población mundial, sobresaliendo la línea de cuidado de la piel sobre las otras.

2.2.2.1. Productos cosméticos

La Agencia Nacional de Regulación y Control de Vigilancia Sanitaria (ARCSA) define a los productos cosméticos como:

...toda sustancia o formulación de aplicación local a ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlos en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales (ARCSA, 2018).

Estos productos vienen en diferentes formas cosméticas, es decir, presentaciones a las que se añade el principio activo característico. Estas dependen de su estado (líquido, sólido, gaseoso) y su función para determinar incluso el tipo de envase necesario (Catalán, 2020). Los cosméticos se pueden encontrar en diferentes formas como: emulsiones, geles, lociones, aerosoles, espumas, sales, leches, ampollas, y polvos; siendo las más estudiadas las emulsiones.

2.2.2.2. Emulsiones

Las emulsiones son formas cosméticas constituidas por dos fluidos inmiscibles, uno dispersado en otro en presencia de agentes tensioactivos o emulsificadores (Bibette et al., 1999). Estos tensioactivos no son más que moléculas anfipáticas que poseen un extremo polar hidrofílico y otro apolar o lipofílico lo que les permite unirse a sus partes respectivas reduciendo la tensión superficial y estabilizando la fase dispersa.

Las emulsiones pueden dividirse en microemulsiones, nanoemulsiones, emulsiones múltiples y simples; siendo estas últimas de interés ya que se subdividen en emulsión hidrofílica agua en aceite (w/o), en donde la fase oleosa se posiciona en la fase continua y el agua es dispersada por lo que su textura es más oleosa al tacto, tampoco presenta conductividad

o dispersión en agua. Por el contrario, emulsión lipofílica aceite en agua (o/w) en donde la fase oleosa se dispersa y su sensación al tacto es cremosa y si mantiene conductividad y dispersión en agua (Dos Santos, 2010).

2.2.2.3. Emulsiones Protectoras Solares

La preocupación del hombre por la exposición al sol se ha venido dando desde hace mucho tiempo atrás, acompañándolo en su evolución hasta volverse una temática importante en la actualidad por los efectos nocivos que está radiación puede representar. Es por esto por lo que nace el término fotoprotección, que se expone como “una estrategia preventiva y terapéutica frente al cáncer y al fotoenvejecimiento de la piel” (Fuentes Lorenzo, 2019). Esto no solo involucra cubrirse del sol con elementos de vestimenta o buscar refugio en sombras; sino el uso tópico indispensable de las emulsiones o cremas protectoras solares.

Estas emulsiones son consideradas el vehículo mediante el cual accionaran los filtros solares, su requisito es su conservación como una capa fina en la superficie de la piel que proporcione el efecto de protección UV (Geoffrey et al., 2019); por lo regular suelen ser de naturaleza w/o cuando se quiere una pantalla uniforme y gruesa que refleje los rayos (aplicando filtros inorgánicos como el óxido de zinc o dióxido de titanio) ;o por el contrario una emulsión o/w que por su textura ligera permiten el uso de filtros orgánicos (con absorción mediante cambios estructurales de los rayos UV) (Serpone et al., 2007) y los actuales filtros biológicos. Estos provienen de origen natural y su función es inactivar los radicales libres y formas reactivas del oxígeno (como antioxidante) previniendo las mutaciones internas celulares de la piel (He et al., 2021).

2.2.2.4. Estabilidad de las emulsiones

Al momento de formular una emulsión es importante tomar en cuenta parámetros como estabilidad, comportamiento y usos posibles. La estabilidad viene determinada según guías y

normativas que, mediante pruebas o ensayos preliminares relacionados con las características físicas, químicas y microbiológicas, permiten determinar la conservación del producto; es decir, la vida útil del mismo (ONUFI, 2018). El objetivo principal del análisis de este perfil de estabilidad es evaluar su rendimiento, seguridad y eficacia; así como su aceptación por el consumidor (ANVISA, 2004).

Los factores que influyen en la estabilidad de una emulsión pueden dividirse en dos: los factores extrínsecos o externos a los que las formulaciones están expuestas como temperatura, luz, oxígeno, humedad, microorganismos, etc. Y los intrínsecos relacionados con los componentes de las formulaciones, es decir, su naturaleza e interacción entre estos y/o con el material de acondicionamiento (Campanero, 2019).

Para mejorar el proceso de estabilización de una emulsión se utilizan los tensioactivos o emulsificantes; estos son compuestos anfipáticos que reducen la tensión interfacial (Al-Sabagh, 2002). Existe una metodología creada por Griffin, (1954) en donde se determina que “...el valor HLB es una función del porcentaje en peso de la parte hidrófila de la molécula de un tensioactivo no iónico”, es decir, es asignar un número HLB al surfactante basado en su estructura molecular; mientras más bajo sea este se indica que el emulsificante es hidrófobo por el contrario de los valores altos que indican que el emulsificante es hidrófilo; todo esto nos da una predicción del tipo de emulsión respectivamente y su estabilidad (Davis, 1994)

2.2.2.4.1. Control Microbiológico de las emulsiones

La microbiota de la piel humana contiene una variedad de microorganismos como levaduras, mohos, virus y bacterias algunos residentes y otros transitorios que provienen de la exposición constante a factores externos (Wang et al., 2019). Para la producción de cosméticos es importante garantizar la seguridad del consumidor con análisis de recuento de microorganismos aerobios mesófilos y determinar la ausencia de otros microorganismos

patógenos específicos por medio de normativas y estándares internacionales las Normas ISO (Organización Internacional de Estandarización).

Las bacterias son el foco principal de control, pues son las principales causantes de alteraciones en la fisiología de la piel, infecciones o enfermedades entre las cuales destacan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. (Hillion et al., 2013). Así mismo es importante el estudio de otros microorganismos como *Escherichia coli* pues esta es un indicador importante de la existencia de contaminación fecal (AEMPS, 2021)

La industria cosmética ha requerido siempre de controles microbiológicos en la fabricación de productos ya que algunos de sus ingredientes y el ambiente de preparación son propicios para el crecimiento de microorganismos no deseados, representando un peligro para la seguridad del consumidor puesto que puede llevar a efectos leves como picazón hasta infecciones que requieren tratamientos agresivos en zonas delicadas como son los ojos. De igual manera se podría ver afectada la funcionalidad y estabilidad del producto, representando pérdidas para el productor (March et al., 2018).

2.2.3. Radiación Solar Ultravioleta

El sol desprende una gran cantidad de energía de donde se desprenden los diferentes tipos de radiación (infrarroja, visible y ultravioleta) siendo esta última invisible, pero de gran interés, pues aquella llega a la superficie terrestre en forma de rayos UV-A y UV-B.

La radiación solar se define como espectros de emisiones de energía a diversas longitudes de onda, en donde se las clasifica según su capacidad de penetración y características físicas principalmente (Garrote & Bonet, 2008). Los tipos o divisiones que presenta la radiación solar ultravioleta son 3, estas difieren según la longitud de onda que abarcan y los efectos que estas pueden producir en la salud humana (D’Orazio et al., 2013) Su clasificación se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2:

Clasificación de la radiación ultravioleta

Tipo de Radiación	Longitud de onda según (Diffey, 2002))	Características según (Narayanan et al., 2010)
Radiación UV-A	400 - 320 nm	Es aquella que más alcanza a la superficie terrestre pues no es filtrada por la estratósfera. Penetra en más profundidad las capas de la piel volviéndose perjudicial a prolongadas y excesivas exposiciones ya que provoca una pigmentación persistente y envejecimiento
Radiación UV-B	320 - 290 nm	Es parcialmente filtrada por la capa de ozono y penetra las capas más superficiales de la dermis siendo la más nociva. Es responsable de las quemaduras solares, arrugas por envejecimiento y carcinomas o cáncer de piel
Radiación UV-C	290 a 200 nm	Es la más agresiva de todas debido a que su exposición quema la piel y causa cáncer mucho más rápido. Esta radiación es filtrada por la capa de ozono en su totalidad antes de llegar a la Tierra por lo que sus efectos no son comunes

Fuente: Autor

2.2.3.1. Factor de protección solar

La **Food and Drug Administration (FDA)** define al factor de protección solar (FPS) como la relación numérica entre la dosis eritematosa mínima de la piel protegida frente a la de

la piel desprotegida. Es decir, determina cuantitativamente la capacidad de defensa de la piel frente al eritema o enrojecimiento primario.

Generalmente este valor se lo asocia en base a la exposición de la radiación UVB la cual actúa de forma inmediata, mientras que la radiación UVA evidencia sus efectos a largo plazo (Moreno & Moreno, 2010).

Los valores determinados por el método COLIPA se clasifican en la Tabla 4.

Tabla 3:

Nivel de fotoprotección por el método COLIPA

Nivel de Fotoprotección	Rango FPS
Bajo	2-6
Medio	8-12
Alto	15-25
Muy Alto	30-50
Ultra	>50

Fuente: (Batlle, 2005)

2.2.3.2. Efectos de la Radiación Solar en Humanos

Las interacciones de los seres humanos con el ambiente tienden a involucrar muchos factores que intervienen en el estado de salud de las personas, por lo que siendo la exposición solar uno de estos, los efectos de esta podrían no siempre ser benéficos, sino por el contrario, contribuyen al envejecimiento extrínseco al aumentar la formación de arrugas y reducir la resistencia de la piel. O en un peor contexto aún generar fotocarcinogénesis, un cáncer de piel sumamente importante pues ya representa un problema de salud mundial (Lan, 2019).

Es por esto que, el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de Estados Unidos recomienda el tratamiento preventivo no relacionado a signos o síntomas de estas problemáticas, como minimizar la exposición solar para reducir los riesgos de cáncer, así como

también el uso de protectores solares como gorras, gafas, vestimenta larga, pero sobre todo el uso constante de la crema protectora solar (Pérez & Bashline, 2019).

2.2.3.3. Activos naturales frente a la radiación UV

Las plantas cuentan con un sin fin de metabolitos y activos naturales que permiten su protección frente a algunos elementos ambientales como la radiación ultravioleta (mayormente UV-B) influyente en el comportamiento y desarrollo directo (cambios en la actividad génica que afectan a la forma o función) o indirecto (cambios en el equilibrio competitivo y en el ciclo de los nutrientes) de las plantas (Caldwell et al., 1998).

De acuerdo con Stevanato et al., (2014) algunos de estos activos que ayudan como filtros UV a la planta son terpenos; carotenoides; catequinas; antocianinas; flavonoides, con grandes propiedades antioxidantes y otras funciones en la resistencia al estrés; compuestos fenólicos que han demostrado ser importantes filtros para proteger a las plantas de los efectos potencialmente nocivos de la radiación UV-B. Sin embargo, el metabolismo de estos polifenoles en plantas es complejo debido a la multitud de posibles variaciones químicas del esqueleto básico existentes en una gran variedad de compuestos y enzimas. (Pescheck et al., 2021)

2.2.3.4. Antioxidantes

El metabolismo oxidativo es muy común dentro de los seres vivos, alimentos, entre otros; sin embargo, en su proceso se producen radicales libres y otras especies reactivas que pueden causar en efectos celulares destructivos y/o letales dependiendo el caso (Antolovich et al., 2002). Debido a esto se han desarrollado mecanismos de defensa contra estos procesos y sus efectos llamándolos antioxidantes.

Los antioxidantes se definen como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas, comparadas con las del sustrato oxidable, retrasa o inhibe

significativamente la oxidación de dicho sustrato” (Gutteridge, 1994). Su mecanismo de acción es prevenir las reacciones en cadena de la oxidación cortando el paso de iniciación o propagación lo que conduce a la finalización o retraso del degradado de la reacción.

Existen varias fuentes potenciales de antioxidantes en material vegetal como semillas, tallos, hojas, frutos, raíces, etc. Cada una de estas posee compuestos orgánicos que le atribuyen esta característica, entre ellos los más importantes son los flavonoides que son capaces de formar electrones deslocalizados no apareados, estabilizando el radical fenoxilo formado tras la reacción con radicales lipídicos (Matthäus, 2002); y los fenoles o polifenoles que son los principales protectores frente a la oxidación, pues son los que primero sufren esta reacción siendo incluso capaces de recuperar su estado inicial antioxidante mediante un equilibrio redox favorecido por otras estructuras presentes (Dangles, 2012).

La actividad antioxidante puede ser monitoreada por diferentes ensayos químicos alguno de ellos son ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), Quimioluminiscencia, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico), FRAP (poder antioxidante férrico reductor) y uno de los más conocidos el método DPPH (2,2-Difenil-1-picrihidracilo); un método colorimétrico propuesto por Blois, (1958) que se basa mediante espectrofotometría Visible en la donación de electrones de los antioxidantes para neutralizar el radical DPPH. La actividad antioxidante de este suele expresarse como IC_{50} , que se define como la concentración efectiva del antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH inicial en un 50% (Shahidi & Zhong, 2015).

CAPÍTULO 3

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Nivel de Investigación

El nivel de investigación que se pretende manejar en este proyecto es de tipo experimental y orden cuantitativo, pues los datos que se obtendrán durante la marcha analítica podrán ser interpretados para conocer si el aceite de cannabinoides presenta las características fotoprotectoras para utilizarlos dentro de emulsiones cosméticas.

3.2. Diseño de investigación

Después de establecer la variable dependiente (concentración de aceite de cannabinoides) y observar los cambios efectuados en la variable independiente (nivel de actividad fotoprotectora) de las emulsiones, podemos conjeturar que el tipo de investigación tratado es de índole experimental puro, pues trabajamos con una variable y un blanco que nos permitirán conocer la actividad fotoprotectora del aceite de cannabinoides en una emulsión.

3.3. Unidad Experimental

Se plantea como unidad experimental de este diseño de investigación a los 100 g de emulsión obtenidos de una formulación madre de 400 g. Puesto que a cada uno de estas unidades (100 g) se añadieron las concentraciones de 1%, 3% y 5% de principio activo en conjunto con un blanco dando un total de 4 unidades experimentales para el análisis de los procesos por triplicado.

3.4. Variables

- **Variables independientes:** Concentraciones de principio activo (aceite de

cannabinoides full espectro)

- **VARIABLES DEPENDIENTES:** Nivel de actividad fotoprotectora (FPS)

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Como primera instancia para la parte teórica del proyecto se recolectaron datos tras una revisión bibliográfica de artículos científicos, tesis de pre y posgrado y datos estadísticos de proyectos y temas afines, obteniendo y sintetizando los conocimientos necesarios acerca del tema planteado.

Luego de esto, en la parte experimental utilizando la técnica de la observación se tomará evidencia tanto fotográfica como manual, la cual permitirá recolectar los resultados de los procesos que servirán para el análisis estadístico pertinente.

3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos se procesaron en el programa Excel 2021 empleando gráficas y tablas que faciliten la interpretación de estos. Para el análisis estadístico se empleó el software Rstudio con un diseño completamente al azar

3.7. Procedimientos experimentales

El proyecto cuenta con dos fases experimentales, la primera consiste en la formulación de la emulsión cosmética con sus respectivos análisis; la segunda por otra parte consiste en la evaluación tanto de capacidad antioxidante por el método de DPPH y la actividad fotoprotectora por el método de Mansur, siguiendo la bibliografía respectiva

3.7.1. Fase 1: Formulación de la emulsión dermocosmética

Fórmula madre

Luego de revisión bibliográfica se lleva a experimentación una fórmula en base a Poveda, (2019) con modificaciones, observando el comportamiento y compatibilidad de los ingredientes entre ellos. Determinando que la formulación elegida (Tabla 5) presentaba las mejores características en cuanto a unión de fases o/w, y aprobación de RTE-INEN 093.

Tabla 4:

Fórmula para el desarrollo de una emulsión cosmética

Fase	Componente	Nomenclatura INCI	Función	Restricciones según CosIng
O	Cera de Abeja	Beeswax	Hidratante/Estabilizante/Controlador de Viscosidad	n/a
O	Ácido Esteárico	Stearic Acid	Emulsificante/ Surfactante	n/a
O	Alcohol Cetílico	Cetyl Alcohol	Estabilizante/Emulsificante/ Controlador de Viscosidad	n/a
O	Trietanolamina	Triethanolamine	Regulador pH/ Emulsificante/ Surfactante	n/a
O	Lanolina	Lanoline	Emoliente/ Rmulsionante/ Surfactante	n/a
O	Monoestearato de Glicerilo	Glyceril stearate	Emoliente/ Emulsificante	n/a
O	Dimeticona	Dimeticone	Emoliente/ Acondicionador y protector de la piel	n/a
W	Glicerina	Glycerin	Controlador de viscosidad/ Protector de la piel/ Humectante	n/a
W	Propilenglicol	Propyleneglycol	Controlador de viscosidad/ Disolvente / Humectante	n/a
W	Agua	Aqua	Vehículo	n/a
C	<i>Cannabis sativa</i> L.	-	Principio Activo	n/a
C	Stabil	-	Conservante	n/a

n/a: no aplica restricción

Fuente: Autor

La emulsión se elaboró a partir de una fase oleosa (O) y una fase acuosa (W), las cuales fueron calentadas a $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para verter la fase W sobre la fase O con agitación constante. Una vez que la mezcla baje su temperatura a 40°C se añade una última fase (C) donde se encuentra el conservante y la fragancia, para este caso no se requirió añadir fragancia ya que el conservante utilizado posee aroma. La preparación se cuadruplicó para preparar un solo lote de fórmula madre el cual se dividió para las dosificaciones de principio activo al 1, 3 y 5%.

Determinación de pH

Con base en lo descrito por Ibáñez & Suñé, (1968) una de las cualidades más importantes de una crema dermocosmética es su pH, más aun tratándose de cremas de día que tienden a ser de aspecto O/W. Para este estudio se diluyó 1 g de emulsión en 9 mL de agua destilada para analizarlo en el pH-metro a temperatura ambiente.

Pruebas de estabilidad

A fin de evaluar la estabilidad de una emulsión se tomó de referencia la normativa ISO/TR 18811:2018 de la Organización Internacional de Estandarización (ISO, 2018) en conjunto con parámetros de ANVISA, (2004) donde se realizaron pruebas durante 15 días de estabilidad acelerada. Para esto se tomó 9 g de emulsión a diferentes concentraciones de principio activo y el blanco en recipientes estériles y se los sometió a condiciones extremas, en estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y refrigeración a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ con observación cada 72 horas.

Otra prueba planteada por la normativa es la centrifugación de 5 mg de muestra a 3000 rpm durante 30 minutos, todo esto para observar si existe sedimentación, foliculaciones, o algún altercado entre fases.

Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas se analizaron a partir de los parámetros de las normativas NTE-INEN-ISO 2867 correspondientes a los requisitos sobre productos cosméticos, en donde se subdividen otras normativas para el análisis microbiológico como se evidencia en la Figura 1.

Figura 1:

Requisitos microbiológicos de los productos cosméticos

Área de aplicación y fase Etaria	Requisito	Límites de aceptabilidad	Método de ensayo de referencia
<ul style="list-style-type: none"> Cosméticos para niños (hasta 3 años) Cosméticos para el área de los ojos Cosméticos que entran en contacto con las membranas mucosas 	Microorganismos mesófilos aerobios totales	Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^2 ufc/g o ml	NTE INEN-ISO 21149
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 1 g ó ml	NTE INEN-ISO 22717
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o ml	NTE INEN ISO 22718
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g o ml	NTE INEN-ISO 21150
Demás productos cosméticos susceptibles a contaminación microbiológica	Microorganismos mesófilos aerobios totales	Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^3 ufc/g o ml	NTE INEN-ISO 21149
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 1 g o ml.	NTE INEN-ISO 22717
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o ml.	NTE INEN-ISO 22718
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g o ml.	NTE INEN-ISO 21150

Fuente: NTE-INEN 2867

3.7.2. Fase 2: Determinación de la capacidad antioxidante y fotoprotectora

Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de la emulsión con diferentes concentraciones de principio activo, se utiliza el método DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracilo) propuesta por Blois, (1958) con algunas modificaciones.

- **Preparación del reactivo DPPH**

Se preparó una solución 0.1 nM en etanol; para lo cual se pesó 2 mg de reactivo de DPPH en un balón de aforo de 50 mL y se aforó con etanol al 96%; seguido de esto se envuelve el frasco con papel aluminio y se lo deja en refrigeración por aproximadamente 24 horas.

- **Preparación de la curva de calibración**

La base para la curva de calibración es ácido ascórbico puro, con 5 mg se preparó una solución madre de 100 ppm en un balón de aforo de 50 mL con etanol al 96%. Seguido se realizaron diluciones de 2 mL a diferentes concentraciones como se indica en la Tabla 6:

Tabla 5:

Soluciones de ácido ascórbico para la curva de calibración

Concentración µg/mL	Volumen Solución Patrón µL	Volumen Etanol 96% µL
1	20	1980
2	40	1960
3	60	1940
4	80	1920
5	100	1900
6	120	1880
7	140	1860

Fuente: Autor

Cada dilución de 2 mL fue separada a volumen de 1 mL para añadir posteriormente 1 mL de solución de DPPH y medir las absorbancias con un control de 1 mL de solución de DPPH más 1 mL de etanol al 96%.

- **Preparación de las muestras**

Para preparar las muestras se tomó 1 mg de emulsión y se diluyó a una concentración 1:10 con etanol al 96%. Posteriormente se mezcló en vortex por 10 minutos y se sometió a centrifugación a 4000 rpm por otros 10 minutos.

Se toma el sobrenadante como solución madre para realizar diluciones con etanol al 96% a concentraciones de 10, 7.5, 5 y 2.5 mg/mL para un volumen de 3 mL. Seguido se toma 1 µL de estas y se añade 1 µL de solución de DPPH para agitarlos en una plancha mecánica por 30 minutos en la oscuridad y finalmente medir absorbancias por espectrofotometría a 517 nm

Evaluación del factor de protección solar

La actividad fotoprotectora se determinó siguiendo los parámetros de (Inocente Camones et al., 2014). Se aforó etanol al 96% en un balón 50 mL con 0.5 g de emulsión, sometido a agitación durante 5 minutos y filtrado a través de filtros millipore, desechando los primeros 10 mL. Se transfirió una nueva alícuota de 0.5 mL a un balón aforado de 25 mL y el volumen se ajustó con etanol al 96% para generar una solución a 0.2 mg/mL, ya que como indica Mansur et al., (1986) estas condiciones son las que mejor se correlacionan a los métodos *in vivo*.

Las absorbancias de la muestra en forma de solución se obtuvieron por espectrofotometría UV-VIS en el rango de 290-320 nm correspondientes a los rayos UVB, quienes son los principales causantes de las reacciones adversas en la piel (Ramirez-Granados et al., 2017). Las lecturas se tomaron en intervalos de 5 nm por triplicado, seguidas de la aplicación de la Ecuación 1.

Ecuación 1:

Ecuación de Mansur para determinar FPS

$$SPF_{\text{spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Fuente: Mansur et al., (1986)

Donde:

$EE(\lambda)$: es el espectro de efecto eritematoso

$I(\lambda)$: es el espectro de intensidad solar

Abs: es la absorbancia del producto

CF: es el factor de corrección (=10)

Los valores de los espectros de efecto eritematoso (EE) e intensidad solar (I) son constantes determinadas por Sayre et al., (1980). Para las longitudes de onda necesarias (290-320) los valores son: 0.0150, 0.0817, 0.2874, 0.3278, 0.1864, 0.0839 y 0.018.

3.7.3. Fase 3: Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó siguiendo las pruebas de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de un diseño completamente al azar.

Se maneja una estadística no paramétrica usando el análogo del análisis ANOVA; la prueba de Kruskal-Wallis y el test de Wilcoxon para la comparación por parejas determinando la mayor diferencia significativa.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.Fórmula cosmética

La formulación desarrollada con aceite de cannabinoides como activo natural al 1,3 y 5% se evidencia en la Tabla 7. Esta es una emulsión cosmética o/w ya que según la bibliografía planteada por ICI Americas, (1980) el HBL de los componentes de la fase oleosa son altos. Para aproximar el equilibrio hidrofílico-lipofílico de los emulsificantes se evaluó la miscibilidad de las emulsiones en agua siendo esta o/w, puesto que los altos valores del HBL tenderán a ser miscibles en agua (Gadhawe, 2014).

Tabla 6:

Formulación madre para una emulsión o/w con principio activo

Fase	Componente	Nomenclatura INCI	Función	Cantidad (%)	HBL
O	Cera de Abeja	Beeswax	Hidratante/Estabilizante/Controlador de Viscosidad	0.9	12
O	Ácido Esteárico	Stearic Acid	Emulsificante/ Surfactante	4	15
O	Alcohol Cetílico	Cetyl Alcohol	Estabilizante/Emulsificante/ Controlador de Viscosidad	2.3	2
O	Trietanolamina	Triethanolamine	Regulador pH/ Emulsificante/ Surfactante	0.1	12
O	Lanolina	Lanoline	Emoliente/ Rmulsionante/ Surfactante	0.5	10
O	Monoestearato de Glicerilo	Glyceril stearate	Emoliente/ Emulsificante	1	3.8
O	Dimeticona	Dimeticone	Emoliente/ Acondicionador y protector de la piel	0.5	14
W	Glicerina	Glycerin	Controlador de viscosidad/ Protector de la piel/ Humectante	2	-
W	Propilenglicol	Propyleneglycol	Controlador de viscosidad/ Disolvente / Humectante	2	-
W	Agua	Aqua	Vehículo	cps 100	-
C	<i>Cannabis sativa</i> L.	-	Principio Activo	1.3.5	-
C	Stabil	-	Conservante	0.6	-

Fuente: Autor

El monoestearato de glicerilo y el alcohol cetílico según sus fichas técnicas son los únicos emulsificantes con un HLB bajo en relación con los demás, pues éstos actúan como un coemulsificante en formulaciones o/w con el objetivo de dar viscosidad y estabilidad a las emulsiones (Dickinson, 2003).

4.1.1. Determinación pH

El pH obtenido en la primera evaluación fue de 4.5. Según Ali & Yosipovitch, (2013) el rango de pH de una piel sana es de 4 a 6, por lo que al ajustar la emulsión nos arrojó un resultado final de 5.5 siendo este producto compatible con las capas externas de la piel y evitando una posible irritabilidad cutánea.

4.1.2. Pruebas de Estabilidad

Estabilidad Acelerada

Para medir la estabilidad del producto se controló parámetros organolépticos (color, olor, aspecto y homogeneidad) como lo afirma (ONUDI, 2018). Luego de someter el producto a condiciones aceleradas (40°C, 4°C y temperatura ambiente) durante 15 días, se obtuvieron los resultados de las siguientes tablas

Tabla 8:*Resultados de estabilidad acelerada a 40°C*

Tratamiento	Parámetro	Control 1 (72 h)	Control 2 (144 h)	Control 3 (216 h)	Control 4 (288 h)	Control 5 (360 h)
Blanco	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
1%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Amarillento
	Olor	Propio	Impropio	Impropio	Impropio	Impropio
	Aspecto	Semi Sólido	Blando	Blando	Blando	Blando
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Amarillento	Amarillento	Amarillento
	Olor	Propio	Impropio	Impropio	Impropio	Impropio
	Aspecto	Semi Sólido	Blando	Blando	Blando	Blando
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
5%	Color	Blanquecino	Amarillento	Amarillento	Amarillento	Amarillento
	Olor	Impropio	Impropio	Impropio	Impropio	Impropio
	Aspecto	Blando	Blando	Líquido	Líquido	Líquido
	Homogeneidad	Sí	No	No	No	No

Fuente: Autor

Tabla 9:*Resultados de estabilidad acelerada a 2°C*

Tratamiento	Parámetro	Control 1 (72 h)	Control 2 (144 h)	Control 3 (216 h)	Control 4 (288 h)	Control 5 (360 h)
Blanco	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
1%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
5%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Fuente: Autor

Tabla 10:*Resultados de estabilidad acelerada a temperatura ambiente*

Tratamiento	Parámetro	Control 1 (72 h)	Control 2 (144 h)	Control 3 (216 h)	Control 4 (288 h)	Control 5 (360 h)
Blanco	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
1%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
5%	Color	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
	Aspecto	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido	Semi Sólido
	Homogeneidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Fuente: Autor

La estabilidad a 40°C de la emulsión Blanco no demostró ningún cambio en su apariencia durante todo el ensayo (Tabla 8), se mantuvo semi sólida, homogénea, con el olor característico propio y color blanco. La emulsión con principio activo al 1% cambió su aspecto y olor a partir del control 2, ablandando y cambiando su aroma al del principio activo. Su color presentó cambios en el control 5, volviéndose amarillento. Para la emulsión al 3% sus cambios en olor y aspecto fueron en el control 2; las características amarillentas del color se dieron en el control 3. La emulsión al 5% fue la que presentó cambios más drásticos en todas sus características (color, olor, aspecto, homogeneidad) a partir del control 2.

Al someter las muestras a bajas temperaturas (4°C) las muestras en todas sus concentraciones de principio activo (1, 3, 5%) incluidas el Blanco no presentaron ningún cambio en ningún aspecto del color, olor, aspecto o homogeneidad como se observa en la Tabla 9. Siendo el mismo caso para las 4 muestras sujetas a temperatura ambiente (Tabla 10)

Los principios activos incorporados en emulsiones como aceites o extractos vegetales pueden causar cambios en las propiedades de la emulsión (generalmente en las organolépticas) (Tabrizi et al., 2003)

Centrifugación

Luego de someter la muestra a centrifugación se observó que las fases de las formulaciones con diferentes concentraciones de principio activo se mantuvieron homogéneas y estables demostrando que el crecimiento y distribución del tamaño de gota en la emulsión es muy leve, esto se debe a la acción del emulsificante (André et al., s/f) y por las fuerzas intermoleculares de Van der Waals (Santamaría, 2011).

Pruebas Microbiológicas

En los tiempos actuales el control microbiológico de productos cosméticos es indispensable puesto que el riesgo biológico y sanitario que estos comprenden es mucho mayor,

por lo que es primordial garantizar la seguridad del consumidor ante posibles lesiones cutáneas o infecciones (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, 2007).

Se analizó la contaminación y se determinó la aceptación o rechazo del producto como se evidencia en la Tabla 11.

Tabla 11:

Resultados del control microbiológico

Tipo de Microorganismo	Límites aceptados por las normativas NTE-INEN-ISO	Resultados Obtenidos
Microorganismos mesófilos aerobios totales	Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^2 UFC/g o ml	5×10^2 UFC/g
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 1 g ó ml	Ausencia de <i>P. aeruginosa</i> en 1 g de muestra
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o ml	Ausencia de <i>S. aureus</i> en 1 g de muestra
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g o ml	Ausencia de <i>E. coli</i> en 1 g de muestra

Fuente: Autor.

Los resultados presentaron ausencia de *Pseudomona aeruginos* en medio de agar Cetrimida, *Staphylococcus aureus* en Manitol y *Escherichia coli* en MacConkey realizando la prueba confirmatoria en el medio de agar EMB, siguiendo las normativas NTE-INEN-ISO 22717, NTE-INEN-ISO 22718 y NTE-INEN-ISO 211.

Así como también el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) realizados según lo estipulado en la normativa NTE-INEN-ISO 21149 en agar Plate Count de microorganismos mesófilos aerobios totales resultaron un recuento de 5×10^2 entrando a los límites permitidos según las *normativas* vigente.

4.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Curva de calibración del ácido ascórbico

Para realizar una curva de referencia de ácido ascórbico en concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 y 7 $\mu\text{L}/\text{mL}$, se construyó una gráfica lineal a partir del porcentaje de captación del radical DPPH frente a la concentración como se detalla en la Tabla 12, con una regresión lineal (R^2) de 0.9971 y mediante la ecuación de la recta (Figura 2) se determinó un concentración inhibitoria (IC_{50}) de 5.7613 mg/mL ya que el ácido ascórbico es un compuesto puro que presenta alta capacidad antioxidante ya que elimina los radicales libres (Njus et al., 2020).

Tabla 12:

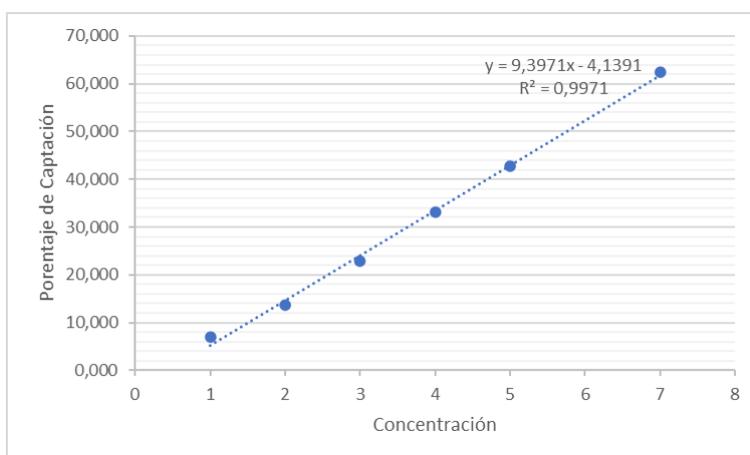
Porcentaje de captación del radical DPPH

Concentración ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Absorbancias	Porcentaje de Captación de DPPH
1	0.6115	6.996
2	0.567	13.764
3	0.507	22.890
4	0.44	33.080
5	0.3765	42.738
7	0.247	62.433
	IC_{50}	5.7613 mg/mL

Fuente: Autor

Figura 2:

Curva de calibración del ácido ascórbico



Fuente: Autor

Capacidad Antioxidante de la formulación cosmética a base de cannabinoides

En la Figura 3, se muestra la regresión lineal obtenida a partir de la formulación cosmética con aceite de cannabinoides al 1%, en donde la capacidad de captación del radical libre varía según la concentración de la formulación con el antioxidante, por lo que, a mayor capacidad antioxidante, las absorbancias obtenidas fueron menores. Se obtuvo un 52% de captación del radical DPPH a la mayor concentración de la emulsión (10mg/ml), dando un IC_{50} DE 9,522 mg/ml.

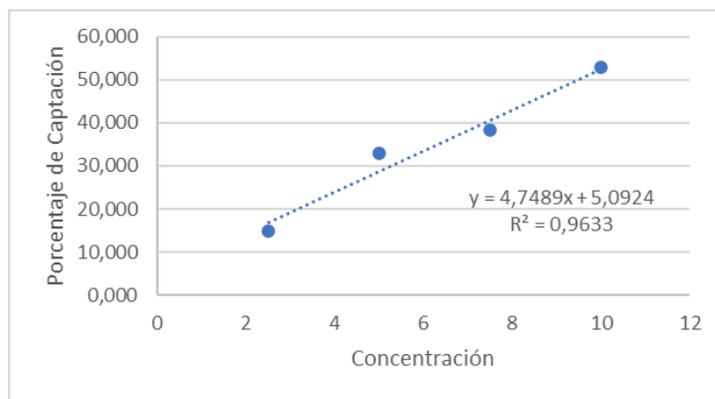
La formulación al 3% de aceite de cannabinoides presentó un porcentaje de captación del radical libre DPPH del 82% (Figura 4), a la mayor concentración del antioxidante en comparación con la emulsión al 1%, obteniendo una concentración de inhibición menor, (IC_{50} : 3,599 mg/ml), el valor del IC_{50} determina cuán activa es la muestra, en cuanto menor sea el IC_{50} , más capacidad de captación de radicales presenta.

En la emulsión con aceite de cannabinoides al 5% (Figura 5), el porcentaje de captación del radical osciló entre el 60 y 88%, determinando que la concentración en la que el 50% de los radicales son captados por la muestra es de 6,25 mg/ml, sin embargo, este valor es una aproximación experimental sin bases científicas por lo que no se pudo determinar el valor neto

del IC50 para esta concentración de muestra. Esto puede deberse a que utilizar concentraciones superiores al 3% de aceites en formulaciones cosméticas no es recomendado; puesto que en la legislación suiza sobre cosméticos se establece que la concentración máxima permitida de aceites esenciales en una formulación cosmética sin aclarado es del 3% (AEMPS, 2016)

Figura 3:

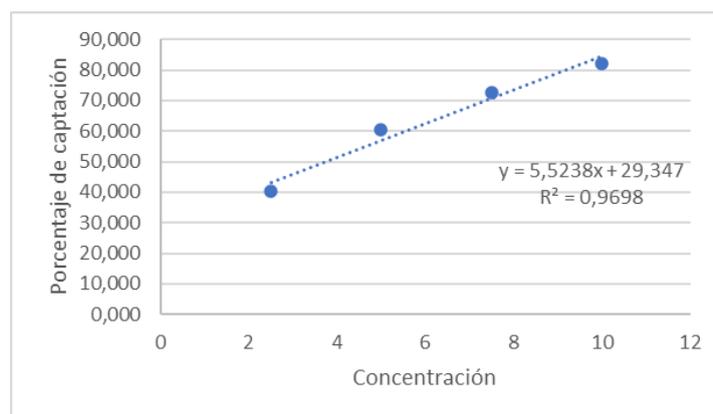
Curva de calibración para la cuantificación del porcentaje de captación del radical DPPH con el tratamiento al 1%



Fuente: Autor

Figura 4:

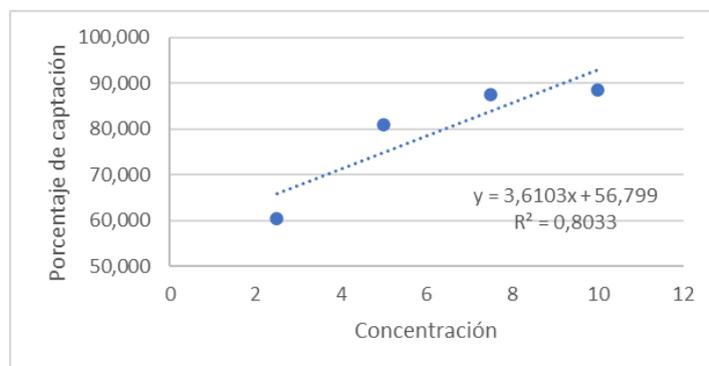
Curva de calibración para la cuantificación del porcentaje de captación del radical DPPH con el tratamiento al 3%



Fuente: Autor

Figura 5:

Curva de calibración para la cuantificación del porcentaje de captación del radical DPPH con el tratamiento al 5%



Fuente: Autor

Los estudios realizados al aceite de cannabinoides en formulaciones cosméticas son escasos, por lo que en la presente investigación se ha comparado con la capacidad antioxidante que posee el extracto y aceite de semilla de cáñamo. Se ha demostrado el poder antioxidante que las estructuras presentes en las plantas de *Cannabis sativa* L, como fenoles y/o flavonoides, poseen una alta capacidad de inhibir la acción de radicales libres, la cual representa un beneficio aprovechable para formulaciones cosmética (Pellegrini et al., 2021). Entre los compuestos que destacan en la composición de la especie, el cannabidiol (CBD) y tetrahidrocannabinol (THC), tienen un alto potencial antioxidante según Hampson et al., (2006) sugiriendo que las otras estructuras fitocannabinoides actúen de la misma manera frente a radicales libres.

4.3. Evaluación del factor de protección solar

El factor de protección solar (FPS) de la emulsión obtenido con los parámetros de Sayre et al., (1980) y la metodología descrita por Mansur et al., (1986) presentó los resultados de la Tabla 13, se evaluó de la misma manera como prueba de referencia, una dilución a 0.2 mg/mL de un extracto concentrado de *Cannabis sativa* L.

Tabla 13:*Factor de protección solar para cada tratamiento*

Muestra	Factor de Protección Solar
Crema Base	0.04
1%	0.07
3%	0.09
5%	0.13
Prueba de referencia	3.39

Fuente: Autor

Las emulsiones elaboradas con aceite de cannabinoides tuvieron un factor de protección solar de 0.04 para el tratamiento base sin principio activo; un valor de 0.07 para la emulsión a una concentración del 1% de aceite de cannabinoides; 0.09 para el tratamiento al 3% y para la concentración del 5% de aceite, el FPS fue de 0.13 siendo el más alto en comparación a los otros tratamientos. Por otro lado, el FPS para la prueba de referencia resultó en 3.39, un valor esperado ya que el extracto concentrado presenta mayor contenido de metabolitos secundarios, siendo los más abundantes los fenoles, compuestos bioactivos que le confieren la capacidad de fotoprotección (Pescheck et al., 2021) (Izzo et al., 2020).

4.4. Análisis Estadístico

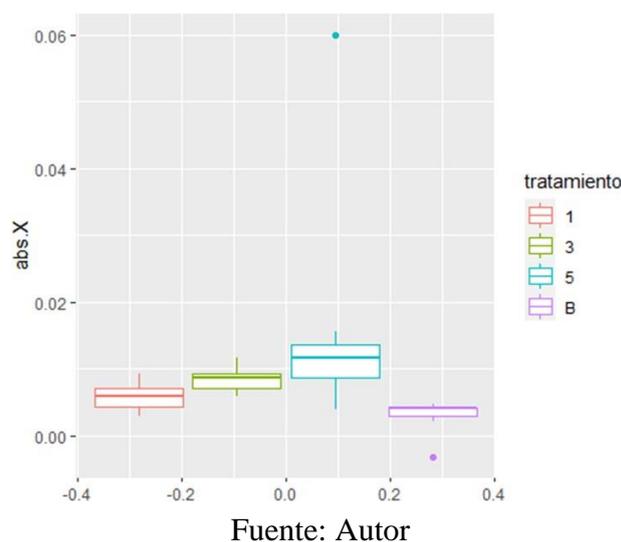
En primera instancia, se realizaron estadísticas descriptivas a los datos, mediante el programa estadístico Rstudio; se determinó que los datos cumplieran con el supuesto de normalidad a través de la prueba de Shapiro-Wilk, con un $p = 6,735 \times 10^{-8}$, demostrando que los datos no presentaron distribución normal, por lo que se aplicaron modelos no paramétricos para

determinar la influencia de las concentraciones del aceite de cannabinoides en la actividad fotoprotectora de la emulsión.

Mediante el test de Kruskal-Wallis, se determinó si existió diferencias relevantes entre los tratamientos, obteniendo un $p = 0,00221$, aceptando la hipótesis alternativa en la que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia significativa entre el factor de protección solar, ya que se obtuvo FPS más altos en las emulsiones que tenían mayor concentración del aceite de cannabinoides en comparación con la emulsión sin principio activo (Figura 6).

Figura 6:

Diagrama de cajas de los tratamientos frente a la media de absorbancias



Mediante el test de Wilcoxon, se contrastó cada uno de los tratamientos (1, 3, 5%) frente al blanco como se detalla en la Tabla 14, en cual el tratamiento al 1% y la emulsión sin principio activo no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por el contrario, existió diferencias significativas entre los tratamientos al 3% y 5% frente al tratamiento sin principio activo, siendo el tratamiento con 3% de aceite de cannabinoides el que presentó mejor comportamiento siguiendo la ley de Lambert-Beer, ley que define la absorción de radiación a una longitud de onda determinada va a ser directamente proporcional a la concentración de la

solución (analito) (Mänteles & Deniz, 2017), es así que, a mayor absorbancia se tendrá un mayor factor de protección solar.

Tabla 14:

Análisis comparativo de las diferencias entre tratamientos

	1	3	5
B	0.081	0.012	0.031

Fuente: Autor

Algunas investigaciones realizadas previamente con aceites esenciales de diferentes especies vegetales han demostrado que, al utilizarlos en formulaciones cosméticas, el factor de protección solar es mínimo (Gerónimo, 2022) en comparación con estudios en donde se utilizan extractos (Alayo Mendoza et al., 2018), contrastando con los resultados obtenidos en este estudio para el FPS con la muestra de referencia con extracto de *Cannabis Sativa L.*

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

Se confirma la hipótesis alternativa planteada en el estudio, al existir cambios positivos en los valores de los parámetros evaluados de la actividad antioxidante y factor de protección solar en las formulaciones elaboradas con aceite de cannabinoides, siendo estos considerados para la mejora de las características de la piel.

La concentración de aceite de cannabinoides al 1% y 3% incorporados en la formulación cosmética presentaron mejores características organolépticas y a su vez cumplieron con los requisitos microbiológicos de acuerdo con la normativa NTE-INEN-ISO considerándolas como un cosmético para uso tópico.

El aceite de cannabinoides al 1% y 3% incorporado en una formulación cosmética presentó actividad antioxidante frente al radical DPPH, convirtiéndose en un activo natural que puede ser incorporado en formulaciones cosméticas, dándole un valor agregado a la misma y brindando bondades que mejoren las características de la piel. Por otra parte, la formulación cosmética elaborado con aceite de cannabinoides al 5% presento mayor absorbancia en comparación con los otros tratamientos representando un mayor factor de protección solar, no obstante, no se recomienda utilizar el aceite de cannabinoides en concentraciones mayores al 3% debido a que se altera fácilmente la estabilidad de la formulación.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, con un nivel de confianza del 95% se determinó que, existe diferencia significativa entre los tratamientos, siendo la formulación al 3% la que presento mejor comportamiento frente al tratamiento sin principio activo.

Los resultados reflejados en este trabajo experimental demuestran que el uso de principios activos de especies vegetales en formulaciones cosméticas es un campo con mucho

potencial para investigar, mismo que permite ofertar productos que favorecen a la salud cutánea y estar acorde a las exigencias de los consumidores de hoy en día. En la presente investigación no se contempló el uso de extractos de *Cannabis sativa L* en las formulaciones, para determinar su actividad antioxidante y fotoprotectora, por lo que se sugiere en próximos estudios utilizar extractos de cáñamo (no psicoactivo), debido a que presenta un número de metabolitos secundarios superior que pueden prometer una protección más alta frente a la radiación solar.

BIBLIOGRAFÍA

AEMPS. (2016). *GUÍA SOBRE ACEITES ESENCIALES*. Ministerio de Sanidad Español.

https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/Guia_Aceites_Esenciales.pdf

AEMPS. (2021). *Guía para producir materias primas y productos cosméticos seguros desde el punto de vista microbiológico y de la conservación*. Ministerio de Sanidad Español.

<https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/cosmeticos-cuidado-personal/2021/guia-conservacion.pdf>

Agustí, S. (2007). *Aumento de la radiación ultravioleta: Impacto sobre los océanos polares*. 24.

Alayo Mendoza, W. E., Fiestas Jacinto, R., Ayala Jara, C. I., & Castillo Saavedra, E. F.

(2018). Desarrollo de una crema de hojas de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) con actividad fotoprotectora in vitro. *Arnaldoa*, 25(1), 115–126.

<https://doi.org/10.22497/arnaldoa.251.25107>

Ali, S., & Yosipovitch, G. (2013). Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Acta*

Dermato Venereologica, 93(3), 261–267. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>

Al-Sabagh, A. M. (2002). The relevance HLB of surfactants on the stability of asphalt

emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1–3), 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01115-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01115-3)

André, V., Willenbacher, N., Debus, H., Börger, L., Fernandez, P., Frechen, T., & Rieger, J.

(s/f). *Prediction of Emulsion Stability: Facts and Myth*.

Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., & Ventura Martínez, R. (2014).

Cannabis sativa L., una planta singular. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(4), 1–6.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002).

Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.

<https://doi.org/10.1039/B009171P>

ANVISA. (2004). *Cosmetics Products Stability Guide* (Vol. 1).

ARCSA. (2018). *NORMATIVA SANITARIA PARA PRODUCTOS COSMETICOS, PRODUCTOS DE HIGIENE*. Registro Oficial 968.

ARCSA. (2021). *Arcsa emite normativa para regular productos que contengan cannabis no psicoactivo en Ecuador*. Control Sanitario.

<https://www.controlsanitario.gob.ec/normativa-cannabis/>

Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*, *9*(1), 21.

<https://doi.org/10.3390/antiox9010021>

Balant, M., Gras, A., Ruz, M., Vallès, J., Vitales, D., & Garnatje, T. (2021). Traditional uses of Cannabis: An analysis of the CANNUSE database. *Journal of Ethnopharmacology*, *279*, 114362. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114362>

Basset-Seguin, N., & Herms, F. (2020). Update in the Management of Basal Cell Carcinoma. *Acta Dermato-Venereologica*, *100*(11), adv00140. <https://doi.org/10.2340/00015555-3495>

Baswan, S. M., Klosner, A. E., Glynn, K., Rajgopal, A., Malik, K., Yim, S., & Stern, N. (2020). Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders.

Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, *13*, 927–942.

<https://doi.org/10.2147/CCID.S286411>

Batlle, C. (2005). Factor de protección solar. *Offarm*, *24*(6), 65–72.

Bhattacharjee, D., Patil, A., Jain, V., & preethi.s, P. (2021). A comparison of Natural and Synthetic Sunscreen Agents: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*, *13*. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2021.13.01.524>

Bibette, J., Calderon, F. L., & Poulin, P. (1999). Emulsions: Basic principles. *Reports on*

- Progress in Physics*, 62(6), 969–1033. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/62/6/203>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Brenneisen, R. (2007). Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. En M. A. ElSohly (Ed.), *Marijuana and the Cannabinoids* (pp. 17–49). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2
- Caldwell, M. M., Björn, L. O., Bornman, J. F., Flint, S. D., Kulandaivelu, G., Teramura, A. H., & Tevini, M. (1998). Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46(1), 40–52. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00184-5)
- Campanero, M. (2019). EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE PRODUCTOS COSMÉTICOS: NECESIDAD Y PROCEDIMIENTO. *Primavera*, 10.
- Castañeda, M. (2019). *Evaluación de la actividad fotoprotectora in vitro y efecto fotoprotector in vivo de una formulación a base de extracto acuoso liofilizado de Lepidium meyenii (Maca)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Catalán, M. (2020). *Historia de los cosméticos: Características y tipos* [Tandem HSE]. <https://www.tandemhse.com/seguridad-de-producto-blog/historia-de-los-cosmeticos/>
- Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (Eds.). (2017). *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>
- Charitos, I. A., Gagliano-Candela, R., Santacroce, L., & Bottalico, L. (2021). The Cannabis Spread throughout the Continents and its Therapeutic Use in History. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 21(3), 407–417. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200520095900>
- Chaudhri, S. K., & Jain, N. K. (2009). History of cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutics*

- (*AJP*), 3(3), Art. 3. <https://doi.org/10.22377/ajp.v3i3.260>
- Código Orgánico Integral Penal [COIP]. Art. 2019 y 222 de 2014. 10 de febrero de 2014
(Ecuador)
- Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association. (2007). *CTFA Microbiology Guidelines* (John F. Krowka, Ph.D. John E. Bailey, Ph.D.).
<https://pdfcoffee.com/ctfamicrobiologyguidelinespdf-3-pdf-free.html>
- Costa, I. (2015). Phytocosmetics – where nature meets well-being. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2, 1–1.
<https://doi.org/10.15171/ijpni.2015.01>
- Dangles, O. (2012). Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 692–714.
<https://doi.org/10.2174/138527212799957995>
- Davis, H. T. (1994). Factors determining emulsion type: Hydrophile—lipophile balance and beyond. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 9–24. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02929-6](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02929-6)
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25–39. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00120-5)
- Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4–13.
[https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00204-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00204-9)
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222–12248.
<https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Dos Santos, H. (2010). Emulsiones Cosméticas. *Cosmetics & Toiletries*, 1.
- EPA. (2001, septiembre). *El Sol, la Radiación Ultravioleta y Usted*. Guía SunWise para la

exposición al sol.

https://www.epa.gov/sites/default/files/documents/sunuvu_spanish.pdf

Food and Drug Administration (FDA). (s/f). *Sunscreen drug products for over-the-counter drugs: Proposed safety, effective and labeling conditions.*

Fraguas-Sánchez, A. I., & Torres-Suárez, A. I. (2018). Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*, 78(16), 1665–1703. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>

Fuentes Lorenzo, J. L. (2019). Las plantas como fuente de compuestos fotoprotectores frente al daño en el ADN producido por la radiación ultravioleta. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(168), 550–562. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.841>

Gadhawe, A. (2014). *Determination of Hydrophilic-Lipophilic Balance Value*. 3(4).

Garrote, A., & Bonet, R. (2008). Fotoprotección. Factores de protección y filtros solares. *Offarm*, 27(5), 63–73.

Geoffrey, K., Mwangi, A. N., & Maru, S. M. (2019). Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 27(7), 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.003>

Gerónimo, Y. (2022). *Composición química, actividad antioxidante y efecto fotoprotector del aceite esencial de Senecio calvus Cuatrec en una crema base*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Griffin, W. C. (1954). Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 5, 249–256.

Gutteridge, J. M. C. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91(2–3), 133–140. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90033-7)

- Haider, A. J., Jameel, Z. N., & Al-Hussaini, I. H. M. (2019). Review on: Titanium Dioxide Applications. *Energy Procedia*, 157, 17–29.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.159>
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Lolic, M., Wink, D., Rosenthal, R., & Axelrod, J. (2006). Neuroprotective Antioxidants from Marijuana. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 274–282. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06193.x>
- He, hailun, Li, anqi, Li, shiqin, Tang, jie, Li, li, & Xiong, lidan. (2021). Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, 111161.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111161>
- Hillion, M., Mijouin, L., Jaouen, T., Barreau, M., Meunier, P., Lefeuvre, L., Lati, E., Chevalier, S., & Feuilloley, M. G. J. (2013). Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations. *MicrobiologyOpen*, 2(6), 953–961.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.138>
- Ibáñez, S., & Suñé, J. M. (1968). Determinación del pH: II. Aplicación concreta a productos semisólidos, cosméticos y farmacéuticos. *Ars Pharm*, IX(215).
- ICI Americas. (1980). *THE HLB SYSTEM a time-saving guide to emulsifier selection* (CHEMMUNIQUE).
- Inocente Camones, M. Á., Tomas Chota, G. E., Huamán Malla, J., Muñoz Jáuregui, A. M., García Morán, R. I., Quispe Fuentes, G., Palomino Pacheco, C. J., & Taype Espinoza, E. D. R. (2014). *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FOTOPROTECTORA in vitro DE UNA LOCIÓN Y GEL ELABORADOS CON EXTRACTO ESTABILIZADO DE CAMU CAMU (Myrciaria dubia Kunth.)*. 80(1).
- ISO. (2018). *International Organization for Standardization* (Patent Núm. ISO/TR 18811).
- Izzo, L., Castaldo, L., Narváez, A., Graziani, G., Gaspari, A., Rodríguez-Carrasco, Y., &

- Ritieni, A. (2020). Analysis of Phenolic Compounds in Commercial *Cannabis sativa* L. Inflorescences Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules*, 25(3), 631. <https://doi.org/10.3390/molecules25030631>
- Kaur, C. D., & Saraf, S. (2010). In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*, 2(1), 22–25. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60586>
- Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., & Kobayashi, J. (Eds.). (2017). *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa* (Vol. 103). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9>
- Lan, C.-C. E. (2019). Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Experimental Dermatology*, 28(S1), 23–27. <https://doi.org/10.1111/exd.13818>
- Lodén, M., Beitner, H., Gonzalez, H., Edström, D. W., Åkerström, U., Austad, J., Buraczewska-Norin, I., Matsson, M., & Wulf, H. C. (2011). Sunscreen use: Controversies, challenges and regulatory aspects: Sunscreen use. *British Journal of Dermatology*, 165(2), 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10298.x>
- Mansur, J. de S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. d'Ascensão, & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. bras. dermatol.*, 121–124.
- Mäntele, W., & Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 965–968. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>
- March, G. A., Garcia-Loygorri, M. C., Eiros, J. M., Bratos, M. A., & Ortiz de Lejarazu, R. (2018). Microbiological Quality in Cosmetics. En *Analysis of Cosmetic Products* (pp. 585–597). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00018-7>

- Matthäus, B. (2002). Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3444–3452.
<https://doi.org/10.1021/jf011440s>
- Moreno, M., & Moreno, L. (2010). Fotoprotección. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 18, 31–39.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49(9), 978–986.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>
- Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y.-J., & Schlegel, H. B. (2020). Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>
- Novak, J., & Blüthner, W.-D. (Eds.). (2020). *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants* (Vol. 12). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1>
- ONUDI. (2018). *Recomendaciones para el desarrollo de estudios de estabilidad de productos cosméticos*. Bookvertising.
- Orús, A. (2022). *Sector cosmético: Crecimiento anual mundial 2004-2021*. Statista.
<https://es.statista.com/estadisticas/601048/porcentaje-de-crecimiento-anual-en-cosmetica-2004/>
- Pellegrini, M., Palmieri, S., Ricci, A., Serio, A., Paparella, A., & Lo Sterzo, C. (2021). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. cv ‘Futura 75’ essential oil. *Natural Product Research*, 35(24), 6020–6024.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813139>
- Pérez, L. L., & Bashline, B. (2019). Skin Cancer: Prevention. *FP Essentials*, 481, 28–31.

- Pescheck, F., Rosenqvist, E., & Bilger, W. (2021). Plants and UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 661–662. <https://doi.org/10.1111/ppl.13577>
- Poveda, M. J. (2019). *FORMULACIÓN DE UN PROTECTOR SOLAR A BASE DE Oreocallis grandiflora*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules*, 26(9), 2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Ramirez-Granados, J. C., Díaz-Pérez, C., Gomez-Luna, B., & Gasca-Tirado, R. (2017). *Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de Salvia hispanica L. para la Fotoprotección de la Piel*.
- Ranalli, P. (1999). *Advances in Hemp Research*. CRC Press.
- Santamaría, C. A. L. (2011). *Modelo de Estabilidad de Emulsiones Poliméricas*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sayre, R., Desrochers, D., & Marlow, E. (1980). Sunscreen testing methods: In vitro predictions of effectiveness. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 31(1), 133–143.
- Serpone, N., Dondi, D., & Albini, A. (2007). Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*, 360(3), 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Singh, S., Lohani, A., Mishra, A. K., & Verma, A. (2019). Formulation and evaluation of carrot seed oil-based cosmetic emulsions. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy: Official Publication of the European Society for Laser Dermatology*, 21(2), 99–107.

<https://doi.org/10.1080/14764172.2018.1469769>

Statista Market Forecast. (2022). *Beauty & Personal Care—Global*. Statista.

<https://www.statista.com/outlook/cmo/beauty-personal-care/worldwide>

Stevanato, R., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *69*(1), 71–77.

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.014>

Svobodová, A., Psotová, J., & Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers*, *147*(2), 137–145.

<https://doi.org/10.5507/bp.2003.019>

Tabrizi, H., Mortazavi, S. A., & Kamalinejad, M. (2003). An in vitro evaluation of various *Rosa damascena* flower extracts as a natural antisolar agent. *International Journal of Cosmetic Science*, *25*(6), 259–265. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2003.00189.x>

Tanner, P. R. (2006). Sunscreen Product Formulation. *Dermatologic Clinics*, *24*(1), 53–62.

<https://doi.org/10.1016/j.det.2005.09.002>

Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., & Blasco, J. (Eds.). (2020). *Sunscreens in Coastal Ecosystems: Occurrence, Behavior, Effect and Risk* (Vol. 94). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-56077-5>

Turner, C. E., Elsohly, M. A., & Boeren, E. G. (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L.

XVII. A Review of the Natural Constituents. *Journal of Natural Products*, *43*(2), 169–234. <https://doi.org/10.1021/np50008a001>

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>

ANEXOS

Figura 7:

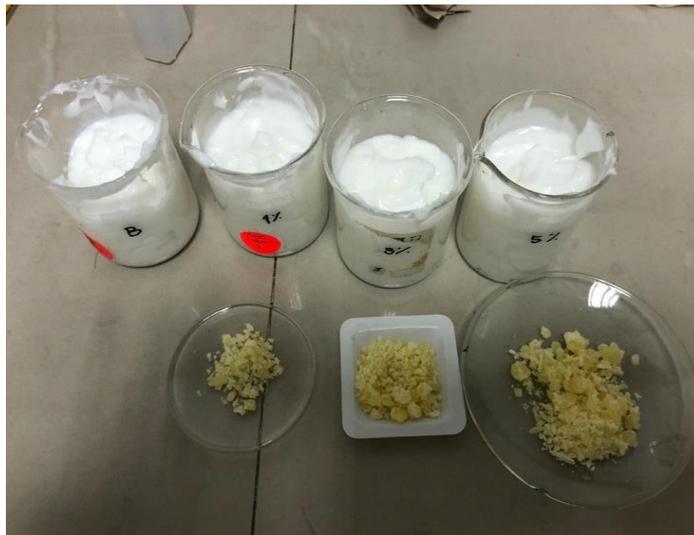
Formulación de una emulsión dermocosmética madre



Fuente: Autor

Figura 8:

Preparación de las emulsiones con diferentes concentraciones de principio activo



Fuente: Autor

Figura 9:

Resultados de la exposición de las emulsiones con diferentes concentraciones de principio activo a centrifugación



Fuente: Autor

Figura 10:

Preparación de las emulsiones para las pruebas de estabilidad acelerada



Fuente: Autor

Figura 11:

Preparación de las diluciones de ácido ascórbico para espectrofotometría Visible a 517nm



Fuente: Autor

Figura 12:

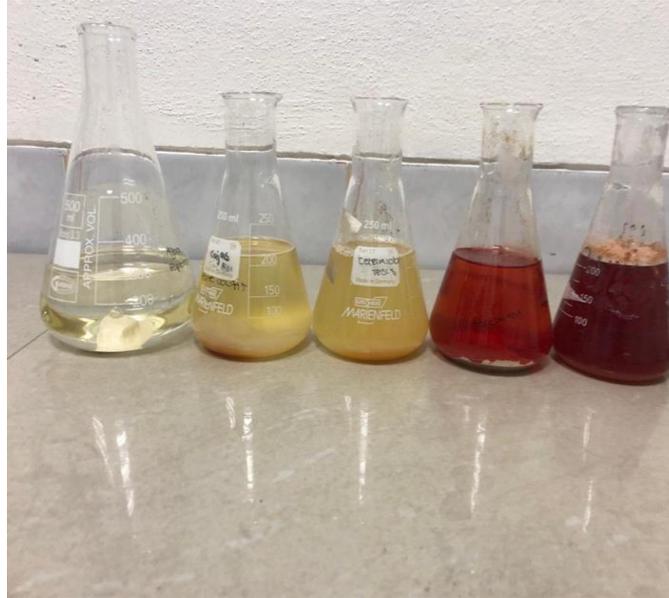
Preparación de las diluciones de los tratamientos para espectrofotometría Visible a 517nm



Fuente: Autor

Figura 13:

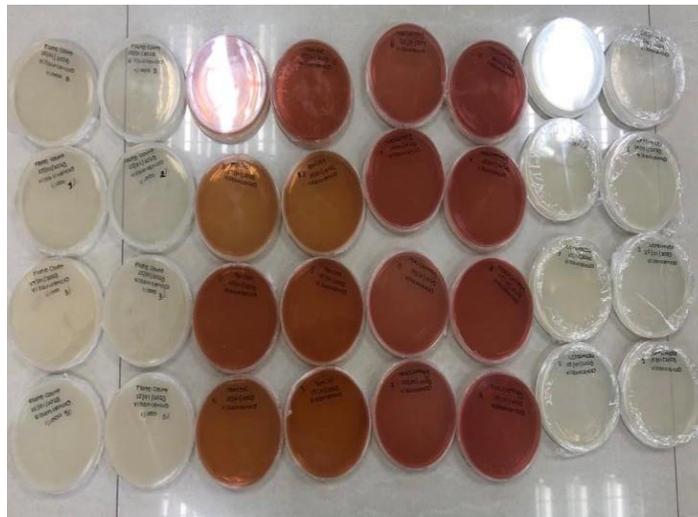
Preparación de medios de cultivo para el control microbiológico



Fuente: Autor

Figura 14:

Resultados del análisis microbiológico



Fuente: Autor

Figura 15:

Preparación de las diluciones para evaluación espectrofotométrica UV-VIS de 290-320 nm de las muestras



Fuente: Autor