

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

UNIDAD DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

Tesis previa a la obtención del título de: MAGISTER EN

CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

TEMA:

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA ANTIBACTERIANA DE UNA MEZCLA DE PARABENOS FRENTE AL ACEITE DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* Lamiaceae) UTILIZADOS COMO CONSERVANTES EN UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA.

AUTORA:

MOSQUERA TAYUPANTA TATIANA DE LOS ÁNGELES

DIRECTORA:

MALDONADO RODRÍGUEZ MARÍA ELENA

QUITO, MARZO 2014

DECLACATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaro que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta
CC. 1711668010

DEDICATORIA

A la dedicación y esfuerzo que realizaron todas las personas que han apoyado de diferente manera a la consecución de este éxito profesional en mi vida. A todas las personas que toman su tiempo, para leer lo que costo tanto trabajo, pero genera tanta satisfacción.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que han contribuido a este desarrollo académico, en mi vida. “Agradece la luz de la llama pero nunca olvides el pie del candil que constante y paciente la sostiene en la sombra” gracias querida familia por su comprensión y apoyo, al permitirme sacrificar su tiempo en la consecución de mi objetivo. “Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran” gracias a todos y a todas que contribuyeron de diferente forma a reforzar esta investigación, gracias apreciados amigos María Elena y Paco por su ayuda incondicional. “El tiempo que uno pasa riendo es el tiempo que se gana viviendo y aprendiendo” gracias Mary, Carina, Erika, Edison y Marco compañeros de labores, que convierten el día a día, en el agradable reto del deber cumplido. A la Universidad Politécnica Salesiana por las oportunidades, y el apoyo en mi desarrollo profesional y académico.

ÍNDICE GENERAL

DECLACATORIA DE RESPONSABILIDAD	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
SIGLAS Y ACRÓNIMOS	xiii
GLOSARIO.....	xv
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN	3
1.1. PRESENTACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. ANTECEDENTES TEÓRICOS REFERENTES AL PROBLEMA	4
1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EFECTUADA.....	6
1.4. OBJETIVO GENERAL.....	7
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
1.6. HIPÓTESIS	8
CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO	9
2.1 ESTADO DEL ARTE	9
2.2 ENFOQUE TEÓRICO	16

2.2.1	Cosmética natural	16
2.2.1.1	Definiciones	17
2.2.1.2	Grupos fitoquímicos	19
2.2.2	Conservantes cosméticos	21
2.2.2.1	Conservantes naturales	22
2.2.2.2	Conservantes sintéticos	23
CAPÍTULO 3 - ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA		27
3.1	ÁREA DE ESTUDIO	27
3.1.1	Romero <i>Rosmarinus officinalis</i>	27
3.1.1.1	Composición Química	28
3.1.1.2	Actividad Microbiológica	30
3.1.2	Formulaciones Cosméticas	31
3.1.2.1	Champús	34
3.2	METODOLOGÍA	36
3.2.1	Recolección del material vegetal silvestre	36
3.2.2	Extracción de Aceite Esencial de Romero	37
3.2.3	Control de Calidad del Aceite Esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) ...	38
3.2.3.1	Características Organolépticas	39
3.2.3.2	Densidad Relativa	39
3.2.3.3	Índice de Refracción	41
3.2.4	Caracterización química del Aceite Esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	42
3.2.5	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	45
3.2.5.1	Disposiciones Generales del Análisis	48
3.2.5.2	Equipo utilizado	50
3.2.5.3	Procedimiento	51
3.2.6	Elaboración de la fórmula cosmética de estudio	55

3.2.6.1 Selección de los ingredientes de la formulación	55
3.2.6.2 Método de elaboración	58
3.2.6.3 Control de Calidad del Champú.	59
3.2.7 Ensayo de la eficacia de la conservación antimicrobiana (Challenge Test)	60
3.2.7.1 Objetivos de la Prueba.....	61
3.2.7.2 Pasos de la Prueba	61
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
4.1 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i>) 66	
4.1.1 Rendimiento del Aceite Esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) mediante el método de hidrodestilación.	66
4.2 CONTROL DE CALIDAD DEL AE DE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i>	66
4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO	67
4.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO	69
4.5 FORMULAS COSMÉTICAS.- CHAMPÚS.....	70
4.5.1 Fórmulas Unitarias	70
4. 5.2 Control de Calidad de las fórmulas unitarias (Champús)	74
4.5.2.1 Control de Calidad en Proceso	74
4.5.2.2 Control de Calidad del Producto Terminado.....	75
4.6 EFICACIA DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA EN LAS FORMULACIONES COSMÉTICAS (CHALLENGE TEST).....	76
CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	94
5.1 CONCLUSIONES	94
5.2 RECOMENDACIONES.....	96
BIBLIOGRAFÍA	98

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: PRINCIPALES COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i> DE DIFERENTES ORÍGENES.	29
TABLA N° 2: CONDICIONES EXPERIMENTALES DE EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL AE DE ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i>) POR DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR.....	38
TABLA N° 3 : PARÁMETROS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA ESTABLECER LA CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE).....	39
TABLA N° 4: PARÁMETROS DEL GC-MS CARACTERIZACIÓN QUÍMICA AE ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	44
TABLA N° 5 : COMPOSICIÓN MEDIO MÜLLER HINTON AGAR	49
TABLA N° 6: EQUIPOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)	51
TABLA N° 7 : MÉTODO DE ACTIVACIÓN CEPAS ATCC.....	52
TABLA N° 8: INGREDIENTES EN UNA FORMULACIÓN DE UN CHAMPÚ.....	55
TABLA N° 9: CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA EFICACIA PRESERVANTE METODO ISO 11930:2012	65
TABLA N° 10: CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL AE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i>	67
TABLA N° 11: RESULTADOS DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO (GCMS) AE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i>	68
TABLA N° 12: DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN AE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i>	69
TABLA N° 13: FÓRMULA UNITARIA 1 (MEZCLA DE PARABENOS).....	72

TABLA N° 14: FÓRMULA UNITARIA 2 (AE 1%).....	72
TABLA N° 15: FÓRMULA UNITARIA 3 (AE 1,5%).....	73
TABLA N° 16 : FÓRMULA UNITARIA 4 (AE 2,5%).....	73
TABLA N° 17 : FÓRMULA UNITARIA 5 (SIN CONSERVANTE).....	74
TABLA N° 18: VISCOSIDAD DE LAS FÓRMULAS ANTES DE LA INCORPORACIÓN DEL CONSERVANTE Y DEL AE DE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i>	74
TABLA N° 19 : VALORES DE VISCOSIDAD Y pH DE LAS FÓRMULAS UNITARIAS.....	75
TABLA N° 20 : CRONOGRAMA DE TRABAJO PARA LA COMPROBACIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	77
TABLA N° 21 : CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 1 (MEZCLA DE PARABENOS).....	78
TABLA N° 22: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 1 (MEZCLA DE PARABENOS).....	79
TABLA N° 23: CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 2 (AE 1%)	81
TABLA N° 24: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 2 (AE 1%).....	82
TABLA N° 25: CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 3 (AE 1,5%)	84
TABLA N° 26: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 3 (AE 1,5%).....	85
TABLA N° 27: CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 4 (AE 2,5%)	87
TABLA N° 28: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO FÓRMULA 4 (AE 2,5%)	88
TABLA N° 29: CONTAJE MICROBIANO FORMULA UNITARIA 5 (SIN CONSERVANTE)	90
TABLA N° 30: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO FORMULA 5 (SIN CONSERVANTE)	91

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DE LA CARGA MICROBIANA EN LA FÓRMULA 1	80
GRÁFICO N° 2 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DE LA CARGA MICROBIANA EN LA FÓRMULA 2	83
GRÁFICO N° 3 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA FÓRMULA 3	86
GRÁFICO N° 4: VARIACIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA FÓRMULA 4	89
GRÁFICO N° 5 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA FÓRMULA 5	92

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Porcentaje de Rendimiento.....	38
Ecuación 2 : Determinación de la densidad relativa	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado de análisis <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027	106
Anexo 2: Certificado de análisis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	108
Anexo 3: Certificado de análisis <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	110
Anexo 4 : Certificado de análisis <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	112
Anexo 5 : Certificado de Análisis <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	114
Anexo 6 : Ficha Técnica Sodium Laureth Sulfate.....	115
Anexo 7: Ficha Técnica Cocoamidopropilbetaína	117
Anexo 8 : Ficha técnica PEG-150 pentaeritritil tetraestearato y PEG-6 glicéridos caprílicos/capricos	119
Anexo 9: Ficha Técnica Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben	126

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite Esencial
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
Aw	Actividad de agua
ATCC	American Type Culture Collection
COLIPA	Cosmetics Europe – The Personal care Association.
CAN	Comunidad Andina De Naciones
c.s.p	Cantidad suficiente para
EAC	Eczema alérgico de contacto
FDA	Food and Drug Administration
g	gramos
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectroscopy
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
INCI	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
msnm	metros sobre el nivel del mar
nm	nanómetros

RAM	Reacciones adversas a medicamentos
rpm	revoluciones por minuto
SCCS	Comité Científico de la Unión Europea de Seguridad para el Consumidor
SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
TSB	Tryptic Soy Broth

GLOSARIO

A

Actividad de agua (aw): Se entiende como actividad de agua (valor aw), la humedad en equilibrio de un producto, determinada por la presión parcial del vapor de agua en su superficie.

B

Bioactivo: Compuesto químico presente en la droga vegetal responsable de los efectos terapéuticos previamente constatados

C

Concentración mínima inhibitoria: Mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento "*in vitro*" de una población bacteriana previamente estandarizada (concentración conocida de gérmenes).

D

Droga vegetal: Aquella parte de la planta (raíz, tallos, hojas, sumidades, corteza, etc.) o derivado de éstas (goma, resina, látex, etc.) que luego de ser colectada, procesada y conservada (secado por ejemplo), posee una composición y propiedades tales que posibiliten su empleo medicinal, siendo reconocida por las farmacopeas como la responsable de las virtudes terapéuticas.

E

Eczema: Afección inflamatoria aguda o crónica de la piel caracterizada por la aparición de placas rojas algo sobreelevadas y que producen picor; en ellas se suelen desarrollar pequeñas ampollas que al romperse fácilmente forman costras amarillentas

Emulsificante: Sustancias que hacen posible la formación o el mantenimiento de una mezcla homogénea de dos o más fases no miscibles, como el aceite y el agua, por

alteración de su tensión superficial.

F

Forma cosmética: Presentación individualizada de un producto cosmético listo para su empleo

Fórmula unitaria: Lista cuantitativa de los ingredientes de una forma cosmética.

H

Halo de inhibición: Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

I

Inóculo: Determinados números de microorganismos procedentes del mismo clon.

P

Preservantes: Un preservante, es una sustancia que inhibe la propagación de microorganismos tales como bacterias y hongos. Estos productos son utilizados para prolongar la vida útil de los productos, pueden también ser nombrados como conservantes, y se pueden clasificar en naturales y sintéticos

RESUMEN

Los cosméticos representan un mercado en desarrollo. Considerando que todos los cosméticos necesitan conservantes, ingredientes capaces de controlar la carga microbiana a niveles aceptables, durante el tiempo de uso del producto y dentro del plazo de tiempo de vida útil. La investigación de ingredientes que puedan cumplir este papel es interesante, mucho más al tratarse de un ingrediente de origen natural, que a más de la propiedad conservante tiene otras funciones en el producto, el aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis*, podría considerarse como una alternativa de conservantes.

El estudio compara la capacidad de conservación antimicrobiana en una formulación cosmética, de dos ingredientes con acción antibacteriana, el uno de origen sintético: una mezcla de parabenos (*Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben*), muy utilizados en la industria cosmética a pesar de sus cuestionamientos; y el otro de origen natural el aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*), también utilizado en la industria cosmética con características antioxidante y antimicrobiana, especialmente en tónicos.

Se realizan cinco formulaciones de champús, en las que varía únicamente el ingrediente con acción conservante: una fórmula con un conservante comercial, correspondiente a una mezcla de parabenos al 0,7% concentración aceptada por regulaciones internacionales como COLIPA (Cosmetics Europe – The Personal care Association), tres utilizando aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* al 1, 1,5 y 2,5%, y la quinta sin ninguno de los ingredientes antibacterianos. Se aplica el método de Eficiencia Preservante ISO 11930:2012 de la Regulación Europea 1223/2009 (Challenge Test).

El aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) incorporado en una formulación cosmética desde una concentración del 1% genera una eficacia conservante similar a la que presenta un conservante comercial constituido por una mezcla de parabenos incorporado a la formulación en una concentración del 0,7%. El aceite esencial puede ser considerado un sistema conservante aceptable.

PALABRAS CLAVE: conservantes, parabenos, aceite esencial, *Rosmarinus officinalis*, Challenge test.

ABSTRACT

Cosmetics are a developing market and as such the need to research suitable preservatives is important. All items of cosmetic use require an a preservative, or substance that will inhibit bacterial growth in its lifetime. The selected option for the current project, is the essential oil of Rosemary, which presents preservative qualities and is a natural ingredient, and as such it can be considered as a main ingredient in cosmetic formulations.

The study compares the antimicrobial abilities of two ingredients in two cosmetic formulations. The first one is a mixture of parabens (Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben , Propylparaben , Butylparaben , Isobutylparaben) , widely used in the cosmetics industry despite the questioning that exists in regards to their safety. The compounds in the naturally occurring essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) contain a number of tonic compounds and is also used in the cosmetic industry for its antioxidant and antimicrobial properties.

Five formulations of shampoos have been prepared, in which the only variation was the compound used as a preservative and it's action. A formula containing a commercial preservative, corresponding to 0.7% concentration of parabens (which is accepted by international regulations and regulatory bodies such as COLIPA; Cosmetics Europe - The Personal care Association) three combinations using essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) 1, 1.5 and 2.5 %, and the fifth with none of the antibacterial ingredients. Method ISO 11930:2012 Preservative Efficiency of EC Regulation 1223/2009 (Challenge Test) applies.

The essential oil, incorporated to the cosmetic formulations from the lowest concentration of 1% generates a similar preservative efficacy as the commercially available preservatives that comprise a mixture of parabens incorporated in the formulation. The essential oil can be considered an acceptable preservative system

Keywords: preservatives, parabens, essential oil, *Rosmarinus officinalis*, Challenge test.

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1. PRESENTACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cosmética natural representa todavía un segmento minoritario de consumo en comparación con la cosmética convencional. Sin embargo, los estudios de mercado confirman una gran tendencia de crecimiento en los próximos años, en esta categoría, se estima un crecimiento del 15% frente al 5% global de los restantes productos de cuidado personal, (Alcalde, 2010) con esta consideración se hace necesario la investigación de materias primas vegetales, que podrían ser consideradas alternativas en formulaciones cosméticas.

La tendencia hacia una cosmética natural y la falta de estudios de ingredientes naturales que puedan ser incorporados en formulaciones cosméticas, son los principales argumentos que motivan el presente trabajo de investigación.

Dentro de todos los componentes que integran una formulación cosmética, es de especial importancia, los conservantes o preservantes, ingredientes que le confieren al producto la característica de seguridad, entendida por los consumidores como: “la confianza de que el producto mantendrá sus propiedades durante un período de tiempo establecido”. Desde este punto de vista se convierte la denominada “calidad microbiológica” de los productos cosméticos, más que una exigencia de vigilancia sanitaria, una exigencia del consumidor relacionada con la calidad del producto que va a utilizar en su piel y en sus cabellos. (Vera, 2004).

En muchos casos la investigación de conservantes naturales, ha generado resultados que no son aplicables o rentables para la industria; pero este tipo de investigaciones es justificado hoy en día, con la tendencia del mercado hacia una cosmética natural.

La presente investigación, pretende fundamentar el uso de activos botánicos en formulaciones cosméticas, tanto dentro de la categoría de cosmética de natural como en la

cosmética de síntesis. La comprobación de la eficacia antimicrobiana de un aceite esencial relacionada con el poder conservante que pueda ejercer en la formulación, podría permitir el reemplazo de ingredientes sintéticos por activos naturales, información de interés en la Tecnología Cosmética.

1.2. ANTECEDENTES TEÓRICOS REFERENTES AL PROBLEMA

Las plantas en su medio tienen un poder de auto conservación, pues a pesar de estar rodeadas de un ambiente que predispone a sufrir infestaciones de toda clase de microorganismos: bacterias, mohos, levaduras; resisten a estas fuerzas naturales de desintegración, gracias a las sustancias químicas presentes en las partes de la planta, que le permiten llevar acabo eficientemente este mecanismo natural. Y son estas evidencias lo que ha generado que plantas sean utilizadas para diferentes patologías, dentro de la medicina tradicional, siendo está a la vez la base en la que se han diseñado investigaciones, que permitan determinar los componentes responsables de la actividad atribuida.

Muchas plantas han sido consideradas como una alternativa interesante de compuestos antibacterianos, que no sólo puede reducir riesgos a la salud, sino por la diversidad de componentes, incluso otorgarle beneficios adicionales a un producto. Y aunque existen muchas investigaciones que prueban la capacidad antibacteriana *in vitro* de plantas, “los resultados no son directamente comparables debido a las diferencias metodológicas, tales como la elección de la planta, extracto (s), microorganismo (s) de prueba y métodos antimicrobianos” (Janssen, 1987)

En el caso del material de estudio de la presente investigación, el Romero (*Rosmarinus officinalis*) ha sido objeto de algunas investigaciones en las que se resaltan la actividad antimicrobiana del aceite esencial, en la realizada por Hammer genera como resultado que la concentración mínima inhibitoria (MIC) del aceite esencial se encuentre en un rango del 0,5 % v/v hasta > 2% v/v dependiendo del microorganismo en estudio, los resultados frente a los diez microorganismos prueba es el siguiente: *Acinetobacter baumannii* NCTC 7844 MIC 1,0 % v/v , *Aeromonas veronii* biogroup sobria ATCC 9071 MIC 0,5 % v/v , *Candida albicans* ATCC 10231 MIC 1,0% v/v, *Enterococcus faecalis* NCTC 8213 MIC >2,0 % v/v , *Escherichia coli* NCTC 10418 MIC 1,0 % v/v , *Klebsiella pneumoniae* NCTC 11228 MIC 2,0 % v/v , *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 MIC >2,0 % v/v ,

Salmonella entérica subsp. entérica serotype typhimurium ATCC 13311 MIC >2,0 % v/v, *Serratia marcescens* NCTC 1377 MIC >2,0 % v/v y *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 MIC 1,0 % v/v. (Hammer, 1999).

En la investigación realizada por Hend, el aceite esencial fue probado frente a dos microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) dio como resultado los valores de 1 y 5 µl/ml respectivamente y la concentración máxima bactericida (MBC) valores de 2,5 y 25 µl/ml. (Hend, 2009).

Otras investigaciones como la realizada por Flores indica excelente actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con una MIC 1 mg/ml, pero una muy baja actividad no cuantificada con el método utilizada frente a *Neurospora crassa* ATCC 9279, *Candida albicans* ATCC 10231, *Shigella flexneri* ATC 12022, *Escherichia coli* ATC 8739. (Flores, 1999)

Las mencionadas, son sólo algunas de un buen número de investigaciones realizadas sobre la actividad antimicrobiana del aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y aunque como se mencionó los resultados no son reproducibles por las variables manejadas en cada investigación, es indiscutible la actividad antibacteriana del aceite esencial, siendo estos resultados la base de la presente investigación, la relación que pueda existir entre la capacidad antimicrobiana del aceite esencial, con el poder conservante que podría ejercer el mismo dentro de una de una formulación cosmética.

Comparar la eficiencia antibacteriana del aceite esencial, frente a una mezcla de parabenos, responde a que los parabenos son los conservantes más utilizados, “su uso esta tan extendido que la Food and Drug Administration (FDA), les otorga el segundo puesto dentro de los ingredientes más comunes en las formulaciones cosméticas, siendo superados únicamente por el agua. Un estudio sobre el contenido de los diferentes parabenos en 215 cosméticos comercializados en Dinamarca, encontró que el 93% de ellos contenía parabenos, en unas concentraciones que oscilaban entre el 0,01 y el 0,59%. (Rastogi, 1995).

A pesar de ser uno de los ingredientes más utilizados, también corresponde a uno de los más cuestionados y motivos de estudios desde 1940, el problema más frecuente relacionado al uso de los parabenos es la hipersensibilidad retardada o de tipo IV

(dermatitis de contacto alérgica), la primera publicación de eczema alérgico de contacto (EAC) por sensibilización a parabenos fue descrito en Europa por Bonnevie en 1940, y se debía a los conservantes utilizados en una crema antifúngica. Hasta 1966 no se describe una sensibilización a parabenos en los Estados Unidos. (Schorr, 1966). Con todos los estudios realizados los parabenos siguen considerándose componentes seguros, y permitidos por entes regulatorios.

1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EFECTUADA

“Dentro de las características más importantes que busca un consumidor al adquirir un producto cosmético a más de la independiente funcionalidad hacia un problema específico, es la seguridad de que el producto se encuentre en óptimas condiciones, que no se deteriore con el tiempo y sea seguro para la salud” (Leranoz, 2002). Con esta consideración uno de los ingredientes que le otorgan seguridad al producto son los conservantes, existiendo en el mercado variedad de alternativas de diferente grado de eficacia y precio; de todos ellos muy pocos son de origen natural.

“De acuerdo a Kline Europa subsidiaria de Kawasaki Kisen Kaisha, Ltd. (K’line) uno de los mayores centros de negocios de Tokyo, el mercado internacional de ingredientes cosméticos y de cuidado personal crecieron a 6,7 mil millones de euros en el año 2007, de los cuales alrededor de un tercio representa ingredientes naturales (Kline & Company, 2008); este importante desarrollo se ha debido no sólo a la tendencia de una cosmética natural, sino que en muchos casos los ingredientes sintéticos han sido categorizados como inseguros, como en el caso de los parabenos, cuestionados como conservantes desde 1940.

Esta categorización ha provocado que en los últimos años, la industria cosmética presente como novedad y un gran avance científico productos “sin parabenos”, de alguna forma combatiendo la campaña publicitaria en la que los representa como potenciales alérgenos junto con las fragancias. (Conde, 2012).

Frente a un incremento en el mercado mundial del uso de conservantes y antioxidantes cosméticos de origen natural, se ha generado la oportunidad de investigar componentes naturales que posean estas propiedades y puedan representar una alternativa en la tecnología cosmética. La propuesta de la investigación es relacionar la actividad

antibacteriana que presentan ciertos activos botánicos, y su comportamiento como conservantes dentro de una formulación cosmética. En el caso del Romero (*Rosmarinus officinalis*) la actividad antibacteriana que presenta el aceite esencial, ha permitido catalogarle como una especie vegetal con potencial, que podría generar múltiples aplicaciones desde el campo de la medicina, hasta sugerida como desinfectantes de superficies. (Abdel & Massih, 2010)

El Romero (*Rosmarinus officinalis*) contiene una considerable cantidad de aceite esencial (alrededor del 1%), utilizado en la medicina tradicional, por las propiedades estimulantes tónicas, también como antiséptico pulmonar, un colerético y un colagogo, se le ha atribuido también propiedades antireumáticas, antidiarreicas y estomacales. Su uso se ha extendido en la Fitocosmética, perfumería y también en licores. La composición química del aceite de romero ha sido estudiada por muchos investigadores, concluyendo que los componentes mayoritarios del aceite son monoterpenos: pineno, 1,8 - cineol y alcanfor (asociado con cantidades variables de canfeno, limoneno, borneol, verbenona, bornilo acetato, etc). (Pintore, 2002). La caracterización química de la planta de Romero, indica que es una rica fuente de compuestos fenólicos, responsables de la alta propiedad antioxidante y antimicrobiana, contra bacterias gram positivas y bacterias gram negativas, como también frente a levaduras (Moreno, 2005).

Todas estas investigaciones constituyen el fundamento, de la relación que plantea la presente investigación, actividad antimicrobiana y eficiencia conservante en una formulación cosmética.

1.4. OBJETIVO GENERAL

Comparar la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos (Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben), frente al aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) utilizados como conservantes en una formulación cosmética.

1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar químicamente el aceite esencial Romero, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

- Evaluar la capacidad mínima inhibitoria (MIC) del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*).
- Realizar formulaciones de champús, utilizando como conservante diferentes concentraciones de aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) en función de la actividad antibacteriana evaluada.
- Realizar una formulación de champú utilizando como conservante una mezcla comercial de parabenos, en la concentración establecida por regulaciones internacionales.
- Comparar según el Reglamento Europeo 1223/2009 de la evaluación de conservación antimicrobiana en productos cosméticos según la norma ISO 11930:2012 (Challenge Test), la capacidad conservante del ingrediente ocupado en cada formulación.

1.6. HIPÓTESIS

El aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) incorporado en una formulación cosmética, genera una eficacia conservante similar a la que presentan la mezcla de parabenos en la misma formulación.

CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO

2.1 ESTADO DEL ARTE

La presente investigación aborda dos tendencias diferentes en el consumo de cosméticos, que conlleva el desarrollo de dos tipos de producción cosmética, por un lado la cosmética convencional o de síntesis y por otro una cosmética en crecimiento la cosmética natural.

La cosmética convencional es una industria química que ha venido produciendo cosméticos con un gran número de ingredientes, en su mayoría materias primas de bajo costo extraídas del petróleo, producción que hoy en día se encuentra cuestionada y presionada a cambiar su orientación, por la nueva tendencia de los consumidores de cosméticos, hacia una cosmética más natural. Esta fuerte corriente, que al parecer está arrasando con los cosméticos convencionales, engloba un concepto “de lujo más abstracto, con privilegio en las sensaciones, y está representada por los objetos sencillos, artesanales (y originales), oriundos de comunidades distantes, productos rústicos, relacionados con la naturaleza, el medio ambiente y la tranquilidad hacia lo natural”. (Franquilino, 2011)

Esta nueva tendencia a dado origen a una cosmética natural, categorizada bajo diferentes denominaciones, cosmética verde, biocosmética, cosmética orgánica, cosmética natural o fitocosmética, con diferentes definiciones y con mayores o menores exigencias, en cada una de las denominaciones, pero con un objetivo común, en todas ellas, el retorno hacia lo natural, “La proclamación de natural ha sido fuertemente orientada hacia formulaciones libres de aditivos o con fitoingredientes o materias primas vegetales, recogiendo las percepciones de seguridad y pureza que son críticas en los productos para la salud” . (Nadinic, 2009) y todo esto ha sido promovido “gracias al conocimiento químico de los componentes de las plantas, y al avance de las investigaciones clínicas que han demostrado su eficacia y fiabilidad y, en general, al mejor conocimiento de la fisiología de la piel ha sido posible el auge de la fitocosmética, de tal manera que hoy en día la industria cosmética, tiene la posibilidad de incorporar principios activos vegetales sea puros o como extractos”. (López, 2009).

En este siglo XXI, los desafíos para las industrias que utilizan procesos químicos, entre las cuales se encuentran los fabricantes de productos para el cuidado personal, son tan grandes como los enfrentados por casi todas las áreas industriales. Los propulsores de los cambios afectan todos los aspectos de la producción, especialmente las materias primas, los procesos de fabricación y la selección de las características claves de los productos. (Clark, 2010)

En el campo de los productos naturales, independientemente de la denominación catalogada (bio, eco, natural, etc), es importante analizar algunos datos de estudio de mercado. Revisando estudios de mercado realizados en los Estados Unidos, uno de los países con mayor producción y consumo de cosméticos, se encuentra un estudio realizado por Kline & Company importante empresa de investigación de mercado, indica que la demanda de productos naturales de cuidado personal sigue siendo fuerte en los mercados bien establecidos de Europa Occidental y América del Norte, dentro de ésta demanda el segmento de los productos naturales mantiene una alta tasa de crecimiento. De hecho, los datos más recientes muestran que aunque en el 2011 el crecimiento del segmento disminuyó ligeramente en comparación con la tasa compuesta de crecimiento anual de hace cinco años evaluada con un 13,9%, se estima que la demanda de productos naturales crezca hasta el 10% más al año 2016". (Kline & Company, 2012).

No tenemos estudios de mercado de Ecuador, debido a la baja participación productiva del país en el mercado cosmético, pero como referente de crecimiento, según estimaciones de Euromonitor, empresa internacional de inteligencia de mercado dedicada al consumo masivos, se evidencia que Latinoamérica experimentará una dinámica acelerada en el mercado cosmético, con un incremento calculado de 3,8% anual, hasta el 2013, aumento relacionado a la creciente demanda por productos de cuidado para el cabello, piel y fragancias, que indican que aunque Estados Unidos es el líder en el sector cosmético, por el momento, Latinoamérica se visualiza como líder en crecimiento durante los próximos cuatro años, y en su conjunto toma fuerza y cuenta con una participación igual a la del país norteamericano (16%). Dentro de Latinoamérica Colombia se muestra como uno de los países líderes en el mundo para la innovación en productos basados en insumos naturales. La riqueza natural de Colombia la ubica como el segundo país del mundo,

después de Brasil, con mayor número de plantas existentes y, además, es el cuarto país de Latinoamérica con más áreas protegidas en relación a su área total después de: Venezuela, Bolivia y Ecuador. (Proexport Colombia, 2008)

Estas cifras sin duda, son el resultado de un consumidor más exigente. Los nuevos consumidores de productos cosméticos están muy bien informados, confían en su punto de vista y saben de qué cuidarse y cómo. Vienen de todas las clases sociales y grupos políticos y son de todas las edades. Y ya no se trata solo de información sino de responsabilidad, hoy en día los consumidores están también preocupados por el medio ambiente, amante de conceptos como “natural” u “orgánico”, interesado por la sustentabilidad. Lo que ha dado apogeo a esta categoría Cosmética Natural, que busca satisfacer consumidores exigentes, que desean no sólo productos naturales sino que funcionen mejor que cualquier otro. Estos dos conceptos fueron tomados como contradictorios algunos años atrás, pero se han desarrollado activos botánicos totalmente funcionales, lo que ha generado un cambio radical en la formulación.

Los desarrollos realizados demuestran que los activos botánicos no son vistos como inferiores en cuanto a su desempeño, si se compara con un producto cosmético convencional. Entre el 9 y el 50 % de los consumidores de diferentes países encuentran en las formulaciones ecológicas un criterio importante a la hora de escoger un producto natural u orgánico, del 26 al 72% de los consumidores utilizan a las marcas de certificación para evaluar si el producto es ecológicamente sustentable, particularmente en Francia, China y Alemania, donde las certificadoras comenzaron a trabajar hace alrededor de 3 años. El 80% de los consumidores probablemente dejarían de comprar una marca si no aplica prácticas de ética medioambiental en la elaboración de productos y el manejo de los residuos. (Kline & Company, 2008).

Algunos podrían decir que los cosméticos naturales u orgánicos no ofrecen beneficios mayores que los cosméticos convencionales, pero los motivos por los que se prefieren este tipo de productos pueden nombrarse según la percepción del consumidor ya que proveen salud, bienestar, seguridad avalada por su uso tradicional, armonía entre cuerpo y mente, acercamiento a la naturaleza, y ofrecen gran tolerancia dermatológica, debido a que contienen una base de aceites vegetales y extractos de plantas que estimulan las funciones

vitales de la piel y son libres de compuestos sintéticos. Todos éstos beneficios, algunos subjetivos, otros empíricamente demostrables, avalan la tendencia en el aumento del interés por la salud y el medio ambiente. Un producto natural u orgánico da seguridad, genera confianza al estar relacionado con la ausencia de productos sintético, el 78% de los consumidores da a este término una connotación negativa. Los consumidores explican que: “lo orgánico, lo natural es más sano”; “funciona mejor”; “por alguna razón es utilizado desde hace siglos”; “va de la mano con el medio ambiente”; y “son productos biodegradables”. (Hermida, 2011).

Desde el punto de vista técnico surge una nueva interrogante ¿Qué tan seguros y confiables son los cosméticos naturales? , al respecto es bastante clara la conclusión a la que llega la investigación realizada por Tolosa, en la que se expresan algunos de los inconvenientes de la cosmética natural, entre ellos: “la implementación del marketing ético, los problemas técnicos y de formulación, la diversidad de eco-sellos, y la incompatibilidad entre las normas existentes que generan desconcierto y confusión, no solo al consumidor sino también al productor. Los productos legítimos, por lo tanto, están compitiendo contra los cosméticos convencionales que han sido etiquetados como “naturales” los cuales muchas veces no poseen una certificación que verifique su autenticidad. Lo que se pone en tela de juicio en este caso es la veracidad de los productos cosméticos de estas características, lo que confiere al consumidor cierta desconfianza e inseguridad. (Tolosa, 2011)

Uno de los argumentos más utilizados en favor de lo natural es que no hace daño, como sí lo hacen los productos industrializados. La naturaleza representa la fuerza vital, lo que anima a los vivientes, la creación suprema, de tal manera que el adjetivo “natural” se ha convertido en superlativo de lo sano, benéfico, recomendable y, por supuesto, inocuo. En oposición, lo que no es bueno es lo artificial, lo químico, lo sintético; si un medicamento o un alimento es producto de la química, si tiene aditivos artificiales resulta que no es bueno. Para los fanáticos de lo natural, el adjetivo más peyorativo es que algo contiene químicos. Al margen de la ignorancia que traduce el decir que algo no es químico, o que la química no es una ciencia natural, tal tendencia no resulta del todo favorable a la salud. Es verdad que muchos productos sintéticos pueden representar el riesgo de efectos colaterales, pero no lo es menos a partir de los productos naturales. En otras palabras, lo natural no es,

garantía de efectividad o inocuidad y que igual puede ser dañino lo totalmente natural. (Lifshitz, 2003)

Es claro que esta reflexión de Lifshitz, lleva a pensar que uno de los más grandes inconvenientes que tiene la Cosmética Natural, es la falta de estudios que permitan utilizar un ingrediente natural con total seguridad, conscientes tanto de sus potencialidades y sus riesgos. “No se debe limitar a la sabiduría popular la seguridad y la eficacia porque cada parte de una planta tiene numerosas sustancias con actividad biológica y potencialmente capaces de producir cualquier efecto indeseable”. (García, 2009).

En el estudio de García concluye que durante los años estudiados 2003 -2007, se reportó un total de 332 reacciones adversas en 2003 y de 359 en 2007. Especies como el Ajo (*Allium sativum* L.), Aloe (*Aloe vera* L.), fango medicinal y propóleos fueron los que acumularon mayor cantidad de reportes de sospechas de reacciones adversas, estas se evidenciaron más en el sistema digestivo y en la piel. En contra de lo que se piensa sobre la seguridad de los productos naturales, éstos sí producen reacciones adversas, y aunque en el mencionado estudio no se reportaron reacciones adversas graves, sí hay un elevado número de reacciones moderadas. Esto constituye una alerta para la población que consume productos naturales por auto prescripción, para el profesional de la salud y para el sistema sanitario que deben advertir al paciente de los riesgos a los que está sometido cuando emplea estos productos. (García, 2009)

Con estos fundamentos, lo que se quiere recalcar es que las especies vegetales del estudio, no son ajenas a las empleadas en formulaciones cosméticas, por lo que es importante recalcar que los productos naturales no ofrecen una completa seguridad de uso, siempre existirán riesgos inherentes a la diversidad de componentes químicos que posee un ingrediente natural. De tal forma que las dos tecnologías cosméticas: la natural y la convencional, siempre tendrán ventajas y desventajas, el reto es tratar de equilibrarlas, desde este punto de vista, la presente investigación, no se enfoca completamente a la formulación de un producto natural cien por ciento, pero sí al uso de ingredientes naturales, amparados dentro de un estudio científico.

Dentro de una formulación cosmética, un ingrediente que merece especial atención es el conservante o preservante, debido al importante papel que cumple dentro del producto, “el o los conservantes se incorporan principalmente a los productos para evitar su deterioro y prolongar su vida comercial, así como para proteger al consumidor de la posibilidad de infección frente a algún determinado microorganismo patógeno. Además, si el producto pierde el componente estético, esto puede implicar una pérdida de sus beneficios y de la imagen comercial de la empresa fabricante”. (Lemmel, 2008).

Obtener un producto libre de preservantes o naturalmente conservado que sea confiable es un reto que trae limitaciones inherentes en términos de eficacia, de fecha de caducidad y costo. Además, el consumidor que valoriza esta tendencia muchas veces reevalúa su posición al darse cuenta de estas limitaciones y de los riesgos a la salud advenidos de contaminación. Al igual que en otros ámbitos, en los últimos años el fabricante de cosméticos se ha visto en la necesidad de lanzar al mercado nuevos productos clasificados como “naturales” o que “contienen ingredientes naturales” en respuesta a la demanda del consumidor. “No contiene conservantes” es el mensaje que el consumidor quiere ver escrito en el envase de los productos que adquiere, ya que para él significa que el producto es natural y está libre de aditivos químicos.

Un cosmético “sin conservantes” significa que no contiene sustancias activas antimicrobianas. En este caso, la fórmula será microbiológicamente si se considera algunos aspectos como: primero si se ha utilizado ingredientes con alta exigencia microbiológica, segundo se ha fabricado en condiciones estériles y por último se considera un envase con altas características que evite contaminación y una vez abierto el producto se use en su totalidad (monodosis). Si todos estos requisitos no se cumplen, el cosmético estará expuesto a la contaminación microbiológica. Es decir algunas de las alternativas que permitan reducir o eliminar el uso de conservantes es cuando el formulador: aprovecha las propiedades antimicrobianas que pueden tener algunos de los ingredientes cosméticos (alcoholes, detergentes, fragancias, antioxidantes, etc.), trabaja a pH extremos o con baja actividad de agua, controla la carga microbiológica mediante Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y se utiliza envases de monodosis, que no permitan el contacto del producto con la piel del usuario o con el ambiente. Sólo si se cumplen estas condiciones

podemos hablar de productos autoconservados y permitirá a los fabricantes vender cosméticos libres de conservantes. (Leranoz, 2002).

Analizando el uso de ingredientes conservantes, se puede mencionar que ha existido una demanda de la industria, siempre en aumento, estimado en el 2008 superior a las 219.000 toneladas, con un crecimiento promedio del 1,1% desde el año 2003, y un pronóstico de aumentar al 1,4% para el 2013, demanda relacionada al crecimiento en el mercado de productos alimenticios como bebidas, comida empaquetadas, y de productos cosméticos en la categoría de cuidado personal, que son productos que requieren de este tipo de ingredientes. Dentro de este grupo de ingredientes los de mayor demanda son los parabenos, especialmente en los mercados de Asia Pacífico, Medio Oriente y África, y Latinoamérica. (Gamboa, 2011)

Y aunque el cuestionamiento a este tipo de conservantes tiene décadas, y se encuentra basado en algunos estudios desde 1940, hasta la fecha no han sido completamente comprobables, cada estudio ha sido respaldado por otro estudio, concluyendo siempre que las propiedades tóxicas atribuidas, tiene relación con el manejo de variables, no consideradas en las investigaciones, más que con el mismo producto, razón por la que nunca han sido descartados como aditivos, por los entes regulatorios internacionales, que han considerado que no existen pruebas científicas que determinen la inseguridad de su uso.

A pesar de que los parabenos son utilizados como conservantes en un gran número de productos, son muy raros los casos de sensibilización a estos ingredientes. En décadas pasadas era relativamente frecuente el diagnóstico de “alergia a parabenos”, sobre todo en pacientes con un eczema prevaricoso. Una de las causas más importantes de la acción de estos ingredientes, es las altas concentraciones en las que eran utilizadas, la sinergia con los otros ingredientes de la formulación. Considerando además que las pruebas de sensibilización o irritabilidad están sujetas a múltiples variables, que impiden determinar de forma específica la responsabilidad alérgica de un componente en particular. (Conde, 2012)

De los peores perpetradores de propagar la información incorrecta acerca de parabenos, han sido los fabricantes cosméticos que venden productos de cuidado personal “naturales”. Quizás estos fabricantes no estaban conscientes de que el metil-, el etil- y el propilparabeno existen en la naturaleza. Aunque no se puede aseverar que su presencia en la naturaleza garantiza su seguridad, los parabenos han sido detectados en varias especies animales y de plantas como la cebada, las fresas, la grosella negra, el durazno, la zanahoria y en el *Dytiscus marginalis* (escarabajo amarillo). El metilparabeno también ha sido detectado en las secreciones vaginales de las perras en celo. (Godfrey, 2011)

Como se hizo notar, las aseveraciones negativas acerca de los parabenos y otros ingredientes químicos “tóxicos” se hacen en internet, y usualmente son comentarios engañosos e incorrectos. Un error que usualmente se comete es el de agrupar a todos los parabenos como una sola entidad, como en la aseveración de que los “parabenos son estrogénicos o irritantes”, características que se encuentran únicamente relacionadas al butilparabeno. Reitero que a pesar de todas las investigaciones realizadas desde 1940, ninguno de estas investigaciones ha logrado probar la toxicidad del insumo, por lo que sigue siendo usado y aceptado por regulaciones internacionales como la FDA como aditivo preservante tanto en la industria cosmética como alimenticia e incluso farmacéutica.

Con todos estos argumentos fundamentados en investigaciones anteriores, se ha podido sintetizar las principales corrientes teóricas, sus posiciones y debates en torno al tema de la presente investigación, destacando los aspectos o problemáticas principales en cada una de las categorías cosméticas, dejando claro que tanto ingredientes naturales como sintéticos tienen ventajas y desventajas y el reto de un formulador es equilibrar con conocimiento las potencialidades y limitaciones para conseguir una formulación cosmética segura.

2.2 ENFOQUE TEÓRICO

2.2.1 Cosmética natural

Aunque el objetivo de la presente investigación no está relacionado con el desarrollo de un cosmético natural, la utilización de un activo natural, podría dar lugar a la creación o

desarrollo de esta categoría cosmética, viendo importante abordar definiciones que identifican esta categoría.

2.2.1.1 Definiciones

La tendencia de uso de productos naturales, se halla ampliamente extendida, tanto en el campo farmacéutico como también en el cosmético, y este uso ha sido sostenido no sólo por las preferencias del consumidor, sino también por la facilidad de extracción y análisis de los componentes vegetales.

Las sustancias activas que más frecuentemente se utilizan en fitocosmética son:

- Extractos vegetales hidroglicólicos, oleosos, alcohólicos suaves o fluidos, secos.
- Aceites esenciales
- Aceites puros o emulsionados
- Extractos integrales de plantas frescas

Se pueden emplear todas estas sustancias activas en la preparación de formas galénicas: emulsiones, lociones, geles – crema, o incluso cápsulas blandas (como complementos alimentarios). (Martini, 2005).

Un fitocosmético es el término que define al producto cosmético (de higiene o tocador) que incluye casi exclusivamente materias primas de origen vegetal (fitoingredientes) en su formulación con el objetivo de ejercer una acción determinada. Entendiéndose como fitoingrediente a cualquier materia prima vegetal que ha sido procesada convenientemente para ser incluida en formulaciones cosméticas y farmacéuticas. Puede provenir de plantas frescas o desecadas, enteras o en partes, extractos, secreciones, aceites, etc. o puede ser un producto aislado de las mismas por metodologías especiales, de composición heterogénea. (Nadinic, 2009).

Uno de los inconvenientes que se había definido dentro de la categoría de la cosmética natural, es la variedad de denominaciones, que terminan confundiendo a los consumidores, al respecto es importante realizar, ciertas aclaraciones, primeramente que un cosmético natural no es un cosmético orgánico. Estas denominaciones no están reguladas a nivel mundial y analizando lo que sucede desde las tres áreas de mayor producción cosmética (Unión Europea, Estados Unidos y Latinoamérica) la realidad es la siguiente:

En la Unión Europea se dispone de una legislación muy clara que define y regula los alimentos “ orgánico, ecológico y biológico” (alimentos producidos sin la utilización de productos químicos en todas las fases de su elaboración) su uso está regulado y protegido por Reglamentos Comunitarios 834/2007 y 889/2008; pero no ocurre lo mismo con los productos cosméticos. En la actualidad, no existe ninguna normativa europea que detalle los requisitos que debe cumplir este tipo de cosméticos en cuanto a las sustancias permitidas y prohibidas, la proporción de ingredientes de origen natural y orgánico, las normas del etiquetado, etc. Ante la ausencia de legislación, los fabricantes de cosméticos se someten a los criterios de empresas privadas de certificación, que garantizan el carácter natural o ecológico los cosméticos. Una de la mayores certificadoras en Europa, ECOCERT (Organismo de certificación para el desarrollo sostenible) define:

- “**Cosmético natural.**” El que contiene un mínimo del 95% del total de los ingredientes (incluyendo el agua) de origen natural, y de este porcentaje mínimo del 50% de los ingredientes vegetales de la fórmula deben proceder de una agricultura ecológica. Y solo el 5% restante pueden ser ingredientes de síntesis, generalmente conservantes y sustancias auxiliares.
- “**Cosmético ecológico**” El que contiene 95% del total de los ingredientes de origen natural, y el 5% restante pueden ser ingredientes de síntesis que forman parte de una corta lista restrictiva aceptada para conservantes y sustancias auxiliares. Del 95% de ingredientes naturales, por lo menos 5% deben ser ecológicamente certificados y representar el 50% de ingredientes vegetales. (Alcalde, 2010).

En los Estados Unidos no existe una normativa específica para productos cosméticos orgánicos, por lo que las empresas cosméticas están utilizando los estándares establecidos para alimentación. Según el Programa Orgánico Nacional (NOP) del Departamento de Agricultura (USDA), el sello *USDA Organic* puede aparecer en ciertas condiciones en el etiquetado del producto. en concreto, cuando el 95% como mínimo de sus ingredientes procedan de agricultura ecológica. Si el porcentaje es inferior, la denominación *USDA Organic* no puede aparecer en embalaje. Respecto al término “natural”, no está regulado por la FDA para productos cosméticos, por lo que cosméticos que se publicitan como

“completamente naturales” o “derivados de plantas” pueden incluir otro tipo de ingredientes. (Fuente, 2011)

En Latinoamérica todavía no hay normas para la certificación de cosméticos orgánicos, el Instituto Biodinámica (IBD), una de las mayores certificadoras de América Latina con Sede en Brasil, tiene su propia norma para el mercado de los países del Mercosur, que, según la certificadora, sigue las normas más avanzadas del exterior para cosméticos orgánicos. El fabricante que utilice mínimo el 95% de ingredientes orgánicos puede tener el sello IBD Orgánico y si contiene del 70 al 95%, el producto es certificado como EcoSocial. Quien utiliza menos que el 70% de ingredientes orgánicos, puede tener el sello “Ingredientes Naturales” y aún ser certificado con el sello “Integra”. (Neves, 2010)

2.2.1.2 Grupos fitoquímicos

Una clasificación de los principales grupos fitoquímicos utilizados en el industria cosmética es la siguiente:

ACEITES: Se trata de compuestos fácilmente oxidables y líquidos a temperatura ambiente. Sus componentes lipídicos juegan un rol fundamental en las formulaciones cosméticas ya sea como activos emulsionantes y protectores, o como vehículo de otros compuestos lipófilos. Luego de su extracción (por expresión de las semillas o por disolventes) sufren una serie de modificaciones tendientes a desodorizarlos, decolorarlos y reducirles su acidez e impurezas. (Alonso, 2010)

GRASAS: A diferencia de los aceites (de consistencia líquida), las grasas presentan una consistencia entre sólida y semisólida, lo que hace que se les conozca con el nombre de “mantecas”. Si bien su constitución es muy heterogénea, destacan por contener cantidades importantes de triglicéridos saturados. Otras grasas importantes son las fracciones insaponificables. (Alonso, 2010)

ACEITES ESENCIALES: Se trata de compuestos volátiles presentes en muy baja concentración en las plantas, son extraídos principalmente por métodos de destilación (hidrodestilación, destilación con agua y vapor, destilación con vapor seco, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas), y expresión con fluidos

supercríticos. Son la base de la *Aromaterapia*, y se emplean fundamentalmente en la industria de la perfumería, de la cosmética (cremas para masajes y nutrición de la piel) y farmacéutica (cremas dermatológicas bactericidas). Los aceites esenciales pueden añadirse a todo tipo de preparados cosméticos. Uno de los aceites esenciales de mayor uso es el aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*). Es obtenido a partir de las hojas, destacando entre sus componentes más importantes: 1,8-cineol, α -pineno, alcanfor y terpineol. Se emplea en casos de celulitis, acné, alopecia y pieles envejecidas o con arrugas. (Alonso, 2010)

HIDRATOS DE CARBONO: En este ítem destacan principalmente los mucílagos contienen cadenas ramificadas de *galactosa*, *ramnosa*, *ácido glucurónico*, *ácido galacturónico*, etc. En aplicación tópica estas sustancias hidrófilas colaboran en regular la temperatura cutánea, son excelentes hidratantes y tienen efecto antiinflamatorio y antiedematoso. (Alonso, 2010).

FLAVONOIDES.- Constituyen el grupo más ampliamente distribuido en el Reino Vegetal por lo que son ampliamente estudiados por sus múltiples propiedades terapéuticas y cosméticas. Son conocidos como estimulantes circulatorios, disminuyendo la fragilidad y la permeabilidad de los capilares sanguíneos, reforzando la resistencia de los mismos. Los flavonoides son atrapadores de radicales libres, tanto en la fase inicial como en la de propagación. En consecuencia, protegen la membrana de la célula y por ende todos los procesos de la misma, frenando su deterioro, con un efecto antienvjecimiento, proclamado en productos anti-age (anti edad). (Nadinic, 2009).

POLIFENOLES. Son polímeros condensados de ácidos orgánicos, con propiedades antioxidantes, aclarantes, cicatrizantes, filmogénicas y astringentes sobre piel y mucosas. Las epicatequinas presentes en el té y en el mate mostraron ser antibacterianas frente a gérmenes como *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Propionibacterium acnes*, lo que hace efectivos a los extractos de estas especies en tratamientos para el acné y para formulaciones desodorantes. (Nadinic, 2009).

SAPONINAS. Pueden ser triterpénicas o esteroidales. Básicamente disminuyen la tensión superficial, alteran la permeabilidad de la membrana celular, y tienen por ende variado número de propiedades biológicas. Determinándose propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias y descongestivas. (Nadinic, 2009)

2.2.2 Conservantes cosméticos

Sustancias químicas con actividad antimicrobiana que se incorporan en los cosméticos en muy pequeña concentración, durante el proceso de fabricación. Su función es la de prevenir la contaminación bacteriana de los productos durante los procesos de: manufactura, almacenaje y uso cotidiano por el consumidor, pero no deben utilizarse para destruir los microorganismos de productos cosméticos contaminados (Leranoz 2002).

Un sistema de conservación eficaz debe cumplir una serie de requisitos esenciales, como:

- Efectividad frente a una gran gama de microorganismos (amplio espectro).
- Compatibilidad con otros componentes activos de la fórmula y con el material de acondicionamiento.
- Estabilidad frente al calor y al almacenamiento prolongado.
- Ausencia de efectos tóxicos, irritantes o sensibilizantes en las concentraciones utilizadas.
- Seguro en las concentraciones de uso.
- Activo en bajas concentraciones.
- No volátil.
- Debe retener su efecto en un intervalo amplio de pH.
- Muy soluble a su concentración de eficacia.
- Compatible con las materias primas y con la formulación.
- Sin olor o color que puedan interferir en las características del producto.
- Mantener su actividad en presencia de sales metálicas de aluminio, zinc, hierro, etc.
- Fácil de usar y manipular.
- Costo adecuado al producto.
- No debe ser corrosivo para tubos metálicos ni dañar las gomas.
- Aprobado por normativas internacionales, como Food and Drug Administration (FDA) , European Cosmetics Association (COLIPA) redefinida en el 2012 por Cosmetics Europe – The Personal care Association.

Se puede decir que no hay ningún conservante en el mercado que cumpla todos estos requisitos. En la formulación se escogerá en cada caso el conservante más adecuado basándose en la experiencia y con la ayuda de directrices emitidas por los órganos correspondientes.

La misión del sistema conservante no es destruir los microorganismos ya existentes, sino evitar su multiplicación si los hubiese para asegurar su calidad microbiológica durante el uso del producto. El sistema conservante no debe nunca ocultar las posibles deficiencias higiénicas de una inadecuada fabricación de un cosmético. (Lemmel, 2008)

Dentro de los conservantes utilizados en cosmética se podría identificar de dos tipos, de acuerdo a su origen identificados como:

- Conservantes naturales
- Conservantes sintéticos

2.2.2.1 Conservantes naturales

El empleo de conservantes naturales, lejos de ser novedoso, es una técnica utilizada desde la antigüedad, por lo que los investigadores centran sus estudios en nuevas sustancias conservantes que, además de ser naturales, es decir, no sintéticas, no comprometan en ningún caso la salud (Pelayo 2008), apoyándose además con las aplicaciones tecnológicas de aceites esenciales naturales como agentes antimicrobianos no sólo en la industria alimenticia, sino también en una industria cosmética con tendencia natural.

Actualmente, algunos de los sistemas conservantes tradicionales se están reconsiderando dentro de los sistemas productivos, debido a que se buscan nuevas moléculas con actividad biocida o moléculas que generen un entorno desfavorable para los microorganismos. Las razones de este interés hacia los conservantes naturales, pueden ser diversas, pero la mayoría fundamentadas en una demanda por parte del consumidor de productos más naturales, porque se buscan compuestos menos tóxicos para el ser humano o bien por restricciones de uso, dadas por parte de los organismos regulatorios de las moléculas con conocida actividad.

El conservante alternativo o natural, debería reunir la mayoría de las características mencionadas en el literal 2.2.2, pero no hay en la actualidad ninguno que se adapte a todos los requerimientos, por lo que se aconseja combinar diferentes moléculas. De ese modo estaríamos hablando de un “sistema conservante”.

Dentro de este grupo de conservantes de origen natural, se considera las plantas que posean actividad antibacteriana. La mayoría de ellas con actividad comprobada especialmente en los aceites esenciales. Los aceites esenciales de las plantas son aislados de varias estructuras vegetales, por métodos como: hidrodestilación, destilación con agua y vapor, destilación con vapor seco, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, y expresión con fluidos supercríticos. Los aceites esenciales son mezclas principalmente de terpenoides, concretamente monoterpenos [C10] y sesquiterpenos [C15], aunque diterpenos [C20] también pueden estar presentes y una variedad de hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular (lineales, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres acíclicos o lactonas, excepcionalmente pueden contener nitrógeno y compuestos con azufre, cumarinas y homólogos de los fenilpropanoides. Los terpenos se encuentran entre las sustancias químicas responsables de las principales actividades farmacológicas atribuidas. (Dorman, 1999)

Algunas investigaciones respaldan la relación de los componentes químicos de los aceites esenciales con una determinada actividad química y/o biológica, por eso es importante el conocimiento de los grupos funcionales y las posibles interacciones sinérgicas entre los componentes. Una relación general de la actividad antimicrobiana con relación a la estructura química del aceite concluye que: “los componentes con estructuras fenólicas, tales como carvacrol, timol, eugenol presentan gran actividad *in-vitro* frente a algunos microorganismos, otorgándole la calidad de bactericidas o bacteriostáticos a las especies vegetales, que poseen estos componentes”. (Dorman, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, 2000)

2.2.2.2 Conservantes sintéticos

La directiva europea para cosméticos (76/768 EEC), en su anexo VI, presenta más de 60 sustancias activas, que pueden ser utilizadas para conservación de cosméticos, sin embargo solamente cerca de una docena son efectivamente parte del mercado. Entre estas las más importante son: parabenos, isotiazolinonas, donadores de formaldehído (DMDM), hidantoina, imidazolidinilurea y diazolidinilurea, alcoholes orgánicos, alcoholes aromáticos, fenoxietanol, metil-dibromo-glutaronitrilo y bronopol. (Vera, 2004)

Siendo los parabenos los más utilizados en el mercado y a la vez objeto de la presente investigación es importante resaltar algunos aspectos de interés.

Los parabenos fueron descubiertos como antimicrobianos en 1924 por Sabalitschka. Son una familia de alquil-ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. El grupo éster se localiza en la posición C-4 del ácido. Los ésteres más empleados son metil-, etil-, propil-, butil- y bencilparabeno. Son ampliamente utilizados, dadas sus óptimas características, ya que se trata de moléculas inodoras, incoloras, no volátiles, eficaces en un amplio margen de pH y económicas. Sus diferentes estructuras químicas hacen que cada parabeno tenga propiedades distintas, por lo que veremos que en casi todas las formulaciones existen 2 o más parabenos. Los parabenos son conservantes sobre todo eficaces frente a hongos y levaduras, pero también frente a bacterias. Presentan poca cobertura frente a las especies de *Pseudomonas*. Se suelen utilizar en combinaciones entre ellos y junto con otros antimicrobianos, consiguiéndose de esta forma un efecto sinérgico. La utilización de los parabenos no solo se da en cosméticos, sino que también se encuentran en numerosos medicamentos de uso tópico, comidas, bebidas, productos industriales y medicación sistémica, como en supositorios, jarabes, soluciones oftálmicas, contraceptivos, corticoesteroides, anestésicos, heparinas y muchos medicamentos. (Conde, 2012)

Algunos de las reacciones adversas que se han identificado del uso de productos conservados con parabenos, es la dermatitis de contacto alérgica (hipersensibilidad retardada o de tipo IV) es el problema más frecuentemente relacionado con el uso de parabenos. La primera publicación de eczema alérgico de contacto (EAC) por sensibilización a parabenos fue descrito en Europa por Bonnevie en 1940, y se debía a los conservantes utilizados en una crema antifúngica. Hasta 1966 no se describe una sensibilización a parabenos en los Estados Unidos. (Schamberg, 1967).

A partir de entonces, se publican diversos casos de EAC producidos por formulaciones tópicos que contenían estos conservantes, sobre todo en pacientes que presentaban una dermatitis de estasis (enfermedad cutánea inflamatoria de las extremidades inferiores, observada habitualmente en pacientes con insuficiencia venosa crónica). Estos conservantes también se encontraban entre los productos tópicos, principalmente pomadas empleadas para tratar el eczema. Las concentraciones a las que se utilizaban eran altas, con lo que se perpetuaba la clínica. Si además eran pacientes de edad avanzada y con una

barrera cutánea dañada con cuadros crónicos, el alérgeno penetraba con mayor facilidad, facilitando la sensibilización.

Estas fueron las causas para que durante las décadas de los años 70 y 80 se responsabilizara a los parabenos en la producción de eczemas de contacto iatrogénicos, graves y perdurables, sin realizar estudios con otros componentes de los cosméticos que hoy día se llevan a cabo. De esta forma, la industria cosmética y farmacéutica comenzó a comercializar productos “sin parabenos” o “paraben-free”, y a publicitarlos entre los dermatólogos y usuarios. Sin embargo, la visión de los parabenos como sensibilizantes ha cambiado radicalmente en pocas décadas. (Conde, 2012)

A partir de los años 90 se realizaron numerosos trabajos que confirman la escasa prevalencia de la sensibilización a estos conservantes. Así, en un análisis llevado a cabo en varios países europeos que incluía los resultados de la batería estándar TRUE TEST durante 15 años consecutivos (1986- 2000), la mezcla de parabenos se encontraba dentro de los alérgenos con una menor tasa de reacciones positivas (0,5%). (Krob, 2004).

En todos estos últimos trabajos se hace hincapié en la importancia que tiene el daño de la piel para adquirir una sensibilización a parabenos, observándose que mientras los casos descritos de EAC con preparados terapéuticos (aplicados sobre piel dañada) son relativamente numerosos, los casos de sensibilización a parabenos usados como conservantes de cosméticos (aplicados sobre piel sana) son extremadamente raros. Pero más aún, es frecuente que las personas sensibilizadas a parabenos (y que han desarrollado un EAC al aplicarlos sobre piel dañada) sean capaces de utilizar cosméticos con parabenos sin ningún problema, incluso aplicados en zonas de piel más vulnerable, como puede ser la de los párpados. Es sorprendente también que los pacientes sensibilizados toleran perfectamente la ingesta de parabenos. Fisher en 1979 sintetizó el comportamiento peculiar de estas sustancias y las contradicciones que se encontraban, en lo que él denominó “las paradojas de los parabenos” (The paraben paradox).

Desde el 2004, los informes en los medios de comunicación y en internet han llevado a que los consumidores eviten los parabenos en los productos de cuidado personal, mientras que usualmente se habla de las virtudes de los productos “libres de parabenos”. Muchos de estos reportes se basan en un estudio del 2004 elaborado por Darbre et al., que asevera haberlo encontrado en tejidos de cáncer de seno humano. (Darbre, 2004)

Ese estudio fue impulsado por un estudio de 1998 elaborado por Routledge et al., que descubrió que los parabenos tienen una actividad estrogénica. (Routledge, 1998).

Varios puntos de controversia están conectados con el trabajo de Darbre acerca del tejido de cáncer de senos, y muchos aspectos de este estudio han sido criticados. La mayoría de las críticas se enfocan en la metodología cuestionable empleada, además de la detección de parabeno también en los controles blanco, los investigadores descartaron que la procedencia de la cantidad de parabenos encontradas en el muestra control, haya provenido de contaminación por los productos de limpieza que se utilizaron, sin importar la fuente de contaminación, si los controles fueron contaminados en cualquier extensión, la lógica dictaría que los tejidos deben estar igualmente contaminados. Aunque esta sugerencia no significa que automáticamente los parabenos no estaban presentes en los tejidos, sí coloca una duda significativa sobre la aseveración hecha en el estudio. Esta posibilidad puede derivarse de la falta de diferencia estadística entre las concentraciones del parabeno en los tejidos y los controles. Adicionalmente, hubo una falta de diferencia estadística entre las relaciones de los cinco parabenos detectados. Por lo tanto, las concentraciones de cada uno de los parabenos individuales estadísticamente fueron las mismas en los tejidos y en los controles. De hecho, uno de los controles en blanco contuvo una concentración total mayor de parabenos que 12 de las muestras de tejido. (Godfrey, 2011).

Después de haber realizados varios exámenes de seguridad de los parabenos en los productos cosméticos, el Comité Científico de la Unión Europea de Seguridad para el Consumidor SCCS, establece niveles de uso recomendados: Metil parabeno: 0,4% ; Etil parabeno: 0,4% ; Propil parabeno, butil parabeno: 0,19% ; de forma individual o en combinación. Permitiendo una concentración de máximo 0,7% a 0,8% de la mezcla total de parabenos. (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010)

CAPÍTULO 3 - ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1 Romero *Rosmarinus officinalis*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Rosmarinus officinalis*

FAMILIA: *Lamiaceae*

NOMBRE POPULARES: Romero, rosmarín, rose marin, rosmarino, ramerino

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Se trata de un arbusto aromático perenne, perteneciente a la familia de las Labiadas, caracterizada por presentar una altura cercana al metro (aunque existen pocos ejemplares que pueden llegar a dos), ramas jóvenes pubescentes que se tornan leñosas al madurar, hojas simples, opuestas, sésiles, lineares y coriácea (aspecto o tacto parecido al cuero) de hasta 3,5 cm de longitud, flores pequeñas bilabiadas de color azulado (rara vez rosadas) agrupadas en densos racimos axilares o terminales. (Correa, 1992)

USOS

Popularmente, el Romero se usa como antiséptico, antidepresivo, antiespasmódico, digestivo, diurético, carminativo, abortivo, insecticida y como estimulante mientras que, su aceite esencial (AE) es incorporado en pomadas para tratamientos de reumatismo, úlceras y heridas. También, el AE mezclado con otras drogas se emplea para la elaboración de tónicos capilares para el cuidado del cabello, la alopecia y la caspa (*Pityriasis simples*). En medicina, el AE de Romero se emplea por sus propiedades estimulantes, presumiblemente debido a su alto contenido de alcanfor, (Soliman & Kashory, 1994). El romero es usado desde hace milenios como condimento y conocido por sus propiedades terapéuticas. Las hojas y el extracto se han usado frecuentemente como aroma o

conservante de alimentos. Las propiedades antioxidantes del extracto de romero fueron arduamente estudiadas y su eficacia fue comprobada en la conservación de la vida útil de los alimentos. En la industria alimenticia, el extracto de romero es una excelente alternativa como antioxidante natural. (Zaccarelli, 2006)

3.1.1.1 Composición Química

Diversos estudios sobre Romero *Rosmarinus officinalis* describen la composición química de su aceite esencial. En el estudio de Vargas & Bottia 2008, se concluye que la variabilidad cualitativa y cuantitativa de la composición de la esencia, son atribuidas a algunos aspectos externos que inciden directamente en el material vegetal, entre algunos de estos aspectos se puede citar:

- Condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad;
- Procesos de cultivo: uso de fertilizantes, abonos y pesticidas;
- Parte y estado de desarrollo fenológico de la planta;
- Época de recolección;
- Modo de almacenamiento y manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado, tratamiento post- cosecha;
- Modo de obtención del aceite.

La Tabla N°1, reúne una investigación realizada por Vargas y Bottia, resultado de 12 investigaciones de diferentes zonas, del mundo, 5 países de Europa, 2 países del continente Asiático, 2 países de América y 1 país de África, y aunque existen algunas coincidencias, éstas no son totales, pues en el mismo país, diferentes investigaciones, revelan material vegetal con diferentes componentes, o los mismos componentes, pero en diferentes concentraciones.

TABLA N° 1: PRINCIPALES COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO *Rosmarinus officinalis* DE DIFERENTES ORÍGENES.

ORIGEN	COMPOSICION QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO	REFERENCIA
Grecia	1,8-cineol (51,2%), α -pineno (10,3%), borneol (4,7%), y canfeno (4,0%)	(Skrubis & Seven, 1972)
Bulgaria	α -pineno (31,1%), canfeno (9,2%), β -pineno (5,9%), mirceno (8,0%); α -fenantreno (2,6%), limoneno (5,6%), α -terpineno +1,8-cineol (16,7%), alcanfor (7,3%), acetato de isobornilo (1,4%) + terpineno terpinoleno (11,0%)	(Devetak, 1977)
Hungría	α -Pineno + canfeno (24.9 %), 3-octenona (10.0 %), β -pineno (3.8 %), 1,8-cineol (20.1 %), alcanfor (14.7 %), borneol (3.0 %), α -terpineol (0.5 %), verbenona (0.8 %), acetato de bornilo (6.0 %), trans- β -cariofileno (9.7 %)	(Hethelvi, Kaposi, & Kernoczi, 1987)
Portugal	Mirceno (20-52 %) y α -pineno (12-30 %)	(Do Vale, Da Cunha, & Roque, 1980)
	α -Pineno (11,2 %-12,1 %), mirceno (31,5%-36,2%), 1,8-cineol (12,8%-14,9%), alcanfor (8,7%-14,4%)	(Mateus, Lopes, Nogueira, Laurenco, & Marcelo, 2006)
Colombia	1,8-Cineol + limoneno (7-24%), alcanfor (20-21 %), α -pineno (2-11 %), canfeno (1-11 %), β -pineno (2-10%), borneol (2-5%), acetato de bornilo (2-4 %)	(Checira & Lozano, 1992)
Algeria	1,8-Cineol (29.5 %), 2-etil-4,5-dimetilfenol (12.0 %), alcanfor (11.5 %), borneol (9.4 %), α -terpineol (9.2 %) y α -pineno (7.5 %)	(Kabouche, Boutaghane, Laggoune, Kabouche, Ait-Kaki, & Benlabed, 2005)
	1,8-Cineol (31.9 %-52.4 %), alcanfor (12.6 %-19.7 %), α -pineno (0.4 %-5.2 %), canfeno (0.3 %-3.0 %), β -pineno (0.3 %-5.7 %), borneol (3.4 %-12.1 %), α -terpinol (2.1 %-12.8 %), β -cariofileno (3.0 %-4.2 %)	(Bautekedjiret, Bentahar, Belabbes, & Bessiere, 2003)
Brasil	α -Pineno (41.63%), 1,8-cineol (19.35%), canfeno (4.73%), verbenona (3.86%) y borneol (3.10%)	(Atti-Santos, y otros, 2005)
Turquía	Identificaron AE de tres regiones cercanas al mediterráneo: Mersin: 1,8-Cineol (58-1 %), alcanfor (12.1 %), α -pineno (8.8 %) Izmir: α -Pineno (14.2 %), 1,8-cineol (15.5 %), alcanfor (13.7 %), verbenona (11.8 %), borneol (8.1%) Canakkale: α -Pineno (12.6 %), 1,8-cineol (12.3 %), alcanfor (16.0 %), verbenona (12.2 %), borneol (7.4 %)	(Yesil Celiktas, Kodabas, Bedir, Vardar Sukan, & Ozek, 2007)
Egipto	Identificaron AE de dos regiones: Sinai: Verbenona (12.3%), alcanfor (11-3%), acetato de bornilo (7.6%), limoneno (7.1%) y linalool (6.60%), NO SE ENCONTRO 1,8-cineol. Giza: Alcanfor (14.9%), α -pineno (9.3%), 1,8-cineol (9.0%) y linalool (5.44%)	(Soliman & Kashory, 1994)
Italia	Identificaron dos quimiotipos: Quimiotipo I: (α-pineno) α -Pineno (28.6 %), canfeno (7.44 %), 1,8-cineol (8.50%), alcanfor (9.26 %), borneol (5.97 %) y verbenona (5.97 %). Quimiotipo II: (1,8-cineol) α -Pineno (18.6%), β -pineno (6.79%), 1,8-cineol (43,3%) y borneol (8.96%)	(Flamini, Cioni, Morelli, Macchia, & Ceccarini, 2002)

FUENTE: Vargas & Bottia, 2008.

Otra investigación que resume la composición química de varias muestras de Romero (*Rosmarinus officinalis*), es la de Zaouali, estudio que se realiza en el continente Africano con 14 poblaciones Tunecinas silvestres, se muestrean en tres zonas ecológicas: húmedas, áridas y semiáridas, el estudio se realiza con Cromatografía de Gases Acoplada a Masas. De acuerdo a las poblaciones, se identificaron 25 componentes, que representan 93,68 a 98,77% de los componentes totales, de los cuales el 1,8-cineol está entre el 20,34-45,79%, el alcanfor en concentraciones que oscilan entre el 8,5 a 30,17%, el α -pineno entre el 6,53 a 13,1% y el borneol entre el 3,73 a 25%, representan los principales compuestos. Los compuestos que más varían entre las poblaciones son: el α -pineno y el 1,8-cineol, este último a pesar de tener porcentajes altos en algunas poblaciones en otras no apareció. Lo que ratifica que, la composición y la naturaleza de los aceites esenciales varían según la población etapa bioclimática o grupo ecológico. Una diferencia que evidenció el estudio es que poblaciones de clima árido se caracterizan, por una alta proporción de α -pineno, alcanfor y un contenido relativamente bajo de 1,8-cineol. (Zaouali, Messaoud, Ben Salah, & Boussaïd, 2005)

3.1.1.2 Actividad Microbiológica

La actividad microbiológica del AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, está relacionada al porcentaje de terpenos que posee, pues independientemente de la variabilidad que se presenta en la sección anterior, siempre el denominador común en la composición química del AE de Romero será un porcentaje mayor o menor de terpenos.

La actividad microbiológica de este AE, entonces se puede fundamentar por el hecho de que uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula bacteriana. Lo que a la vez determina que las bacterias gram-negativas presenten mayor sensibilidad, entre otras cosas, puede deberse a su pared celular menos compleja dado que tiene una capa simple (red de mureína delgada), mientras que en las gram-positiva es una estructura de multicapa (red de mureína muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas) característica que le confiere mayor resistencia al ataque de los compuestos terpénicos. (Maguna, Romero, Garro, & Okulik, 2006).

En cuanto a los resultados de actividad, de igual forma a lo que ocurre en la composición química, la actividad microbiológica que se presenta en diferentes investigaciones, es muy variable y en este caso no sólo depende de factores intrínsecos del material vegetal, sino también a diferentes métodos de laboratorio que pueden ser usados para determinar *In vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. “Estos métodos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado” (Ramírez & Marín, 2009).

Otro aspecto importante de señalar, que afecta a la selección del método, es la composición química del AE, que como se ha mencionado tiene un alto porcentaje de terpenos, “el inconveniente que presenta es la escasa solubilidad acuosa de los terpenoides, lo que se convierte en un gran desafío a la hora de realizar la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), siendo necesario realizar ajustes a las técnicas, que logren una emulsión entre el medio de cultivo y el terpenoide mediante el uso de un emulgente adecuado” (Maguna, Romero, Garro, & Okulik, 2006).

Sin embargo de todo lo mencionado, y frente a la imposibilidad de coincidir en la diferentes investigaciones, con datos cuantitativos que reflejen la actividad antibacteriana, el dato reproducible en resumen de todas estas investigaciones es que “Las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) contienen compuestos con clara actividad antimicrobiana, actividad que es mayor en el aceite esencial y sobre bacterias Gram negativas, actividad atribuida a la concentración de terpenos del material vegetal, que posiblemente ocasionarían un aumento de la permeabilidad, dañando la membrana celular bacteriana” (Castaño, Ciro, Zapata, & Jiménez, 2010)

3.1.2 Formulaciones Cosméticas

Las formulaciones cosméticas se clasifican según su estado físico, tomando el trabajo de Olmos 2002, se pueden identificar seis fórmulas cosméticas.

- a. Soluciones: Son sistemas homogéneos, monofásicos, líquidos, por dispersión molecular de uno o más componentes en otro, llamándose al/los primeros soluto/s y

al último solvente, lo que exige una cierta afinidad, dependiente de los caracteres de ambos.

- b. Geles : Son soluciones monofásicas sólidas que se distinguen de los sólidos y de los líquidos por su permanente rigidez elástica y su alto contenido de líquidos, hidrófilos o lipófilos, que les confiere un carácter blando, fácilmente deformable, pero no derramable, generalmente transparentes.
- c. Suspensiones: Son sistemas heterogéneos, bifásicos, en los que una fase monofásica líquida o semilíquida, externa, dispersa una fase interna, sólida, insoluble, cuyo reducido tamaño de partículas condiciona la eficacia cosmética.
- d. Emulsiones : Son sistemas heterogéneos de dos (simples) o más fases líquidas (múltiples), constituidas por una fase continua, hidrófila o lipófila, y, al menos, una segunda fase dispersa en la primera, bajo la forma de finísimas partículas, que se oponen y se rechazan entre sí, sin mezclarse en reposo, separándose por una intercapa lo más pequeña posible. Cuando se agitan se obtiene una mezcla inestable de gotitas (fase dispersa, discontinua o interna) en el seno de una fase continua (fase dispersante o externa) con la intercapa que tiende a reducirse progresivamente, lo que explica la inestabilidad del estado.
- e. Polvos: Son los sólidos, orgánicos o inorgánicos, reducidos a partículas minúsculas. Cuando los polvos se someten a presión pueden hacerse compactos, permitiendo una estructura permanente que facilita la utilización en localizaciones precisas y en cantidades determinadas.
- f. Pastas: Son formas bifásicas, semisólidas, formadas por un sistema monofásico líquido en el que se dispersa un sólido insoluble, es decir polvos, que suelen estar micronizados y según la cantidad puede ser pasta oleosa o acuosa.

Estos seis tipos de formas cosméticas, se pueden reclasificar en tres categorías consideradas por Martini, 2005

1. Productos totalmente anhidros: que representan el 20% del total de productos cosméticos presentes en el mercado
2. Productos totalmente acuosos: representan un 20% del mercado
3. Emulsiones o dispersiones: representan el 60% restante.

Con respecto a la probabilidad que tienen estos productos en contaminarse, se menciona que los productos cosméticos más susceptibles a la contaminación son los que presentan agua en su formulación como emulsiones, geles, suspensiones o soluciones, y no exactamente por el contenido de agua, sino por la Actividad de Agua que se genera en estas formulaciones cosméticas, entendiéndose como actividad de agua (valor aw), la humedad en equilibrio de un producto, determinada por la presión parcial del vapor de agua en su superficie. El valor aw depende de la composición, la temperatura y el contenido en agua del producto. Tiene incidencia sobre las características de calidad, tales como: textura, sabor, color, gusto, valor nutricional del producto y su tiempo de conservación. (EQUINLAB S.R.L., 2008)

La actividad de agua (aw) es un parámetro fundamental para todos los formuladores de Productos Cosméticos y de Higiene, interesados en la: seguridad, estabilidad, preservación y la vida útil del producto. Tomando el estudio de Steinberg, 2011 el contenido de agua se refiere a la suma de toda el agua incorporada a la formulación con las materias primas, la aw y no el contenido, es la que influye en la conservación. La mayoría de las bacterias no pueden crecer en valores de aw <0,9, las levaduras tampoco pueden en valores aw <0,85 y los mohos necesitan aw > 0,7.

La actividad de agua típica de algunos cosméticos y productos de higiene es:

- Champús 0,982 -0,987 aw.
- Jabón normal 0,740 – 0,757 aw.
- Jabón con glicerina 0,659 – 0,759 aw.
- Crema corporal 0,972 – 0,983 aw.
- Desodorante en barra 0,984 aw.
- Bálsamo labial 0,36 aw.
- Pasta de dientes 0,585 – 0,984 aw

Es fundamental entender que la aw no elimina los microorganismos, solo impide el crecimiento y sólo se puede aplicar a productos que están libres de contaminación.

3.1.2.1 Champús

Es la forma cosmética escogida para realizar la investigación planteada, por dos razones: primero debido a que es un representante con mayor participación en el mercado cosmético, dentro de la categoría de emulsiones, y segundo porque es un producto que contiene una actividad de agua de 0,982 -0,987aw característica que le confiere al producto susceptibilidad de contaminarse.

Durante siglos, el jabón utilizado para lavar ropa era el mismo que lavaba el cabello. El jabón en forma líquida, destinado especialmente al lavado del cabello, fue creado en 1890, en Alemania. Sin embargo, la novedad solamente llegó al público después de la Primera Guerra Mundial. Considerado artículo de lujo y utilizado por pocos, el producto fue bautizado por los ingleses como shampoo, en alusión a la palabra hindú “champo”, que significa masajear (normalmente con algún tipo de aceite, en combinación con componentes aromáticos tales como sándalo, jazmín, azafrán, rosa y almizcle). En el inicio del siglo pasado, en tiempos de dominio inglés sobre la India, elementos de la cultura hindú estaban de moda, y de esa manera el concepto de “champo” fue introducido en Gran-Bretaña por un empresario hindú llamado Sake Dean Mahomed, en 1814. (Franquillino, Productos para el cabello, 2010).

El objetivo principal de un champú es limpiar el cabello y el cuero cabelludo de los aceites hidrofóbicos y de partículas extrañas. El producto no debe ser tóxico ni irritante a la piel y a los ojos. Considerando el objetivo principal del producto los constituyentes básicos de una formulación de champú son agua y una combinación de tensioactivos, generalmente detergentes aniónicos. Los tensioactivos actúan para emulsionar los aceites acumulados en la superficie del cabello, para luego ser arrastrados y eliminados durante el proceso de enjuague con el agua. Idealmente, un champú debe exhibir efectos suaves de limpieza, buena espuma, y buena capacidad de aclarado (fácil enjuague), y el producto debe ser no tóxico y no irritante para la piel y los ojos. Champús especiales pueden incluir agentes de acondicionamiento, agentes de control de la caspa, ingredientes para proteger el color, protectores solares, agentes de aromaterapia, etc. (A. del Pozo & Viscasillas, 2006)

Un Champú especial añadira a su composición básicas de tensioactivos, algunos ingredientes como: potenciadores de espuma, agentes de control de la viscosidad,

conservantes, colores, fragancias, opacificantes, vitaminas, filtros solares, extractos botánicos, y acondicionadores .(Berthiaume, 1997)

Se puede resumir entonces, que considerando el objetivo principal del producto que es despegar, emulsionar y poner en suspensión las suciedades fijadas en la superficie de los cerca de 150000 cabellos de una cabellera normal; la composición básica de un champú estaría dada por tres componentes:

1. Un Detergente
2. Un Regulador de la Viscosidad
3. Agua

Los otros ingredientes, se pueden considerar como aditivos y estarían los conservantes, nacarantes, colorantes, perfumes, vitaminas, y todos los principios activos que se deseen incorporar. (Martini M. C., 2005)

Profundizando en uno de los ingredientes básicos “El Detergente”, este químicamente es un tensioactivo. Un tensioactivo contienen en su molécula, uno o varios grupos hidrofílicos, de tipo iónico y no iónico y generalmente una estructura hidrocarbonada lipofílica no polar. Las propiedades generales y comportamiento de los agentes tensoactivos se deben al carácter dual de sus moléculas (grupo hidrófilo y lipófilo) ; es así como el antagonismo entre estas dos secciones de su molécula y el equilibrio entre ellas es la que dá al compuesto sus propiedades activas de superficie. El grupo hidrófilo ejerce un efecto solubilizante y tiende a llevar a la molécula a disolución completa. El grupo hidrófobo, en cambio, debido a su insolubilidad tiende a contrarrestar la tendencia del otro. Sí se logra el equilibrio adecuado entre los dos grupos se ve que la sustancia no se disuelve por completo, ni queda sin disolver del todo, concentrándose en la interfase con sus moléculas orientadas de tal forma que los grupos hidrófilos se orientan hacia la fase acuosa, mientras que los hidrófobos hacia la no acuosa. (Manrique, 2009).

Los tensioactivos pueden clasificarse según su carácter iónico, en:

1.-Surfactantes aniónicos: Son utilizados en las formulaciones para uso personal. Presentan el inconveniente de ser incompatibles con los surfactantes catiónicos y de precipitar en presencia de cationes divalentes. En solución, pueden producir por hidrólisis, un pH alcalino indeseable.

2.-Surfactantes catiónicos: Los más usados son los derivados de amonio cuaternario y las sales de aminas, por ser menos sensibles a las variaciones de pH. Se emplean principalmente como bactericidas, antisépticos y enjuagues.

3.-Surfactantes anfóteros: Son capaces de actuar como surfactantes aniónicos, catiónicos o no iónicos según el pH del medio. Se emplean a la vez como agentes detergentes (como los aniónicos) y bactericidas (como los catiónicos). Son semejantes a los componentes de las proteínas y por tanto son en general poco irritantes, pero presentan el inconveniente de ser muy costosos.

4.- Surfactantes no iónicos: Presentan la ventaja de ser compatibles con otros tipos de surfactantes, y sus propiedades son pocas sensibles a los cambios de pH. Se emplean como detergentes y emulsificantes. (Miñana & Goncalves, 2011).

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Recolección del material vegetal silvestre

Se realizó la recolección en el mes de Diciembre en la parroquia de Calderón. Barrio La Pradera, propiedad privada.

Calderón tiene una altura de 2.696 metros sobre el nivel del mar (msnm) con un clima templado en día, entre 18 a 24°C en el día y 10 a 12°C en la noche, está ubicada a 15 km del norte de Quito, en una zona árida de la meseta de Guangüiltagua. El nombre primitivo de la zona fue Carapungo (kichwa), que significa “entrada de los Caras”. Limita al norte con la parroquia de Guayllabamba, al sur con la de Llano Chico, al este con la de Puenbo y al oeste con las de Pomasqui y San Antonio. Posee un espacio de 7.890 hectáreas y alcanza una altura máxima de 2.659 metros. (Vasquez, 2013).

Se realizó la recolección de 30 kilos de ramas de Romero (*Rosmarinus officinalis*). El material se llevó en sacos de yute, a los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana, Campus El Girón.

El material vegetal se limpió y se retiró el tallo de las hojas. Las hojas fueron extendidas, sobre papel periódico, en las mesas del laboratorio de Ciencias Biológicas, a una temperatura ambiente de 18°C, sin influencia directa de la luz, el material vegetal era removido dos veces al día, por quince días.

La razón más importante desde el punto de vista técnico, por la que se seca el material vegetal es su conservación; por este método se promueve el mantenimiento de los componentes del vegetal fresco y se evita la proliferación de microorganismos. Siendo el proceso de secado parte del procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas, establecido en México por el Proyecto Sagarpa Conacyt. (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012)

Las referencias de trabajos anteriores concluyen un mayor rendimiento de AE en hojas secas de Romero *Rosmarinus officinalis*.

3.2.2 Extracción de Aceite Esencial de Romero

El AE del material vegetal fue obtenido, por destilación con agua y vapor, mediante un destilador industrial de acero con capacidad de 10 kg de propiedad de la Fundación Chankuap en la región amazónica del Ecuador, en la ciudad de Macas capital de la provincia de Morona Santiago.

Los parámetros de extracción, se resumen en la Tabla N° 2. El aceite extraído fue deshidratado con sulfato de sodio anhidro y se almaceno en un frasco ámbar de 200 ml a 4 °C, protegidos de la luz.

TABLA N° 2: CONDICIONES EXPERIMENTALES DE EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL AE DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) POR DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

PARÁMETROS	DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR
Parte de la planta /Estado	Hojas /Secas
Cantidad de material vegetal	25000 g
Volumen de agua	10 litros
Tiempo de extracción	480 minutos
Temperatura	300°C

Elaborado por: la autora

El rendimiento se calcula relacionando el peso de la cantidad obtenida (masa en gramos) del AE, con la cantidad del material vegetal seco usado, según la siguiente ecuación

Ecuación 1: Porcentaje de Rendimiento

$$R = (W_{AE} / W_{MV}) \times 100$$

Donde:

W_{AE} = Masa del AE obtenido en gramos (g)

W_{MV} = Masa del material vegetal seco empleado en gramos (g)

R= Porcentaje de rendimiento (%)

3.2.3 Control de Calidad del Aceite Esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Los parámetros analíticos empleados para establecer la calidad del AE en la presente investigación se resumen en la siguiente tabla:

TABLA N° 3 : PARÁMETROS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA ESTABLECER LA CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE)

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	DETERMINACIONES FÍSICAS	CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS
Olor	Densidad	Perfil cromatográfico
Color	Índice de refracción	

Elaborado por: la autora

La calidad de los aceites esenciales está determinada por su composición química, características fisicoquímicas y organolépticas. Por esta razón, las farmacopeas oficiales, o las normas oficiales señalan que los parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los aceites deben ser los siguientes:

3.2.3.1 Características Organolépticas

Para determinar las siguientes propiedades: color, olor y apariencia, se realizan pruebas subjetivas sensoriales basadas en el juicio humano, en las que se utiliza los órganos de los sentidos y no se necesita de un panelista entrenado.

3.2.3.2 Densidad Relativa

La densidad relativa d_{25} de una sustancia es la relación entre la masa de un determinado volumen de la sustancia a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

La determinación está basada en la metodología definida por la Farmacopea Española para aceites esenciales. (Ministerio de Sanidad y Consumo España, 2002)

DISPOSICIONES GENERALES DEL ANALISIS

- La temperatura ambiente del lugar donde se calibre el picnómetro o se realice la determinación, deberá ser menor de 25°C.
- Durante la calibración del picnómetro y durante la determinación de la densidad relativa, el picnómetro no deberá entrar en contacto directo con las manos del operador.
- Cada determinación deberá efectuarse por duplicado sobre la misma muestra

preparada.

EQUIPO UTILIZADO

- Picnómetro tipo Gay-Lussac marca LMC Germany , con capacidad de 25 cm³
- Baño maría marca Shel Lab, modelo W14M-2, con regulador de temperatura, ajustado a $25^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- Termómetro, con divisiones de $0,1^{\circ}$ ó $0,2^{\circ}\text{C}$.
- Balanza analítica marca Mettler Toledo modelo ML204/01.

PROCEDIMIENTO

A. CALIBRACIÓN DEL PICNÓMETRO

- Se lavó el picnómetro y se llenó completamente con agua destilada recién hervida y enfriada hasta 20°C , se tapó cuidadosamente evitando la inclusión de burbujas de aire. A continuación, se sumergió en el baño de agua a $25^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo inmerso durante 30 min.
- Se removió cuidadosamente cualquier porción de agua que haya exudado el capilar; se retiró el picnómetro del baño y se secó con algún papel absorbente adecuado. Se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min y se pesó con aproximación a 0,1 mg; se registró el resultado como **m₁**.
- Se vació el picnómetro y se enjuago varias veces con alcohol etílico y luego con éter etílico; se dejó secar completamente y, junto con todas sus partes, se pesó con aproximación a 0,1 mg; se registró el resultado como **m**.

B. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD

- Se llenó completamente el picnómetro (limpio y seco) con la muestra preparada y llevada a 23°C , se tapó cuidadosamente evitando la inclusión de burbujas de aire. A continuación, se sumergió en el baño de agua a $25^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se lo mantuvo inmerso durante 30 min.
- Se removió cuidadosamente cualquier porción de agua que haya exudado del capilar; se sacó el picnómetro del baño y se secó con papel absorbente adecuado. Se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min y se pesó con aproximación a 0,1 mg; se registró el resultado como **m₂**.

C. CÁLCULOS

La densidad relativa a 25/25°C se calculó mediante la ecuación siguiente:

Ecuación 2 : Determinación de la densidad relativa

$$d_{25} = (m_2 - m / m_1 - m)$$

siendo:

d_{25} = densidad relativa a 25/25°C.

m = masa del picnómetro vacío, en g.

m_1 = masa del picnómetro con agua destilada, en g.

m_2 = masa del picnómetro con muestra, en g

ERRORES DEL MÉTODO

La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debía exceder de 0,0005; en caso contrario era necesario repetir la determinación.

3.2.3.3 Índice de Refracción

El índice de refracción n^t de un medio en relación al aire es igual a la relación entre el seno del ángulo de incidencia de una rayo luminoso en el aire y el seno del ángulo de refracción del rayo refractado en el medio considerado. (Ministerio de Sanidad y Consumo España, 2002).

El método aplicado para la determinación del Índice de Refracción, es mediante un refráctometro, el principio de funcionamiento, desde el punto de vista óptico, está dado por el hecho de que sólo parte de la luz incidente en el prisma de medición es transmitida (aquella que lo hace con un ángulo menor al ángulo crítico). Debido a esto, se produce una división neta del campo en dos zonas, una clara y una oscura. Rotando el sistema de prismas se logra visualizar la línea divisoria formada que se traduce en una medida graduada que proporciona, directamente, el valor del índice de refracción.

DISPOSICIONES GENERALES DEL ANÁLISIS

- La temperatura ambiente del lugar donde se calibre el refractómetro o se realice la determinación, deberá ser menor de 25°C.
- La calibración se realiza con agua
- Cada determinación deberá efectuarse por duplicado sobre la misma muestra

preparada.

EQUIPO UTILIZADO

- Refractómetro Abbé ATAGO MODELO NAR-1T
- Baño de agua SHEL-LAB modelo W14M-2, ajustado a $25^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- Termómetro, con divisiones de $0,1^{\circ}$ ó $0,2^{\circ}\text{C}$.

PROCEDIMIENTO

- Se conectó el Baño de agua al sistema de recirculación de agua del refractómetro.
- Se controló con el termómetro la temperatura del baño, ajustando a $25^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- Se limpió los prismas con papel absorbente humedecido con etanol, se dejó secar.
- Se colocó la muestra 2 ó 3 gotas de aceite con un gotero sin tocar los prismas.
- Se observó el ocular y se realizó el ajuste del botón de dispersión hasta que aparezca una parte sombreada y una iluminada.
- Se realizaron dos lecturas que no difirieron en más de 0,002.
- Se reportó como valor de índice de refracción, el promedio de las dos lecturas.

3.2.4 Caracterización química del Aceite Esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*).

Los Aceites Esenciales (AE) poseen una química compleja, aunque generalmente consisten en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente; son derivadas del metabolismo secundario de las plantas y asociadas o no a otros componentes.

Los AE son mezclas fragantes, su calidad y precio en el mercado están determinados principalmente por su composición química, contenido de las sustancias de interés, propiedades fisicoquímicas y organolépticas. De esta manera, el control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que la esencia posee determinadas características analíticas.

Los métodos analíticos instrumentales son ampliamente utilizados para determinar la composición química de diversos materiales fragantes, entre ellos los AE. Estos métodos comprenden técnicas de separación como cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), electroforesis capilar (EC); espectroscopías de infrarrojo (IR), de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas (MS) y técnicas acopladas como espectroscopia de gases acoplada a masas (GC-MS). (Bauer, Garbe, & Surburg, 2001)

La metodología utilizada en la presente investigación es cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), una técnica analítica poderosa, que permite la separación de los componentes de una muestra en el tiempo y brinda información estructural acerca de los analitos eluidos. En GC-MS se utilizan como criterios de identificación la información de los tiempos e índices de retención junto con la información estructural, patrones de fragmentación, obtenidos a partir de los espectros de masas de los analitos que eluyen de la columna cromatográfica e ingresan al sistema de detección (espectrómetro de masas).

**TABLA N° 4: PARÁMETROS DEL GC-MS CARACTERIZACIÓN QUÍMICA AE
ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)**

Parámetros del Equipo GC/MS	
Flujo de gas Helio	1 m x min
Pureza del Gas Helio	99,999%
Temperatura del inyector	280°C
Relación de Split Ratio	1:40
Columna Capilar	factor four VF-5ms poly-5% phenyl-95%-dimethyl-siloxane (i.d., 0.25 mm; largo, 30 m; film, 0.15 lm).
Temperatura Inicial	45°C
Programación de Temperatura del Horno	45° C – 100° C Rate 1 °C x min 100° C – 250° C Rate 5° C x min
Energía de Ionización	70 Ev
Corriente de emisión	10 µA
Rango de masa	35-400 m/z
Tiempo de espera a 250°C	15 minutos
Tiempo total de análisis	90 minutos

Elaborado por: la autora

PROCEDIMIENTO

- Se tomó 10µl de aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis*
- Se diluyó en 1 ml de diclorometano,
- Se inyectó 2 µl de la muestra en el equipo GC-MS, Marca Varian, modelo 3900, serie 100568, bajo las condiciones especificadas, en la Tabla N° 4

- Se leyó el cromatograma a los 90 minutos, para la respectiva interpretación.
- Los compuestos fueron identificados por comparación con la base de datos NIST/02, y verificación en la mayoría de los compuestos de su índice de retención teórico. (Adams, 2009)

3.2.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, provocando que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Los problemas generales inherentes a los ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores. (Vanden Berghe & Vlietinck , 1991), de allí la importancia de conocer algunos de los métodos existentes para la determinación de actividad biológica *in vitro*.

De los métodos existentes, algunos han sido adaptados para evaluar antibacteriana en compuestos vegetales, el trabajo Ramírez & Marín, 2009 se presentan algunas metodologías utilizadas, en esta revisión se presentan los criterios más relevantes que permitan estandarizar los procesos para la evaluación de la actividad antibacteriana, para realizar una selección adecuada de la metodología es necesario considerar la naturaleza del activo a evaluar, si es extracto o aceite, características de polaridad o no polaridad, e incluso los microorganismos de ensayo. La revisión de Ramírez & Marín menciona algunos métodos que podrían presentar una alternativa para la evaluación, entre ellos:

- Método de difusión en disco, el fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que tiene una cantidad específica de antimicrobiano. El disco es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo, el antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición es medida y se relaciona con la MIC.

- Método de dilución: Se colocan diferentes concentraciones del agente antimicrobiano, diluidas en caldo o en agar y se añade un inóculo conocido de la cepa bacteriana. La MIC hace referencia a la menor concentración de una dilución seriada de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de una bacteria, son interpretadas como susceptible, intermedio o resistente. Esta interpretación se realiza una vez que se confirma el crecimiento en tubos, con las concentraciones presumiblemente más eficientes
- Método de Microdilución. Se utilizan placas que tienen 96 pocillos (12 mm x 8mm), en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. Las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, a 1, 3,5-trifenilformazán, o simplemente formazán, reacción redox que se evidencia con un cambio de color de amarillo a rojo, evidenciando de esta forma actividad metabólica, el pozo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la MIC. (Ramírez & Marín, 2009)
- Bioautografía: Es una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía de capa fina TLC. El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que dé mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium. (Colorado, Galeano, & Martínez, 2007).
- A parte de los métodos descritos también se puede utilizar: análisis conductimétrico, que detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la

conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo. (Ramírez & Marín, 2009). y sistemas automatizados, utilizando como método de detección la Fluorometría, Turbidimetría y Colorimetría, se han fabricado equipos que permiten detectar el desarrollo bacteriano en una suspensión, con y sin antimicrobianos, mediante la medida de turbidez que tenga la suspensión. (García P. , 2002)

El método elegido para esta investigación, es MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO, considerando tanto las ventajas como las desventajas del método. Entre las ventajas se puede mencionar que sus resultados son altamente reproducibles. (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach, & Thornsberry, 1979). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), de Estados Unidos. “El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre las cepas”. (Ramírez & Marín, 2009).

Entre las desventajas del método se menciona algunas como: la composición del papel filtro Whatman que se utiliza como discos de sensibilidad, estos están compuestos de celulosa (uniones β 1-4 de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica. Esto provoca que exista interferencia directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar; por lo que es muy importante conocer exactamente cuál es la característica química del compuesto responsable de la actividad. (Grant Burgess, Jordan, Migena Bregu, Mearns - Spragg, & Boyd, 1999). En la presente investigación está desventaja es orientativa y confirma la selección de la técnica de difusión en discos, ya que el activo natural es el AE de Romero *Rosmarinus officinalis* de característica apolar.

Otra desventaja es que hay muchas variables que afectan el diámetro del halo de inhibición, entre ellas, las relacionadas con el agar Mueller- Hinton (espesor, pH, contenido de cationes timina y timidina). Los resultados también varían según el operador

que haga la lectura del halo de inhibición siendo importante la necesidad de que estas pruebas sean realizadas por personas con un alto grado de experiencia en microbiología, otras variables que afectan los resultados están relacionadas al método de análisis como: forma de hisopado, temperatura y tiempo de incubación, preparación del inóculo bacteriano entre otras. (Clinical Laboratory Standards Institute, 2003).

Estudios realizados en el 2008, determinaron el efecto del pH en el diámetro del halo de inhibición, concluyendo que éste depende más del antimicrobiano ensayado que de la cepa estudiada. Un pH fuera del rango aceptable (7,2 a 7,4) altera el resultado dependiendo del antimicrobiano ensayado, en cambio el efecto del espesor del agar afecta siempre independientemente del agente antimicrobiano o la cepa analizada, generando un diámetro de halo de inhibición menor mientras más espeso está el agar y un diámetro de halo de inhibición mayor mientras menos espesor tenga el agar, más grande con menos espesor. (Riera, Chamorro, Zárate, Falcón, & Franco, 2008)

A pesar de estas desventajas, priman las ventajas del método, consciente que cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar, controlando las variables presentadas anteriormente es posible obtener resultados confiables, recalcando que la elección del método responde al tipo de muestra a analizar, una muestra lipofílica.

3.2.5.1 Disposiciones Generales del Análisis

A. MATERIAL BIOLÓGICO: Corresponde a las bacterias especificadas en el Reglamento Europeo 1223/2009 para la evaluación de conservación antimicrobiana en productos cosméticos según la norma ISO 11930:2012 (Challenge Test). Los microorganismos de prueba son: (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Candida albicans* ATCC 10231; *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404; *Escherichia coli* ATCC 8739). Todas las cepas son certificadas con ATCC y se adquirieron con su respectivo certificado de análisis, adjuntos en los anexos (Anexo 1-2-3-4-5)

B. MEDIOS DE CULTIVO : El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomienda el uso de Muller Hinton Agar, para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a

factores como: buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, bajo contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina, crecimiento satisfactorio de la mayoría de microorganismo patógenos y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

TABLA N° 5 : COMPOSICIÓN MEDIO MÜLLER HINTON AGAR

Medio Müller Hinton Agar DIPCO™		
Lote 2150228		
Fecha de Caducidad 2017-01-31		
Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Polvo de extracto de carne	2	Suspender 38g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar hidratar de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas petri
Peptona ácida de caseína	17.5	
Almidón	1.5	
Agar	17	
pH final: 7.3 ± 0.1		

Elaborado por: la autora

Las consideraciones tomadas en el manejo del medio de cultivo para la prueba de sensibilidad antimicrobiana se basan en el estudio de Herrera, 1999 y son las siguientes:

- Se aseguro que el polvo para la preparación no este hidratado, mediante apreciación visual de cambio de color o consistencia.
- Una vez preparado el medio bajo las instrucciones del fabricante, se ajustó el pH entre 7,2 a 7,4
- Se controló la profundidad del agar, al dispensar en las cajas petri, colocando de 25 a 30 ml por caja, se logra un agar con más de 4 mm de profundidad .

- Si se evidenciaba en el momento de usar las placas una humedad superficial excesiva, se colocaba en una estufa (35 °C) o en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

C. LECTURA DE HALOS DE INHIBICIÓN

Las placas se examinaron después de 16 a 18 horas de incubación.

La medición se realizó, bajo las siguientes condiciones: (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 2009)

- Se colocó la caja petri sobre el Contador de Colonias marca Boeco modelo CC-1, ajustada sobre la pantalla de luz blanca.
- Se ajustó la lente de la lupa, en el ángulo adecuado para lograr una correcta amplificación de la imagen.
- Se midieron los halos de inhibición usando un calibrador que se colocó en la parte posterior de la caja petri invertida, se incluyó en la medida el diámetro del disco redondeando al milímetro entero más cercano.
- En los casos que no se evidenciaron un halo, se reportó el diámetro del disco de sensibilidad (tamaño 6mm).

3.2.5.2 Equipo utilizado

Los equipos utilizados para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria se detallan en la siguiente tabla:

TABLA N° 6: EQUIPOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

EQUIPO	MARCA	MODELO
Autoclave vertical	Phoenix	AV50
Balanza semianalítica	O-Haus	Adventurer Pro AV2101
Baño María	Shel Lab	W14M-2
Cámara de flujo Horizontal	Forma Scientific	1845
Centrífuga	SELECTA	Centro8/7001356
Contador de Colonias	BOECO	CC-1
Estufa	Memmert	BE-400
Espectrofotómetro UV	Shimadzu	UV mini 1240
Microondas	Panasonic	NN-SA968W
Micropipeta	DROPTEK	100 - 1000 µl
Plancha calefactora	Thermo	SP131015
Purificador de agua	Millipore	Direct-Q
Potenciómetro	Mettler Todelo	Seven Multi
Vortex Mixer	Gemmy	VM-300

Elaborado por: la autora

3.2.5.3 Procedimiento

Al tratarse de material biológico con certificación ATCC, los procedimientos detallados a continuación están basados en la NORMA ISO 13485:2003 MicroBioLogics.

A. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

La metodología de activación está basada en un crecimiento primario del microorganismo, utilizando un medio no selectivo. El método de activación es definido por Microbiologics, y de acuerdo al agente biológico lo empleado es lo siguiente.

TABLA N° 7 : MÉTODO DE ACTIVACIÓN CEPAS ATCC

MICROORGANISMO ATCC	MÉTODO
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Método 5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Método 5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Método 1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Método 1
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9015	Método 1

Elaborado por: la autora

El procedimiento que se siguió es el siguiente:

- Se hidrató un hisopo KWIK-STIK™ (pellet liofilizado de microorganismo ATCC) en Tryptic Soy Broth (TSB), fluído hidratante que se encuentra dentro del dispositivo.
- Se inoculo la caja petri, con el medio de cultivo primario, según el método defenido. En el caso del **Método 1**, el medio estándar recomendado y utilizado es Agar Nutritivo, se sembró por hisopado, y se incubó a 35°C, en atmósfera aerobia de 24 a 48 horas. En el caso del **Método 5** el medio utilizado fue Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), se sembró por hisopado, y se incubó a 25° C en atmósfera aerobia de 2 a 7 días. (Microbiologics, 2011)

B. PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO.

La preparación del inóculo bacteriano se realizó mediante el Método para la cuantificación del crecimiento de poblaciones microbianas en base a la masa celular por turbidimetría. Se utilizo la técnica de densidad óptica que relaciona la medida de absorbancia con el crecimiento bacteriano. Esta técnica se basa en el hecho de que las partículas pequeñas difractan la luz, dentro de ciertos límites, de manera proporcional a su concentración. Cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, la reducción en cantidad de luz transmitida a consecuencia de la difracción es pues una medida de masa bacteriana. Tales mediciones se hacen normalmente con un fotómetro o espectrofotómetro. (Stainer, Ingraham, Wheelis, & Painter, 1989).

Con el fundamento descrito anteriormente la estandarización de la densidad del inóculo se realizó mediante un Espectrofotómetro UV marca Shimadzu modelo mini 1240, las condiciones referenciadas bibliográficamente determinan que la longitud de onda de 625 nm un valor de absorbancia de 0,08 a 0,11 es equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml para bacterias, y a una longitud de onda de 530 nm un valor de absorbancia de 0,13 a 0,16 es equivalente a $1-5 \times 10^6$ células para hongos y levaduras. (Rosato, 2013)

El procedimiento fue el siguiente:

- Se tomó de una caja petri de cepas bacterianas activadas, una porción de colonias morfológicamente similares, se inoculó en un tubo de ensayo con 5ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB), y se incubó a 37°C por 18 horas (cultivo overnight).
- Se separó el pellet de cepas del medio, mediante centrifugación por 20 minutos a 2500 rpm en la Centrífuga marca Selecta, modelo Centro 8/7001356.
- Se resuspendió el pellet celular mediante agitación utilizando Vortex Mixer marca Gemmy modelo VM-300, utilizando la cantidad necesaria de suero fisiológico estéril que permita lograr la densidad óptica establecida por lectura espectrofotométrica.
- Se realizó la lectura de absorbancia de las soluciones diluidas del pellet celular, en el Espectrofotómetro UV marca Shimadzu modelo mini 1240, a una longitud de onda de 625nm para bacterias y 530nm para hongos y levaduras; hasta llegar a los valores de absorbancia establecidos por la referencia; para garantizar una masa celular inicial estandarizada.

C. PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ACEITE

Se prepararon diez diluciones sucesivas de aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* (5% - 2,5% - 1,25% - 0,63% - 0,32% - 0,16% - 0,08% - 0,04% - 0,02% - 0,01%) utilizando como diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO) líquido polar miscible y sin actividad antimicrobiana.

Los rangos de las diluciones, se escogieron en función de los siguientes aspectos:

- Una formulación cosmética no admite concentraciones altas de AE, concentraciones mayores de 3%, generan problemas organolépticos especialmente en lo que respecta a la apariencia del producto, por lo que se establece como concentraciones máximas de aceites esenciales en una formulación cosmética 5%. (Miñana & Goncalves, 2011)

- Investigaciones anteriores de actividad bacteriana de AE de Romero *Rosmarinus officinalis* concluyen que es necesario concentraciones mayores del 2% de AE de Romero, para lograr inhibición de bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, (Castaño, Ciro, Zapata, & Jiménez, 2010) siendo este un microorganismo de prueba, es necesario conocer la actividad en concentraciones mayores del 2%.
- La serie se realiza con dilución sucesiva siempre al 50%, partiendo del 5%, primero para garantizar diluciones más exactas y segundo para racionalizar el uso de un ingrediente especial, llegando a concentraciones muy bajas como 0,02% que podrían ser en caso de comprobarse eficiencia, rentables en el ámbito productivo.

D. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El método empleado es el Kirby-Bauer

El sembrado o inoculación de bacterias, en la placa se realizó por cuadruplicado, que estadísticamente garantiza un error inferior al 10%. (CYTED Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo, 1995)

- Se sembró por estriado en medio Muller Hinton solidificado, el inóculo recientemente preparado (no más de 15 minutos).
- Se aplicó en cada placa con una pinza estéril, ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio, cuatro discos de sensibilidad (GRADE AA DISCS CAT N° 2017-006), previamente esterilizados.
- Se colocó sobre cada disco 10ul del AE en las concentraciones establecidas de prueba.
- La incubación de las cajas petri se realizó a 37 °C por 24 horas en la Estufa marca Memmert modelo BE-400. Y se realizó la lectura del diámetro de los halos de inhibición.
- La actividad antifúngica del *Aspergillus brasiliensis*, se ensayó con una variante del método difusión en agar, se usó 20 ml de agar dextrosa Sabouraud fundido a 45°C que fue asépticamente mezclado con 1 ml de la suspensión fúngica (inóculo 1×10^5 UFC/ml) en una caja petri de 100 mm x 15 mm. Se realizaron pozos de 6 mm de diámetro donde se inoculó 0,1 ml de las diferentes concentraciones de AE de *Rosmarinus officinalis*. Se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se incubó a 28 °C por 14 días, luego se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición. (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008)

3.2.6 Elaboración de la fórmula cosmética de estudio.

Existen un buen número de ingredientes que pueden ser incorporados en un champú, cada uno con un papel importante dentro de la misma. En la siguiente tabla se resumen todos los componentes que se podrían incorporar:

TABLA N° 8: INGREDIENTES EN UNA FORMULACIÓN DE UN CHAMPÚ.

COMPONENTE	FUNCIÓN
Tensioactivo primario	Detergentes espumantes
Tensioactivo(s) secundario(s)	Aseguran la limpieza y acondicionan el cabello
Estabilizadores de espuma	Permiten estabilizar el volumen y la textura de la espuma
Agentes reológicos	Confieren textura y características adecuadas (viscosidad)
Antiestáticos	Mejoran la peinabilidad, brillo
Reengrasantes	Minimizan el efecto de deslipidización producido por el lavado
Reguladores de pH	Ajustan pH a valores eudérmicos
Quelantes	Evitan fotodegradación de colorantes y perfumes, la formación de complejos coloreados
Opacificantes/Nacarantes	Modifican el aspecto, confieren un acabado nacarado
Conservantes	Conserva el producto
Colorantes	Confieren color
Perfume	Confieren olor
Activos específicos	Otorgan propiedades específicas según el tipo de cabellos
Agua desionizada	Componente mayoritario

Fuente: (A. del Pozo & Viscasillas, 2006)

3.2.6.1 Selección de los ingredientes de la formulación

CONSIDERACIONES

Los componentes que se seleccionaron dentro de la formulación de un champú, están orientados no sólo a cumplir la función higiénica, sino también a impedir la acción agresiva, desecante o incluso irritante que pueden provocar los ingredientes que tienen como función la detergencia, a más de proporcionar características estéticas deseadas en el cabello (suavidad, brillo, mantenimiento del color, etc). Debido a que el objetivo es identificar el comportamiento conservante que podría tener un activo natural como el AE de Romero *Rosmarinus officinalis* en una formulación común básica de un champú, todos los champús se formulan con mezclas de tensioactivos que ayuden a potencializar la función higiénica dando a la vez características aceptables al producto y a la vez permitan la integración de componentes lípidicos que se encuentran en la formulación y pueden conferir beneficios adicionales al cabello. Considerándose como componente primario el tensioactivo primario, y como componentes secundarios todos los componentes que determinan propiedades estéticas al cabello (peinabilidad, humectación, regeneración, etc), y componentes que generen buena presentación del producto (color, olor, viscosidad, espuma).

Se utilizaron tres tensioactivos: un tensioactivo principal de característica aniónica con propiedad detergente, y dos tensioactivos secundarios uno con característica anfotérica y otro con característica no iónica, tensioactivos secundarios que confieren propiedades acondicionadoras y estéticas al cabello como peinabilidad y humectación, estos inciden a la vez en la presentación del producto, mejorando características de viscosidad y espuma.

- **TENSIOACTIVO PRIMARIO:** Se utiliza como tensioactivo primario Sodium Laureth Sulfate (Denominación INCI International Nomenclature Cosmetic Ingredient, Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos), químicamente Poli(oxi-1,2-etanodiilo), α -sulfo- ω -(dodeciloxi)-, sal sódica; reconocido por COLIPA (Asociación Europea de Cosméticos, Productos de Tocado y Perfumería) como Tensioactivo, con características limpiadoras y espumantes. (LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS, 2006). Tensioactivo más utilizado en el mercado cosmético, a pesar de sus cuestionamientos, el Programa Nacional de Toxicología de la Organización Mundial de la Salud mediante la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha resuelto en el 2013, que Sodium Laureth Sulfate, no figura como producto cancerígeno y es

seguro en concentraciones de hasta 50 % . (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA, 2013)

La concentración empleada en la formulación esta de acuerdo a la señalada en la ficha técnica del proveedor del 16 al 30% (Ver Anexo 6).

- **TENSIOACTIVOS SECUNDARIOS:** Se utilizan dos tensioactivos secundarios: uno de característica anfótera cocamidopropylbetaine y otro un tensioactivo no iónico PEG-150 pentaeritritil tetraestearato y PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos;
- **COCAMIDOPROPYLBETAINE (INCI),** la denominación química 1-propanaminio, 3-amino-N-(carboximetil)-N, N-dimetil-,derivados N- acílicos de coco. Ingrediente con características tensioactivas, limpiadoras y acrecentadoras de espuma. Se utiliza en la concentración establecida en la ficha técnica alrededor del 10%. (Ver anexo 7)
- **PEG-150 PENTAERITRITIL TETRAESTEARATO (Y) PEG-6 GLICÉRIDOS CAPRÍLICOS/CÁPRICOS (Y) AGUA.** Comercialmente CROTHIX LIQUID materia prima patentada en los EE.UU con N° 5,192,462 asignada a Croda Inc. Químicamente es una mezcla optimizada de un éster de alto peso molecular y triglicéridos vegetales modificados, diseñado como un espesante para sistemas detergentes acuosos, con características de un surfactante no iónico. Se utiliza en la concentración recomendada por el productor de 1 a 8% (Ver Anexo 8). Los tensioactivos no iónicos tienen propiedades que los hacen valiosos componentes en muchas formulaciones y los conservantes cosméticos deben ser compatibles con ellos, esto debido a que algunos conservantes sufren una grave pérdida de la actividad conservante en presencia de emulsionantes no iónicos, por ejemplo en el caso de los parabenos aunque la regulación establece como límite máximo un 0.7%, la recomendación de los fabricantes es que cuando se utilice en presencia de tensioactivos iónicos se debe aumentar la concentración del conservante, así la concentración recomendada de Phenova mezcla de parabenos, en presencia de un tensioactivo iónico va desde el 0,75 al 1%, valores que se utilizan a pesar de encontrarse fuera de los rangos establecidos por Regulaciones Internacionales como COLIPA. (Miñana & Goncalves, 2011)

Esta disminución de la actividad conservante es la razón más importante de incorporarle en la formulación, probar si el AE esencial de Romero *Rosmarinus officinalis*, puede generar actividad conservante aún en presencia de un surfactante no iónico, someter al conservante prueba a un escenario crítico.

- **CONSERVANTE:** Se utiliza el conservante más utilizado en el mercado una mezcla de parabenos: Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben (INCI) comercialmente conocido como Phenova, es una solución de ésteres del ácido p-hidroxibenzoico en fenoxietanol (etilenglicol-monophenylether). Se utiliza según la concentración recomendada por el proveedor 0,7% (Anexo 9). Concentración que ha sido aprobada dentro del Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (CCSC), con dictamen emitido en el 2011 tras el examen de seguridad de los parabenos en productos cosméticos. Resolución que ha sido acogida por COLIPA.
- **ROSMARINUS OFFICINALIS OIL** Denominación INCI, caracterizado en el Diario Oficial de la Unión Europea como Aceite volátil de romero, *Rosmarinus officinalis*, utilizado como tónico refrescante. Se emplea en tres concentraciones, considerando los resultados obtenidos en la evaluación de la concentración mínima inhibitoria, se observa actividad para los cinco microorganismos desde el 1,25% hasta 5%. Considerando que esta actividad podría verse incrementada con la mezcla de surfactantes, se prueba con tres concentraciones de AE de Romero *Rosmarinus officinalis* una bajo 1,25 se prueba una concentración del 1% y dos sobre 1,25 concentraciones de 1,5 % y 2,5%, pudo haberse probado concentraciones mayores del 2,5% pero un porcentaje alto de AE, afectará directamente la factibilidad económica de la fórmula. Se considera que las tres concentraciones escogidas podrían a más de generar actividad conservante otorgar beneficios adicionales a la formulación, conservando características físicas importantes del producto como viscosidad y apariencia, con menor incidencia en la factibilidad económica de la misma.

3.2.6.2 Método de elaboración

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se pesó los ingredientes para la elaboración del champú en la Balanza semianalítica marca O-Haus Adventurer Pro modelo AV2101, conforme a la fórmula unitaria calculada para una presentación de 550 ml.
- 2.- Se calentó el 70% del total del volumen de agua de la formulación en un vaso de precipitación pyrex de 1 litro, en la Plancha calefactora marca Thermo modelo SP 131015, cuando la mezcla alcanzó una temperatura de 70°C, se incorporó el tensioactivo primario, Sodium Laureth Sulfate, se realizó una agitación con el Turboemulsor marca Silverson modelo L5, a 3500 rpm durante quince a veinte minutos, hasta que se evidenció disolución completa.
- 3.- En el 30% del total de agua restante, se disolvieron los dos tensioactivos secundarios, Cocamidopropylbetaine con la mezcla de PEG-150 pentaeritritil tetraestearato PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos. Una vez disueltos se incorporaron a la solución anterior.
- 4.- Se realizaron las pruebas de control de calidad en proceso de las características físicas de la formulación, viscosidad y pH.
- 5.- Se incorporaron los conservantes, en la fórmula N° 1 la mezcla de parabenos Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, en la fórmula N° 2 el 1% de AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, en la fórmula N° 3 el 1,5% de AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, en la fórmula N° 4 el 2,5 % de AE de Romero *Rosmarinus officinalis* y en la fórmula N° 5 no se incorporó ningún conservante.
- 6.- Se mezcló por 30 minutos en el Turboemulsor marca Silverson modelo L5, a una velocidad de 3500 rpm.
- 7.- Se deja en reposo por 24 horas y se realizó las pruebas de control de calidad del producto terminado.

3.2.6.3 Control de Calidad del Champú.

A. DETERMINACION DEL pH

- Se lavó el electrodo del Potenciómetro marca Mettler Todelo modelo Seven Multi con agua destilada y se realizó la calibración con soluciones estándar de pH 4 y pH 7.
- En un vaso de precipitación de 100 ml se colocó el producto cosmético, se introdujo el electrodo, cuidando que el electrodo no toque las paredes ni el fondo.

- Se efectuó la lectura de pH en forma inmediata.
- La determinación se realizó por duplicado sobre la muestra convenientemente homogenizada.
- La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,1 unidades de pH; en caso contrario, debe repetirse la determinación.
- Como resultado final, se reportó la media aritmética de los resultados de la determinación.

B. DETERMINACION DE LA VISCOSIDAD

La determinación se realizó utilizando el Viscosímetro marca Brookfield modelo LVDVE

- Se determinó el número de rotor (aguja) a utilizarse en función de la naturaleza de la muestra a ensayarse.
- Se colocó la muestra de champú en un vaso de precipitación de 250 ml, y se introdujo la aguja del viscosímetro en el vaso.
- Se controló la velocidad de la aguja, en relación al porcentaje del torque, tratando de llegar al 100%, que corresponde al valor de la lectura de viscosidad de la muestra.

3.2.7 Ensayo de la eficacia de la conservación antimicrobiana (Challenge Test)

La eficacia de un conservante antimicrobiano se puede ver incrementada o reducida por el principio activo de la preparación o por otros componentes de la formulación, así como por el envase y el cierre empleado, el ensayo fue planteado primeramente por la Farmacopea española, para comprobar la eficacia de la conservación antimicrobiana en medicamentos, se aplicó por mucho tiempo también para cosméticos, con el objetivo de demostrar la eficacia del sistema conservante, demostrando suficiencia para prevenir los efectos adversos de la contaminación o proliferación microbiana que pudiera tener lugar durante el almacenamiento y uso de la preparación. El método ha sido modificado para que sea aplicado en cosméticos mediante la ISO 11930:2012 Evaluación de la conservación antimicrobiana en productos cosméticos, parte de la Regulación Europea 1223/2009 (International Organization for Standardization, 2012).

El ensayo consiste en contaminar la preparación, siempre que sea posible en su envase final, con un inóculo preestablecido de microorganismos, cada microorganismo se siembra por separado, mantenerla a una temperatura determinada y tomar muestras a intervalos de tiempo especificados, con el objeto de realizar recuentos de microorganismos presentes en las muestras tomadas, en los tiempos establecidos.

3.2.7.1 Objetivos de la Prueba

- Comprobar la estabilidad microbiológica del producto cosmético.
- Determinar la eficiencia del conservante dentro de la formulación cosmética, contra el ataque microbiano provocado en la prueba, verificado con la disminución de microorganismos viables de las cepas de prueba, dentro de un período determinado de prueba.

3.2.7.2 Pasos de la Prueba

El procedimiento se puede resumir en los siguientes pasos:

- A. Preparación de microorganismos para el inóculo.
- B. Preparación del inóculo bacteriano
- C. Inoculación de las muestras.
- D. Comprobación de la supervivencia de microorganismos a intervalos predeterminados.
- E. Evaluación de los resultados.

A Y B: PREPARACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA EL INÓCULO Y LA PREPARACIÓN DE INÓCULO:

Se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en la sección 3.2.5.3, Literal A: Activación de Cepas Bacterianas y Literal B: Preparación del Inóculo Bacteriano, en este último con un paso adicional que es una dilución del inóculo, establecido para bacterias de 10^6 ufc/g y para hongos 10^5 ufc/g.

Se utiliza como diluyente, suero fisiológico estéril.

Los medios de cultivo recomendados para la prueba:

- Tryptic Soy Broth (TSB) para activación de cepas ATCC
- Tryptic Soy Agar (TSA) para el crecimiento de bacterias.
- Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) para *Candida albicans*.

- Potato Dextrosa Agar (PDA) para *Aspergillus brasiliensis*.

C. INOCULACIÓN DE LA MUESTRA:

Se dispensaron cinco frascos boeco previamente esterilizados con 70 ml de la formulación de champú en estudio.

En cada frasco se dispuso 0,7 ml de inóculo bacteriano (establecido por la norma ISO 11930:2012 no más del 1% del volumen total de la formulación)

- 10^6 ufc *Escherichia coli* ATCC 8739
- 10^6 ufc *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- 10^6 ufc *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9015
- 10^5 ufc *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y
- 10^5 ufc *Candida albicans* ATCC 10231.

Se homogenizó cada frasco por espacio de 15 minutos en el Agitador Shaker marca Thermo Scientific modelo M65825.

De estos frascos inoculados se realizó la comprobación de la supervivencia de microorganismos a intervalos predeterminados (literal D)

Los frascos inoculados se mantuvieron entre 20°C y 25°C, protegido de la luz, durante los 28 días que dura la prueba.

D. COMPROBACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE MICROORGANISMOS A INTERVALOS PREDETERMINADOS.

Se determina el número de microorganismos viables de la muestra por Recuento en Placa empleando el agar especificado en el literal A-B de esta sección. Los intervalos de comprobación de supervivencia, se realizan inmediatamente después de la inoculación en los siguientes tiempos:

- Inmediatamente después de la inoculación definido como Tiempo cero = T_0
- Después de 48 horas = T_2
- A los 7 días = T_7
- A los 14 días = T_{14}
- A los 28 días = T_{28}

Se tomó 1 ml de cada envase inoculado y se dispensó uniformemente en las placas mediante la técnica de escobillado, con un asa de Digralski se efectuó un barrido en por lo menos tres direcciones, girando la placa a 90° grados.

F. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La evaluación de los resultados se realiza en función de los criterios de evaluación de la Método ISO 11930:2012 que se fundamenta en la reducción logarítmica del número de microorganismos viables, en relación con los valores correspondientes al inóculo sembrado.

Los criterios son los siguientes: (International Organization for Standardization, 2012)

CRITERIO A: Se asigna si los resultados obtenidos satisfacen al mismo tiempo todas las condiciones que se presentan a continuación:

Después de 7 DIAS: Reducción de al menos 3 logaritmos de las bacterias y por lo menos 1 logaritmo de la *Candida albicans*.

Después de 14 DÍAS: Reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias (sin ningún aumento con respecto a la vez anterior), al menos 1 logaritmo para *Candida albicans* (sin ningún aumento con respecto a la vez anterior) y ningún aumento con respecto al tiempo cero para *Aspergillus brasiliensis*.

Después de 28 DÍAS: Reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias (sin ningún aumento con respecto a la vez anterior), al menos 1 logaritmo para *Candida albicans* (sin ningún aumento con respecto a la vez anterior) y al menos 1 logaritmo para *Aspergillus brasiliensis*.

CRITERIO B: se asigna si los resultados obtenidos satisfacen al mismo tiempo todas las condiciones que se presentan a continuación:

Después de 14 DIAS: Reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias, por lo menos 1 logaritmo para *Candida albicans* y ningún aumento con respecto al tiempo cero para *Aspergillus brasiliensis*.

Después de 28 DIAS: la reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias (sin ningún tipo de incremento con respecto al anterior), de al menos 1 logaritmo de *Candida albicans* (un aumento con respecto al tiempo anterior) y ningún aumento de *Aspergillus brasiliensis*

La interpretación de cada criterio evaluado al final de la prueba de desafío CHALLENGE TEST, determina el riesgo microbiológico de la muestra, relacionado directamente con la eficiencia conservante del ingrediente.

1. Una muestra evaluada bajo el CRITERIO A, es calificada como una muestra con un riesgo microbiológico aceptable, el producto cosmético se considera protegido contra la proliferación microbiana y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.
2. Una muestra evaluada bajo el CRITERIO B, es calificada como una muestra con riesgo microbiológico aceptable, considerándole protegido contra la proliferación microbiana, sólo si el análisis de riesgos demuestra la existencia de factores de control no relacionadas con la formulación, tales como las características de los envases, para reducir el riesgo microbiológico.
3. Dentro de los rangos de ACEPTABLE se relaciona el grado de riesgo microbiológico en función del tiempo de reducción del inóculo de la siguiente manera.
 - Reducción del inóculo dentro de los 2 días: ACEPTABLE producto de bajo riesgo
 - Reducción del inóculo dentro de 7 días: ACEPTABLE producto de riesgo moderado.
 - Reducción del inóculo en los 14 días, ACEPTABLE CON RESERVA producto de alto riesgo.
 - Reducción en 28 días: NO ACEPTABLE el sistema preservante es inadecuado.

**TABLA N° 9: CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA EFICACIA PRESERVANTE
METODO ISO 11930:2012**

CRITERIO	MICROORGANISMO	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA		
		7días	14días	28 días
A	Bacterias	3	NI	NI
	<i>Candida albicans</i>	1	NI	NI
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-	-	1
B	Bacterias	-	3	NI
	<i>Candida albicans</i>	-	1	NI
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-	-	-

Elaborado por: la autora

NI: No se produce incremento.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)

4.1.1 Rendimiento del Aceite Esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) mediante el método de hidrodestilación.

Mediante la aplicación de la Ecuación 1, de la sección 3.2.2, se realiza el cálculo del rendimiento del proceso extracción, el resultado es el siguiente:

$$R = (WAE / WMV) \times 100$$

Donde:

WAE = Masa del AE obtenido en gramos (g) = 139,59 g

WMV = Masa del material vegetal seco empleado en gramos (g) = 25000 g

R= Porcentaje de rendimiento (%)

R= 0,56%

El valor de rendimiento obtenido del método está dentro de los referenciados en otros estudios, que reportan que el rendimiento del aceite de Romero *Rosmarinus officinalis*, extraído por hidrodestilación varía entre 0,14 y 0,71%. (Celiktas, Kodabas, Bedir, Sukan, Ozek, & Baser, 2007). Lógicamente los valores tendrán relación directa con el origen del material vegetal o la parte empleada para el proceso.

4.2 CONTROL DE CALIDAD DEL AE DE ROMERO *Rosmarinus officinalis*

Los resultados de las pruebas de control de calidad realizadas al AE de Romero *Rosmarinus officinalis* se resumen en la siguiente tabla:

TABLA N° 10: CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL AE ROMERO *Rosmarinus officinalis*

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS		
PARÁMETRO	RESULTADO	ESPECIFICACIÓN (Farmacopea Española)
Color	cumple	Amarillo
Olor	cumple	Alcanforado
Sabor	cumple	Amargo
PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS		
Densidad relativa (25°C)	0,8975 g/ml	0,895 a 0,920 g/ml
Índice de refracción (20°C)	1,471	1,464 a 1,473

Elaborado por: la autora

Las características organolépticas y fisicoquímicas se relacionan tanto con investigaciones realizadas, como a las que se especifican en la Farmacopea Española, (Ministerio de Sanidad y Consumo España, 2002). El valor de 0,8975 g/ml para densidad y de 1,471 para el índice de refracción, permiten concluir que el AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, utilizado en la presente investigación se encuentra dentro de las especificaciones establecidas por regulaciones oficiales.

4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO

Los compuestos fueron identificados por comparación con la base de datos NIST/02, y verificación en la mayoría de los compuestos de su índice de retención teórico. (Adams, 2009)

**TABLA N° 11: RESULTADOS DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO (GCMS) AE
ROMERO *Rosmarinus officinalis***

N°	Tiempo de retención (min)	Nombre del Compuesto	Porcentaje
1	11,46	Alfa pineno	5,97
2	12,59	Campheno	7,01
3	14,73	Beta pineno	3,94
4	15,98	Mirceno	24,80
5	19,70	1-8 cineol	11,54
6	32,27	Alcanfor	31,23
7	61,18	(E) caryofileno	9,96
8	62,93	(Z) caryofileno	2,21
9	63,88	Tao muuroleno	1,10
10	65,52	cadineno	2,24

Elaborado por: la autora

Los resultados corroboran el estudio realizado por Zaoauli en 2005, se puede identificar coincidencias con los componentes que se encuentran en aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* de diferentes zonas del mundo, pero con porcentajes bastante diferentes, especialmente en lo que la mayoría de estudios considera como componente principal del aceite, el 1-8 cineol, en el material de estudio el porcentaje es de 11,54%, con un contenido de alcanfor bastante significativo 31,23%, estos datos también se encuentran bastante relacionados con la investigación expuesta, en la se menciona que “una diferencia que evidencio el estudio es que poblaciones de clima árido se caracteriza por una alta proporción de α -pineno, alcanfor y un contenido relativamente bajo de 1,8-cineol” (Zaouali, Messaoud, Ben Salah, & Boussaïd, 2005). Lo que llevaría a concluir que las condiciones climáticas del material vegetal analizado en zonas áridas de Túnez, tienen relación con la composición química del aceite de Romero recolectado en la ciudad de Quito, parroquia de Calderón.

4.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO

Se reportan los valores promedio de las cuatro determinaciones realizadas, se utilizan como blanco discos de Gentamicina 10ug, para bacterias, e Isoconazol 25mg/ml para hongos

TABLA N° 12: DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN AE ROMERO *Rosmarinus officinalis*

Concentración (%) AE Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Diámetros de Halos de Inhibición (mm)				
	Bacterias Gram Negativas		Bacteria Gram Positiva	Levadura y Hongo	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
5	8,2	7,5	9,3	10,3	7,4
2,5	7,5	7,0	8,2	8,9	7,0
1,25	7,1	6,5	8,2	8,7	7,2
0,63	6,8	6,0	7,9	8,7	6,8
0,32	6,5	6,0	6,2	8,4	6,8
0,16	6,4	6,0	6,0	8,1	6,0
0,08	6,0	6,0	6,0	8,1	6,0
0,04	6,0	6,0	6,0	7,7	6,0
0,02	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
0,01	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Gentamicina 10ug	21,1	25,8	23,0	----	----
Isoconazol 25mg/ml	----	----	----	26,2	25,0

Elaborado por: la autora

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* es difícil relacionar con los resultados obtenidos en investigación anteriores, debido a que se ha

trabajado con microorganismos diferentes o se ha aplicado técnicas diferentes, se pudo haber utilizado el mismo material vegetal Romero *Rosmarinus officinalis*, pero en algunas investigaciones el extracto del material vegetal y en otras el aceite esencial. Sin embargo existe coincidencia con la investigación realizada por Hammer que encuentra una inhibición relativamente baja frente a *Pseudomona aeruginosa*. (Hammer, Carson, & Riley, 1999).

Los resultados no permiten identificar una acción antibacteriana marcadamente diferente de acuerdo a la categoría de bacterias Gram-negativas, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con las bacteria la Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, los resultados presentan halos de inhibición similares.

Los resultados permiten concluir que el AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, resulta muy efectivo para *Candida albicans* ATCC 1023, presentando inhibición desde concentraciones de 0,04%, para la mayoría de los microorganismos de prueba excepto *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9025, presenta inhibición desde la concentración de 0,32% de AE, la inhibición para todos los microorganismos de prueba se da a partir de la concentración de 1,25%.

En función de lo mencionado, la concentración de 1,25% será considerada como base para la formulación, probándose una concentración bajo el 1,25% y dos sobre el 1,25%. Se establecen como concentraciones de prueba para la formulación 1, 1,5 y 2,5% rango que se considera adecuado para incorporar AE en una forma cosmética, manteniendo las características organolépticas del producto.

4.5 FORMULAS COSMÉTICAS.- CHAMPÚS

4.5.1 Fórmulas Unitarias

Se preparan cinco fórmulas unitarias de 550ml, utilizando tres tensioactivos: un tensioactivo principal de característica aniónica con propiedad detergente, y dos tensioactivos secundarios uno con característica anfotérica y otro con característica no iónica, tensioactivos secundarios que confieren propiedades acondicionadoras y estéticas al cabello como peinabilidad y humectación, estos inciden a la vez en la presentación del producto, mejorando características de viscosidad y espuma.

La variación de las fórmulas cosméticas está dada por el tipo o la concentración del agente antimicrobiano utilizado, al que se le atribuye un papel conservante.

Se utilizan dos tipos de agentes antimicrobianos: un conservante comercial Phenova que químicamente contiene un 28% de una mezcla de Fenoxietanol, Metilparabeno, Etilparaben, Propilparabeno, Butilparabeno e Isobutilparabeno; conservante comercial utilizado en la formulación, considerando la concentración establecida por ficha técnica del proveedor 0,7% (Anexo 9), que se encuentra además dentro de lo regulado por COLIPA (Cosmetics Europe – The Personal care Association). El otro agente antimicrobiano corresponde al AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, los porcentajes utilizados se fundamentan en los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria una concentración de 1,25% inhibe el crecimiento de todos los microorganismos en estudio, se seleccionan una concentración bajo de 1,25% que podría ser interesante en un análisis económico futuro, y dos concentraciones mayores a 1,25% considerándose como máximo un 2,5% por razones de posible toxicidad cutánea.

En función de lo antes mencionado se establece cinco formulaciones de prueba:

Fórmula N°1: mezcla de parabenos al 0.7%

Fórmula N° 2: AE de Romero *Rosmarinus officinalis* al 1%

Fórmula N° 3: AE de Romero *Rosmarinus officinalis* al 1,5%.

Fórmula N° 4: AE de Romero *Rosmarinus officinalis* al 2,5% y

Fórmula N° 5: sin agente antibacteriano.

Cada fórmula unitaria detalla: nombre del ingrediente basado por la nomenclatura INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients), porcentaje de uso establecido por fichas técnicas de proveedor, regulaciones internacionales, o resultados experimentales; cantidad en gramos del ingrediente para una presentación unitaria de 550 mililitros, y la función que tiene cada componente en la formulación.

TABLA N° 13: FÓRMULA UNITARIA 1 (MEZCLA DE PARABENOS)

INGREDIENTE (INCI)	PORCENTAJE (%)	CANTIDAD (g)	FUNCIÓN
Sodium Laureth Sulfate	16,36	90	Tensioactivo Principal
Cocamidopropylbetaine	10,91	60	Tensioactivo Secundario / acrecentador de espuma
PEG-150 pentaeritritil tetraestearato PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos	2,18	12	Tensioactivo Secundario / viscosante
Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben	0,70	3,85	Conservante
Agua	c.s.p	550	Vehículo

Elaborado por: la autora

TABLA N° 14: FÓRMULA UNITARIA 2 (AE 1%)

INGREDIENTE (INCI)	PORCENTAJE (%)	CANTIDAD (g)	FUNCIÓN
Sodium Laureth Sulfate	16,36	90	Tensioactivo Principal
Cocamidopropylbetaine	10,91	60	Tensioactivo Secundario / acrecentador de espuma
PEG-150 pentaeritritil tetraestearato PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos	2,18	12	Tensioactivo Secundario / viscosante
<i>Rosmarinus officinalis</i> oil	1	5,5	Conservante
Agua	c.s.p	550	Vehículo

Elaborado por: la autora

TABLA N° 15: FÓRMULA UNITARIA 3 (AE 1,5%)

INGREDIENTE (INCI)	PORCENTAJE (%)	CANTIDAD (g)	FUNCIÓN
Sodium Laureth Sulfate	16,36	90	Tensioactivo Principal
Cocamidopropylbetaine	10,91	60	Tensioactivo Secundario / acrecentador de espuma
PEG-150 pentaeritritil tetraestearato PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos	2,18	12	Tensioactivo Secundario / viscosante
<i>Rosmarinus officinalis</i> oil	1,5	8,25	Conservante
Agua	c.s.p	550	Vehículo

Elaborado por: la autora

TABLA N° 16 : FÓRMULA UNITARIA 4 (AE 2,5%)

INGREDIENTE (INCI)	PORCENTAJE (%)	CANTIDAD (g)	FUNCIÓN
Sodium Laureth Sulfate	16,36	90	Tensioactivo Principal
Cocamidopropylbetaine	10,91	60	Tensioactivo Secundario / acrecentador de espuma
PEG-150 pentaeritritil tetraestearato PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos	2,18	12	Tensioactivo Secundario / viscosante
<i>Rosmarinus officinalis</i> oil	2,5	13,75	Conservante
Agua	c.s.p	550	Vehículo

Elaborado por: la autora

TABLA N° 17 : FÓRMULA UNITARIA 5 (SIN CONSERVANTE)

INGREDIENTE (INCI)	PORCENTAJE (%)	CANTIDAD (g)	FUNCIÓN
Sodium Laureth Sulfate	16,36	90	Tensioactivo Principal
Cocamidopropylbetaine	10,91	60	Tensioactivo Secundario / acrecentador de espuma
PEG-150 pentaeritritil tetraestearato PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos	2,18	12	Tensioactivo Secundario / viscosante
Agua	c.s.p	550	Vehículo

Elaborado por: la autora

Está fórmula corresponde el blanco del estudio se incorporan los ingredientes básicos sin ningún componente adicional que pueda generar una función conservante.

4. 5.2 Control de Calidad de las fórmulas unitarias (Champús)

4.5.2.1 Control de Calidad en Proceso

En la siguiente tabla se resumen los valores promedio de tres determinaciones de viscosidad, antes de la incorporación del conservante o del AE de Romero *Rosmarinus officinalis*

TABLA N° 18: VISCOSIDAD DE LAS FÓRMULAS ANTES DE LA INCORPORACIÓN DEL CONSERVANTE Y DEL AE DE ROMERO *Rosmarinus officinalis*

FÓRMULA UNITARIA N°	VISCOSIDAD (cP)
1	14990
2	11545
3	11730
4	18330
5	11280

Elaborador por: la autora

4.5.2.2 Control de Calidad del Producto Terminado

Se reporta los valores promedio de tres determinaciones realizadas con cada muestra tanto para el parámetro de viscosidad como de pH.

TABLA N° 19 : VALORES DE VISCOSIDAD Y pH DE LAS FÓRMULAS UNITARIAS

FÓRMULA UNITARIA N°	Viscosidad (cP)	pH
1	15620	6,51
2	16760	6,76
3	15260	6,49
4	14610	6,40
5	11970	6,05
VALORES REFERENCIALES	2500 A 18000	6,3 A 6,7

Elaborado por: la autora

Se realiza la determinación de viscosidad en las fórmulas en proceso antes de la incorporación de los ingredientes con acción conservante (tabla N°18) y en producto terminado es decir cuando se incorpora todos los ingredientes (tabla N°19), los valores de viscosidad presentan variaciones dentro de un +/- 32%. Todas las fórmulas dentro de los valores considerados referenciales.

La Normativa vigente en el país, Reglamento Técnico Ecuatoriano INEN 093 “Productos Cosméticos” establece dos requisitos para un producto cosmético: seguridad y calidad microbiológica. En el ámbito de Seguridad “Los productos cosméticos que se comercialicen serán seguros para la salud humana cuando se utilicen en las condiciones normales o razonablemente previsibles de uso, teniendo en cuenta, en particular lo siguiente:

- a) La presentación del producto
- b) El etiquetado
- c) Las instrucciones de uso y eliminación

Cualquier otra indicación o información proporcionada por la persona responsable de la introducción del producto en el mercado ecuatoriano.

En el ámbito de Calidad Microbiológica un recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales máximo de 5×10^3 ufc/g ó ml, y ausencia de patógenos (Registro Oficial Ecuador, 2013)

Los requisitos mencionados no son específicos para las diferentes formas cosméticas, por lo tanto no delimitan características específicas como pH o viscosidad; razón por la cual se toma como valores referenciales los definidos tanto por la ciencia cosmética y los productores de champús, en cuanto a pH el requerimiento para todo producto cosmético es que debe considerar la eudermia de la piel entre 4 y 7. El cuero cabelludo sano posee un pH más bien ácido, alrededor de 4, pero el pH del ojo es neutro alrededor de 7,5. Razón por la cual los fabricantes de champús suelen considerar pH neutros entre 6,3 y 6,7 que garanticen mínimo efecto irritante en caso de un eventual accidente en el que el producto entre en contacto con los ojos. (del Pozo & Viscasillas, 2006)

En cuanto a la viscosidad no debe ser insuficiente, esto es, no menos de 2.500 cPs para que el líquido no se escurra entre los dedos, pero tampoco debe ser excesiva más de 18.000 cPs para que su dosificación sea sencilla y no sea difícil extraerlo envase. (CONSUMER, 2004).

Desde este punto de vista, las cinco fórmulas tienen las características deseadas tanto en pH como viscosidad.

4.6 EFICACIA DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA EN LAS FORMULACIONES COSMÉTICAS (CHALLENGE TEST).

Todas las fórmulas tuvieron el siguiente período de análisis.

Fecha de Inicio de la Prueba: 23 de Septiembre del 2013

Fecha Final de la Prueba: 21 de Octubre del 2013.

La comprobación de crecimiento microbiano en los productos inoculados se realizó con el siguiente cronograma.

TABLA N° 20 : CRONOGRAMA DE TRABAJO PARA LA COMPROBACIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Tiempo 0 horas	23 de Septiembre del 2013
Tiempo 48 horas	25 de Septiembre del 2013
7 días	30 de Septiembre del 2013
14 días	7 de Octubre del 2013
28 días	21 de Octubre del 2013

Elaborado por: la autora

FÓRMULA UNITARIA 1: Fórmula de Champú que utiliza como ingrediente con función conservante una mezcla de parabenos: Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben.

La siguiente tabla resumen los promedios de los contajes realizados en placa, de la carga microbiana en el producto inoculado.

TABLA N° 21 : CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 1 (MEZCLA DE PARABENOS)

Microorganismo Probado	T₀ ufc/ml	T₂ ufc/ml	T₇ ufc/ml	T₁₄ ufc/ml	T₂₈ ufc/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,0 x10 ⁶	1,2x10 ³ (VE)	<10	<10	<10
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	2,0x10 ⁶	Incontable	<10	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,0x10 ⁶	50	<10	<10	<10
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,0x10 ⁵	1,0x10 ³ (VE)	<10	<10	<10
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1,0x10 ⁵	4	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora

T₀: Crecimiento bacteriano, en función de la densidad óptica (inóculo bacteriano)

VE: Valor estimado

La reducción logarítmica del crecimiento microbiano de los gérmenes inoculados, en cada intervalo de tiempo establecido como control, se presenta en la siguiente tabla

**TABLA N° 22: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO
FÓRMULA UNITARIA 1 (MEZCLA DE PARABENOS)**

Microorganismo Probado	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO			
	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₈
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≥ 3 Log	≥ 0,2 Log	NI	NI
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	≥ 6 Log	≥ 3 Log	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≥ 4 Log	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2Log	≥ 0,4 Log	NI	NI
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	≥ 4 Log	NI	NI	NI

NI: No se produce incremento

La representación gráfica de la variación logarítmica de la carga microbiana se identifica con el siguiente gráfico

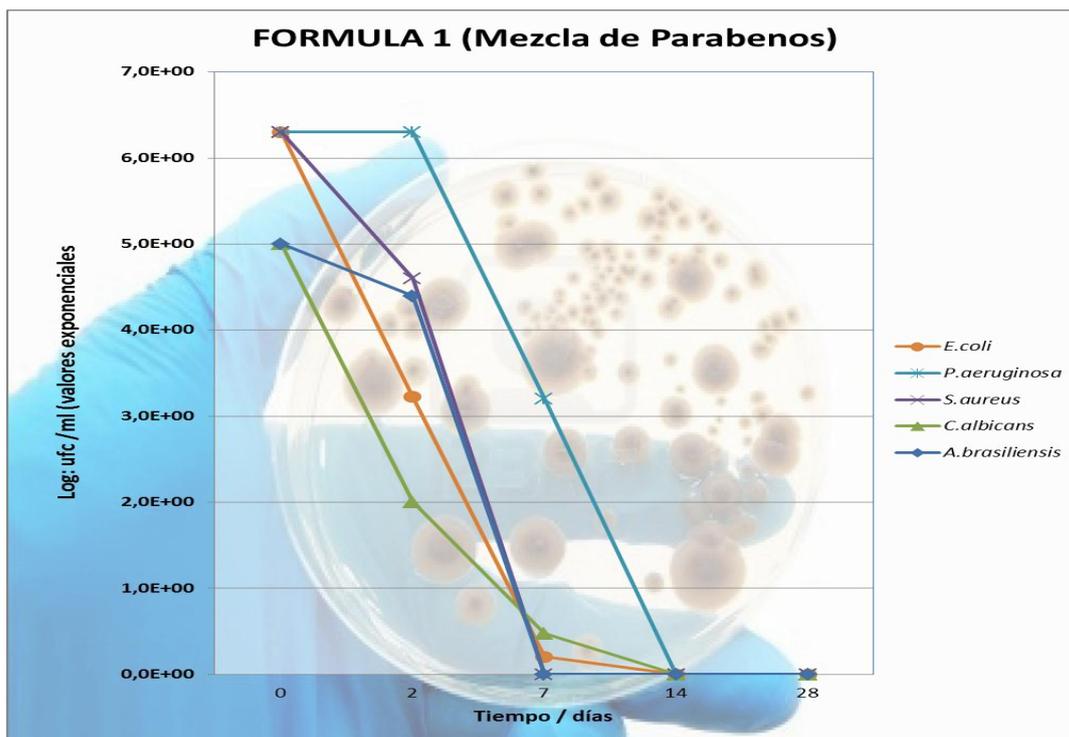


GRÁFICO N° 1 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DE LA CARGA MICROBIANA EN LA FÓRMULA 1

Elaborado por: la autora

De acuerdo con los resultados obtenidos la FÓRMULA 1 cumple con el criterio A: el riesgo microbiológico es aceptable, el comportamiento del sistema preservante es el siguiente:

- Bacterias Gram + (*Staphylococcus aureus*) Reducción del inóculo en un plazo de 7 días.
- Bacterias Gram – (*Escherichia coli* , *Pseudomona aeruginosa*)Reducción del inóculo en al menos en 3 logaritmos al plazo de 7 días, reducción sin producirse incremento al plazo de los 14 días.
- Hongos: *Candida albicans*, reducción del inóculo en por lo menos 1 logaritmo a los 7 días, *Aspergillus brasiliensis* reducción del inóculo a los 7 días.

De acuerdo con los criterios de evaluación recomendados por la ISO 11930:2012, el sistema conservante de la fórmula cosmética, protege al producto contra la proliferación microbiana y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

FORMULA UNITARIA 2: Fórmula de Champú que utiliza como ingrediente con función conservante, *Rosmarinus officinalis* oil al 1%

TABLA N° 23: CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 2 (AE 1%)

Microorganismo Probado	T₀ ufc/ml	T₂ ufc/ml	T₇ ufc/ml	T₁₄ ufc/ml	T₂₈ ufc/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,0 x10 ⁶	1,4x10 ³	72	<10	<10
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	2,0x10 ⁶	Incontable	1,9x10 ³	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,0x10 ⁶	50	<10	<10	<10
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,0x10 ⁵	348	<10	<10	<10
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1,0x10 ⁵	0	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora

T₀: Crecimiento bacteriano, en función de la densidad óptica (inóculo bacteriano)

La reducción logarítmica del crecimiento microbiano de los gérmenes inoculados, en cada intervalo de tiempo establecido como control, se presenta en la siguiente tabla

**TABLA N° 24: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO
FÓRMULA UNITARIA 2 (AE 1%)**

Microorganismo Probado	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO			
	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₈
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≥ 3 Log	≥ 1 Log	NI	NI
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	≥ 6 Log	≥ 3 Log	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	NI	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≥ 2Log	NI	NI	NI
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	NI	NI	NI	NI

Elaborado por: la autora

NI: No se produce incremento

La representación gráfica de la variación logarítmica de la carga microbiana se identifica con el siguiente gráfico

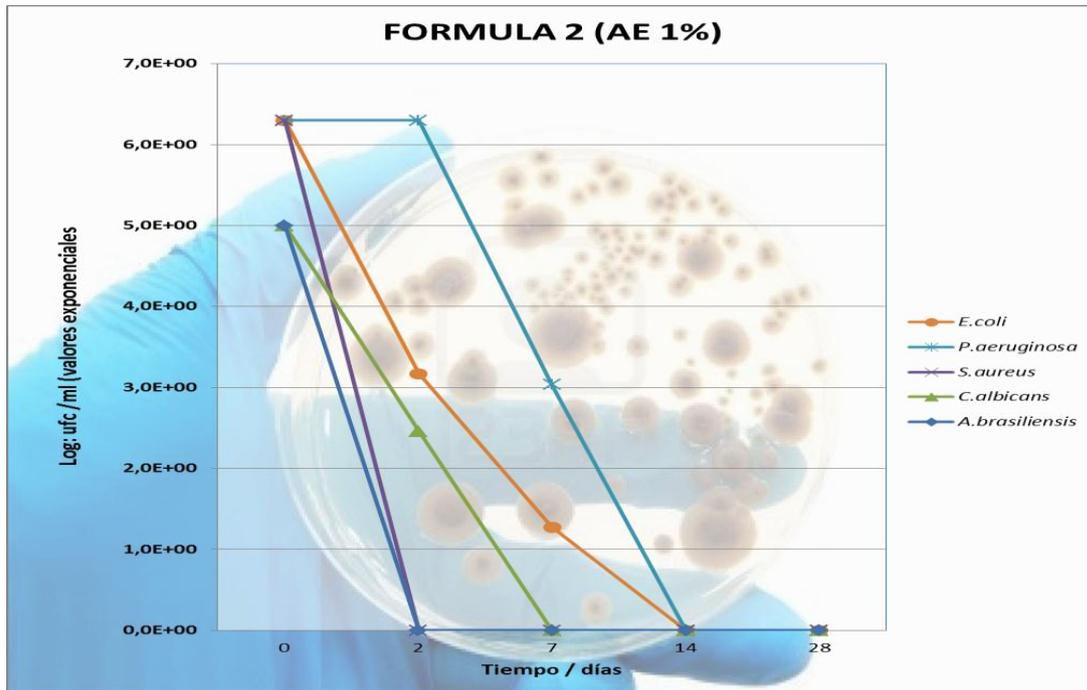


GRÁFICO N° 2 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DE LA CARGA MICROBIANA EN LA FÓRMULA 2

Elaborado por: la autora

De acuerdo con los resultados obtenidos la FÓRMULA 2 cumple con el criterio A: el riesgo microbiológico es aceptable, el comportamiento del sistema preservante es el siguiente:

- Bacterias Gram + (*Staphylococcus aureus*) Reducción del inóculo en un plazo de 2 días.
- Bacterias Gram – (*Escherichia coli* , *Pseudomona aeruginosa*)Reducción del inóculo en al menos en 3 logaritmos al plazo de 7 días, reducción sin producirse incremento al plazo de los 14 días.
- Hongos : *Candida albicans*, reducción del inóculo a los 7 días, *Aspergillus brasiliensis* reducción del inóculo a los 2 días

De acuerdo con los criterios de evaluación recomendados por la ISO 11930:2012, el sistema conservante de la formula cosmética, protege al producto contra la proliferación

microbiana y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

FORMULA UNITARIA 3: Fórmula de Champú que utiliza como ingrediente con función conservante, *Rosmarinus officinalis* oil al 1,5%

TABLA N° 25: CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 3 (AE 1,5%)

Microorganismo Probado	T₀ ufc/ml	T₂ ufc/ml	T₇ ufc/ml	T₁₄ ufc/ml	T₂₈ ufc/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,0 x10 ⁶	460	70	<10	<10
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	2,0x10 ⁶	Incontable	<10	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,0x10 ⁶	5	<10	<10	<10
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,0x10 ⁵	524	<10	<10	<10
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1,0x10 ⁵	0	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora

T₀: Crecimiento bacteriano, en función de la densidad óptica (inóculo bacteriano)

**TABLA N° 26: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
FÓRMULA UNITARIA 3 (AE 1,5%)**

Microorganismo Probado	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO			
	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₈
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≥ 3 Log	≥ 0,8 Log	NI	NI
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	≥ 6 Log	NI	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≥ 5 Log	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≥ 2Log	NI	NI	NI
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	NI	NI	NI	NI

Elaborado por: la autora

NI: No se produce incremento

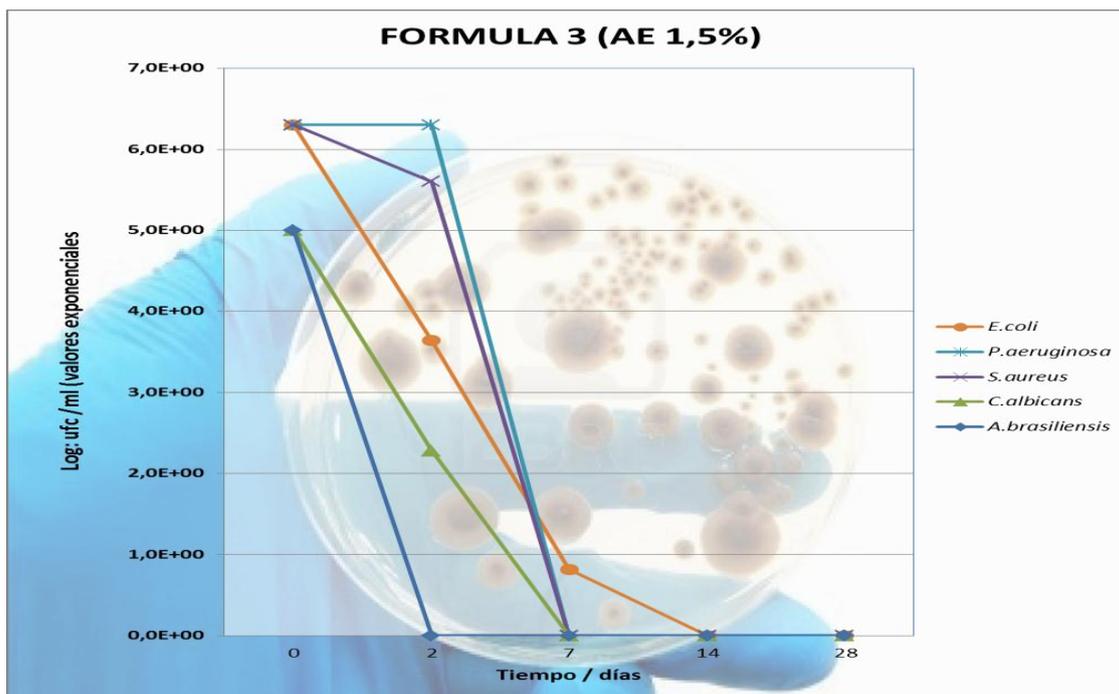


GRÁFICO N° 3 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA FÓRMULA 3

Elaborado por: la autora

De acuerdo con los resultados obtenidos la FÓRMULA 3 cumple con el criterio A: el riesgo microbiológico es aceptable, el comportamiento del sistema preservante es el siguiente:

- Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* Reducción del inóculo en un plazo de 7 días.
- Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* reducción del inóculo en al menos en 3 logaritmos al plazo de 7 días, *Pseudomona aeruginosa* reducción del inóculo a los 7 días.
- Hongos : *Candida albicans*, reducción del inóculo a los 7 días, *Aspergillus brasiliensis* reducción del inóculo a los 2 días.

De acuerdo con los criterios de evaluación recomendados por la ISO 11930:2012, el sistema conservante de la fórmula cosmética, protege al producto contra la proliferación microbiana y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

FORMULA UNITARIA 4: Formula de Champú que utiliza como ingrediente con función conservante, *Rosmarinus officinalis* oil al 2,5%

TABLA N° 27: CONTAJE MICROBIANO FÓRMULA UNITARIA 4 (AE 2,5%)

Microorganismo Probado	T₀ ufc/ml	T₂ ufc/ml	T₇ ufc/ml	T₁₄ ufc/ml	T₂₈ ufc/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,0 x10 ⁶	1,6x10 ³	<10	<10	<10
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	2,0x10 ⁶	384	<10	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,0x10 ⁶	11	<10	<10	<10
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,0x10 ⁵	69	<10	<10	<10
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1,0x10 ⁵	0	<10	<10	<10

Elaborado por: la autora

T₀: Crecimiento bacteriano, en función de la densidad óptica (inóculo bacteriano)

IC: Incontable

**TABLA N° 28: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
FÓRMULA 4 (AE 2,5%)**

Microorganismo Probado	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO			
	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₈
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≥ 3 Log	≥ 1 Log	NI	NI
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	≥ 3 Log	NI	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≥ 5 Log	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≥ 3Log	NI	NI	NI
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	NI	NI	NI	NI

Elaborado por: la autora

NI: No se produce incremento

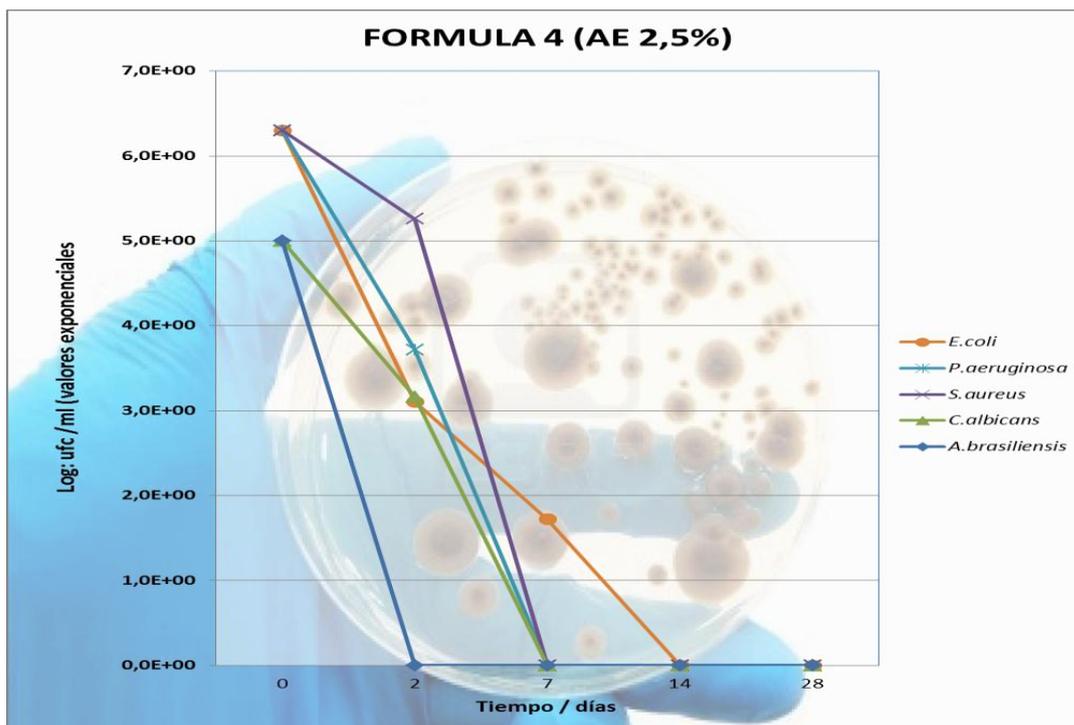


GRÁFICO N° 4: VARIACIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA FÓRMULA 4

Elaborado por: la autora

De acuerdo con los resultados obtenidos la FÓRMULA 4 cumple con el criterio A: el riesgo microbiológico es aceptable, el comportamiento del sistema preservante es el siguiente:

- Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* Reducción del inóculo en un plazo de 7 días.
- Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* reducción del inóculo en al menos en 1 logaritmo en un plazo de 7 días, *Pseudomona aeruginosa* reducción del inóculo a los 7 días.
- Hongos: *Candida albicans*, reducción del inóculo a los 7 días, *Aspergillus brasiliensis* reducción del inóculo a los 2 días.

De acuerdo con los criterios de evaluación recomendados por la ISO 11930:2012, el sistema conservante de la fórmula cosmético, protege al producto contra la proliferación microbiana y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

FORMULA UNITARIA 5: Fórmula de Champú sin ingrediente con función conservante.

TABLA N° 29: CONTAJE MICROBIANO FORMULA UNITARIA 5 (SIN CONSERVANTE)

Microorganismo Probado	T₀ ufc/ml	T₂ ufc/ml	T₇ ufc/ml	T₁₄ ufc/ml	T₂₈ ufc/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,0 x10 ⁶	Incontable	1,5 x10 ³	<10	<10
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	2,0x10 ⁶	Incontable	Incontable	1x10 ³	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,0x10 ⁶	<10	<10	<10	<10
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,0x10 ⁵	516	30	<10	<10
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1,0x10 ⁵	8	5	<10	<10

Elaborado por: la autora

T₀: Crecimiento bacteriano, en función de la densidad óptica (inóculo bacteriano)

Las siguientes tablas expresan la reducción logarítmica de los gérmenes inoculados, en cada intervalo de tiempo establecido como control.

**TABLA N° 30: REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
FORMULA 5 (SIN CONSERVANTE)**

Microorganismo Probado	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO			
	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₈
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≥ 6 Log	≥ 3 Log	NI	NI
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9025	≥ 6 Log	≥ 6 Log	≥ 3 Log	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	NI	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≥ 2Log	≥ 1Log	NI	NI
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	≥4Log	≥ 0,2Log	NI	NI

Elaborado por: la autora

NI: No se produce incremento

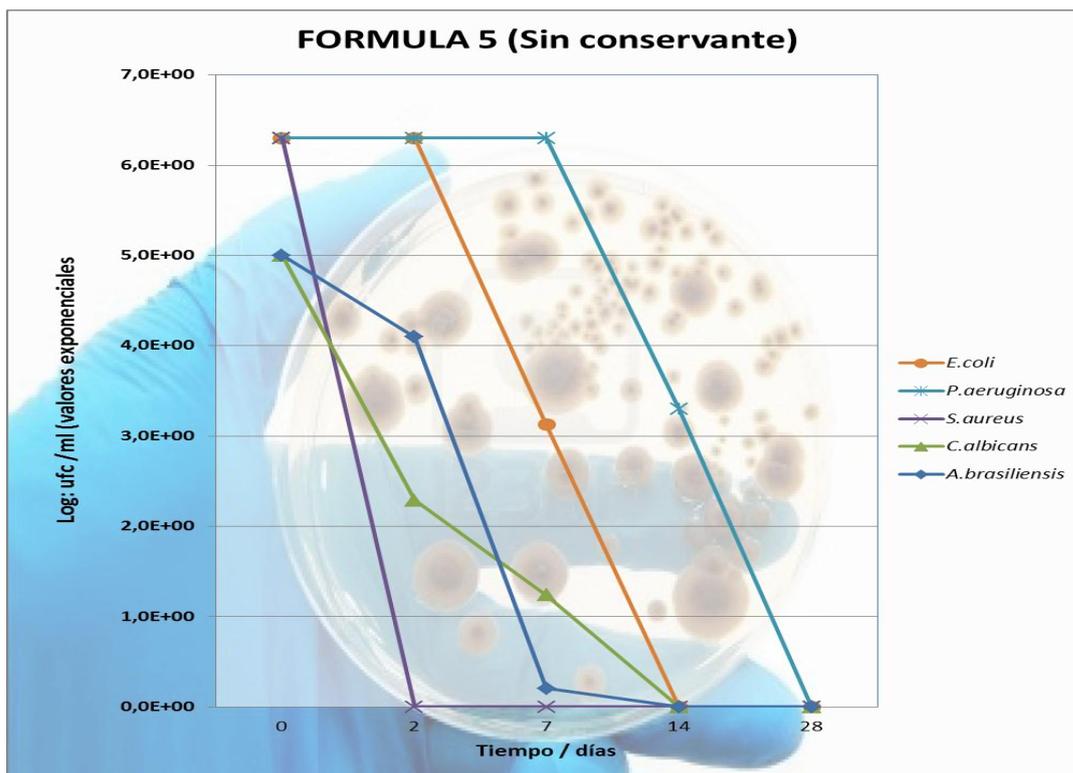


GRÁFICO N° 5 : VARIACIÓN LOGARÍTMICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA FÓRMULA 5

Elaborado por: la autora

De acuerdo con los resultados obtenidos la FÓRMULA 5 cumple con el criterio B: el riesgo microbiológico es aceptable CON RESERVA, catalogándole como producto de alto riesgo, el comportamiento del sistema preservante es el siguiente:

- Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* Reducción del inóculo en un plazo de 2 días.
- Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* reducción del inóculo en al menos en 3 logaritmos en un plazo de 7 días, *Pseudomona aeruginosa* reducción del inóculo en al menos 3 logaritmos a los 14 días. (Diferencia de Criterio A con Criterio B)
- Hongos: *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* reducción del inóculo al menos en un logaritmo a los 7 días.

De acuerdo con los criterios de evaluación recomendados por la ISO 11930:2012, el sistema conservante de la fórmula cosmética, protege al producto contra la proliferación microbiana SOLO si el análisis de riesgos demuestra la existencia de factores de control

que no se relacionan con la formulación, en caso que la FÓRMULA 5 se utilizaría en un producto cosmético será necesario definir características de envases que puedan reducir el riesgo microbiológico.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se confirma la hipótesis planteada en el estudio, el aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) incorporado en una formulación cosmética desde una concentración del 1% genera una eficacia conservante similar a la que presentan la mezcla de parabenos, conservante comercial incorporada al 0,7%. El aceite esencial puede ser considerado un sistema conservante aceptable que cataloga a la fórmula como producto de riesgo microbiológico bajo.
- Los resultados obtenidos en la caracterización química del aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis*, confirman las conclusiones de trabajos de investigación anteriores, que afirman que dependiendo del lugar geográfico donde crezcan las plantas, condiciones del suelo, clima y altura sobre el nivel del mar hay cambios en cantidad y tipos de moléculas bioactivas presentes, los resultados de esta investigación se relaciona a estudios realizados con material vegetal proveniente de climas áridos, caracterizados por altas concentraciones de alcanfor 31,23% y un porcentaje relativamente bajo de 1-8 cineol.
- La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* frente a los microorganismos : *Escherichia coli* ATCC 8739 , *Staphylococcus aureus* ATCC 653, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9015, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y *Candida albicans* ATCC 10231, se evidencia desde la concentración del 1,25% hasta el 5%.
- Las fórmulas cosméticas tienen valores de pH y viscosidad aceptables, a la inexistencia de regulaciones oficiales se han considerado especificaciones básicas de la ciencia cosmética, pH en rangos que garanticen la eudermia de la piel entre 4 y 7 y una viscosidad que permita la manejabilidad del producto entre 2.500 cPs y 18.000 cPs.
- Las cinco fórmulas elaboradas, cumplen la prueba del Challenge Test, pero con diferentes criterios, la Formula 2 con 1% de Aceite Esencial de Romero *Rosmarinus officinalis*, presenta una actividad parecida a la Fórmula 1 con una

mezcla de parabenos, logrando una disminución de crecimiento bacteriano de las tres bacterias del estudio *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9025, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 después de los siete días.

- La fórmula 3 con 1,5% de AE de Romero *Rosmarinus officinalis* y la Fórmula 4 con 2,5% de AE de Romero *Rosmarinus officinalis*, lograron la disminución del crecimiento bacteriano a los dos días con *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9025 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y de *Escherichia coli* ATCC 8739 después de los siete, lo que permite concluir que existe una tendencia de la efectividad del conservante, dependiente del microorganismo.
- La tendencia de la efectividad antimicrobiana en la fórmula a determinados microorganismos podría ser apreciable cuando se analizan los resultados en unidades formadoras de colonias (ufc), en el análisis con escala logarítmica no existe diferencia de las cuatro fórmulas, las cuatro consiguen disminuir el crecimiento en por lo menos 3 logaritmos, catalogándoles a las cuatro dentro del CRITERIO A el riesgo microbiológico es aceptable, el sistema conservante de las fórmulas cosméticas, protegen a los productos contra la proliferación microbiana y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.
- La Fórmula 5 sin conservantes también presenta actividad pero no alcanza a dar la seguridad deseada en un producto, la fórmula logra la disminución de la carga microbiana en el rango esperado (al menos 3 logaritmos) recién a los 14 días. Determinando que el producto sea evaluado con CRITERIO B, producto ACEPTABLE CON RESERVA producto de alto riesgo, el sistema conservante de la fórmula cosmética, protege al producto contra la proliferación microbiana SOLO si el análisis de riesgos demuestra la existencia de factores de control que no se relacionan con la formulación, es decir se acepta sólo si se controlan factores a parte de la fórmula como presentación del producto (monodosis) o características del envase.
- El AE de Romero *Rosmarinus officinalis* ha sido probado en una formulación elemental de champú, considerando una mezcla básica de tensioactivos (aniónico, anfótero y no iónico) evitando interferir directamente a la acción conservante en estudio, las concentraciones de los tensioactivos corresponden a las mínimas establecidas, se incluye además a la mezcla un tensioactivo no iónico que

corresponde el reto de cualquier sistema conservante, pues por un lado le aportan al champú suavidad aumentan la viscosidad del producto y le dan buena tolerancia cutánea, disminuyendo el efecto irritante que producen los otros detergentes, pero existen referencias que disminuyen las propiedades conservantes.

- Los resultados de este estudio, permiten sustentar el uso del aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* en formulaciones cosméticas, con una clara acción conservante, uso que además podría ser añadido a las propiedades que se le ha atribuido desde antes en cosméticos como tónicos capilares para el cuidado del cabello.
- La tendencia conservante del AE de Romero *Rosmarinus officinalis* incorporado desde una concentración del 1%, deja una base que permita en estudios posteriores diseñar formulaciones con un número mayor de ingredientes que podrían incluso potencializar el efecto conservante demostrado. Formulaciones que también deberán ser sometidas a pruebas de seguridad y estabilidad, todo esto será parte de un nuevo estudio de desarrollo de producto.

5.2 RECOMENDACIONES

- Dentro de la línea de investigación de productos naturales es necesario la estandarización de un método para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales. Es importante indicar que la mayoría de los métodos han sido basados en métodos preexistentes, tales como los métodos del CLSI, pero estos métodos han sido diseñados específicamente para evaluar la actividad de los compuestos antimicrobianos, y se han determinado también algunos factores que afectan la reproducibilidad del método, por lo que es necesario validar las modificaciones que se han realizado a estos métodos convencionales para ser adaptados a pruebas con aceites esenciales y extractos de plantas.
- Nuestro país tiene potencial en el mercado de aceites esenciales, en el 2012 las exportaciones ecuatorianas de aceites esenciales hacia Estados Unidos uno de los mayores importadores de estos insumos en el mundo, representaron el 0.25% de las exportaciones totales. Es importante trabajar en este potencial, mejorar la producción siempre encaminada a llegar a los estándares de calidad, que permitan

formar parte de las exigencias de un mercado muy atractivo y con crecimiento, por la tendencia hacia lo natural, no sólo en el área cosmética.

- Se recomienda continuar con investigaciones de Desarrollo de Producto en el campo fitocosmético, en varias formas cosméticas, ya que la tendencia conservante demostrada con el AE de Romero *Rosmarinus officinalis* podría ser utilizada tanto en formas cosméticas anhidras, acuosas o emulsiones.
- Dentro del desarrollo de producto recomendado, es importante también estudios de mercado, debido a que un fitocosmético podría tener costos mayores, pero generalmente productos bajo la denominación de cosmética natural, están dirigidos a segmentos que están dispuestos a pagar más dinero por un producto, y más aún si existe la denominación “sin conservante sintético”.

BIBLIOGRAFÍA

- A. del Pozo, & Viscasillas, A. (2006). Preparados espumógenos en cosmética: características generales y elementos para su formulación. *Parafarmacia*, 42-52.
- Abdel, & Massih, R. (2010). Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum graecum* on Highly Drug Resistant Gram Negative Bacillium. *Journal of Botany* , 8.
- Adams, R. P. (2009). *Identification of Essential Oil Componentes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition*. Illinois: AlluredBooks.
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA. (2013). *Potencial carcinogénico do Lauril Sulfato de Sódio*. Brasil: Camara Tecnica de Cosmeticos CATEC.
- Alcalde. (2010). Cosmética Natural y Ecológica regulación y clasificación. *El Portal de la Industria Estética*.
- Alonso, J. (2010). *Curso de Fitodermatología*. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Fitomedicina.
- Atti-Santos, A., Rossato, M., Fernades, G., Duarte, L., Rech, J., Pansera, M., y otros. (2005). Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Brazilian Archives of Biology and Technology. An Internacional Journal*, 1035-1039.
- Barry, L., Amsterdam, D., Coyle, M., Gerlach, C., & Thornsberry, H. (1979). Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *Journal Clinical and Microbiology*, 910.
- Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2001). *Common Fragrance and Flavor Materials, Preparation, Properties and Uses*. WILEY-VCH, Weinhein.
- Bautekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., & Bessiere, J. (2003). Extraction of rosemary essential oil by distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 481-484.
- Berthiaume, M. (1997). Formulation of conditioning shampoos. *Drog & Cosmetic Industry*, 54 -64.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad Antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*, 298 - 301.

- Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., & Jiménez, S. (2010). Actividad Bactericida del extracto etanólico y del aceite de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia*, 149-154.
- Celiktas, Y., Kodabas, H., Bedir, E., Sukan, V., Ozek, T., & Baser, K. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 553-559.
- Clark. (2010). Tornando Verde La Química del Cuidado personal. *Cosméticos & Toiletries Latinoamérica*, 26-29.
- Clinical Laboratory Standards Institute. (2003). *Performance Standards for Antimicrobial Disk*. Pennsylvania: NCCLS document M2 - A8.
- Colorado, J., Galeano, E., & Martínez, A. (2007). Desarrollo de la Bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra la *Escherichia coli*. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, ISSN 0121-4004 Volumen 14 número1*, 67-71.
- Comisión de las Comunidades Europeas. (2006). *Diario Oficial de la Unión Europea*. Bruselas.
- Conde. (2012). ¿Se debería prohibir los parabenos en cosméticos? *El Sevier Doyma*, 1-3.
- CONSUMER. (2004). Análisis Comparativo Champús de uso Frecuente para cabello normal. *CONSUMER*, 30-33.
- Correa, J. E. (1992). *Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andres Bello*. Bogotá: SECAB.
- CYTED Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. (1995). *Manual de Técnicas de Investigación*. CYTED.
- Checira, G., & Lozano, Z. (1992). Estudio de la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales (mejorana, romero, salvia). *Tesis de Pregado Universidad Industrial de Santander*, 27-92.
- Darbre. (2004). Concentrations of Parabens in Human Breast. *Journal of Applied Toxicology*, 6-13.
- del Pozo, A., & Viscasillas, A. (2006). Preparados espumógenos en cosmética: características generales y elementos para la formulación. *Parafarmacia*, 43-51.

- Devetak. (1977). Production of the essential oil of rosemary on the island of Hvar, Zbornik Simpozija, Harv u Prirodnim Znanostima. *Zagreb*, 109-123.
- Do Vale, C., Da Cunha, P., & Roque, O. R. (1980). Contribuicao para o estudo analitico do oleo essencial de alecrim nacional. *Boletim Faculdade de Farmacia de Coimbra*, 35-45.
- Dorman. (1999). Phytochemistry and bioactive properties. *University of Strathclyde*, 308-311.
- Dorman. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 308-316.
- EQUINLAB S.R.L. (2008). *La importancia de la aw – Actividad del Agua*. Capital Federal - Argentina: EQUINLAB.
- Fisher. (1979). Paraben dermatitis due to a new medicated bandage: The “paraben paradox”. *Contact Dermatitis*, 273-273.
- Flamini, G., Cioni, P., Morelli, I., Macchia, M., & Ceccarini, L. (2002). Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3512-3517.
- Flores. (1999). Aceites Esenciales con propiedades antimicrobianas. *BIOFARMA*, 5-8.
- Franquilino. (2010). Productos para el cabello. *Cosméticos & Tecnologías Latinoamérica*, 7-14.
- Franquilino. (2011). Universo de Lujo. *Cosméticos & Tecnología Latinoamérica*, 7-10.
- Fuente. (2011). *Estudio de Mercado de Cosmética Natural y Aromaterapia en Estados Unidos*. Madrid - España: Cámara de Comercio de Madrid.
- Gamboa. (2011). Conservantes: un mal necesario. *Cosméticos & Tecnología*, 12.
- García. (2009). Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- García, C., & Martínez, A. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*, 86-96.
- García, P. (2002). Ventajas y problemas de los métodos automatizados. *Rev Chil Infect (Supl. 2)*, 96-100.
- Godfrey. (2011). Parabenos Mitos y Realidades. *Cosméticos & Tecnología*, 16-18.

- Grant Burgess, J., Jordan, E., Migena Bregu, Mearns - Spragg, A., & Boyd, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Progress en Industrial Microbiology*, 27.
- Hammer, K., Carson, C., & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 985-990.
- Hend. (2009). Monitoring of Antimicrobial Activity of Essential Oils Using Molecular. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 20-25.
- Hermida. (2011). *The Whole Body at Whole foods market Europe*. Brighton: Natural Beauty.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de Sensibilidad antimicrobiana- Metodología del Laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Doctor Carlos Saéz Herrera versión ISSN 1017-8546*.
- Hethelvi, E., Kaposi, P., & Kernoczi, Z. (1987). GC/MS investigation of the essential oils *Rosmarinus officinalis L.* . *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 159-169.
- INEN Instituto Ecuatoriano de Normalización. (10 de 12 de 1973). Grasas y aceites comestibles: Determinación de la densidad relativa. *INEN 35*. QUITO, PICHINCHA, ECUADOR: Registro Oficial No. 461 del 1973-12-27.
- Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. (2009). *Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma Aprobada, décima edición, Documento CLSI M02-A10*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standars Institute.
- International Organization for Standardization. (2012). *ISO 11930:2012*.
- Janssen. (1987). Antimicrobial activity of essetial oils. *Planta Medica*, 395-398.
- Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., & Benlabeled, K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 129-133.
- Kalemba. (2010). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 813-829.
- Kaposi, P., & Hethelyi, E. (1987). GC/MS investigation of essential oils *Rosmarinus officinalis* . *Pharmaceutica Hungarica*.
- Kline & Company. (2008). *Specialty Actives and Active Delivery Systems for Personal*. United States: Klinegroup.

- Kline & Company. (2008). *The "Greening" of personal care*. Amsterdam: Kline Global Headquarters.
- Kline&Company. (2012). *Natural and Organic Beauty Maintains Strong Demand, Expected to Grow 10% Through 2016*. Estados Unidos: GCI Natural & Organic.
- Krob. (2004). Prevalence and relevance of contact dermatitis allergens: A meta-analysis of 15 years of published T.R.U.E. test data. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 349-353.
- Lemmel. (2008). Conservantes. *Offarm*, 58-64.
- Leranoz. (2002). Conservantes Cosméticos. *Dermofarmacia*, 74-78.
- Lifshitz. (2003). La pretendida supremacia de lo natural. *Gaceta Médica Mexico*, 294-298.
- López. (2009). Higiene Corporal y Fitoterapia. *Farmacia Profesional*, 56-59.
- Maguna, F., Romero, P., Garro, A., & Okulik, O. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*.
- Manrique, E. (2009). *Tensioactivos y Auxiliares*. Lima - Perú: Artisan.
- Martini. (2005). *Introducción a la Dermofarmacia y a la Cosmetología*. Zaragoza- España: Acribia.
- Mateus, E., Lopes, C., Nogueira, T., Laurencó, J., & Marcelo, M. (2006). Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal. *Silva Lusitana*, 203-217.
- Microbiologics. (2011). *Quality Control Microorganism Products 39th Edition Reail Catalog*. Saint Cloud, Minnesota 56303 USA.
- Ministerio de Sanidad y Consumo España. (2002). *Real Farmacopea Española Segunda Edición*. Madrid: Imprenta Nacional del Boletín Oficial del Estado.
- Miñana, M., & Goncalves, E. (2011). *Aplicaciones cosméticas y farmacéuticas de los surfactantes*. Mérida - Venezuela: Laboratorio FIRP - Escuela de Ingeniería Química - Universidad de los Andes.
- Moreno. (2005). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extract linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 223-231.
- Nadinic. (2009). Fitocosméticos mas productos con ingredientes naturales. *Safybi*, 54-57.
- National for Clinical Laboratory Standards. (1998). *Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico*. Miami: National Medical Laboratory.
- Neves. (2010). Belleza Ecológicamente Correcta. *Cosméticos & Tecnología Latinoamericana*, 8 -10.

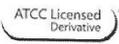
- Oficina Comercial del Ecuador en Nueva York Estados Unidos. (2011). *Perfil de Aceites Esenciales*. Nueva York: PROECUADOR Instituto de Promoción de Exportación e Inversiones.
- Olmos, L. (2002). Acciones y Formas cosméticas. *Dermocosmos : Departamento de Dermatología de la Universidad Complutense de Madrid*.
- Petersdorf, R., & Sherris, J. (1965). Methods and significances of in vitro testing of bacterial sensitivity to drugs. *The American Journal of Medicine*, 766-779.
- Pintore. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour a Fragrance Journal*, 15-19.
- Proexport Colombia. (2008). *SECTOR COSMETICOS*. Bogotá: Fiducoldex – Fideicomiso Proexport Colombia.
- Ramírez, L., & Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 263 -269.
- Rastogi. (1995). Contents of methyl, ethyl, butyl and benzylparabeno in cosmetic products. *Contact Dermatitis*, 32:28-30.
- Registro Oficial Ecuador. (Martes 12 de Noviembre de 2013). Registro Oficial N°121. *Reglamento Técnico Ecuatoriano INEN 093 PRODUCTOS COSMÉTICOS*. Quito, Pichincha, Ecuador: Editora Nacional.
- Riera, E., Chamorro, G., Zárate, M., Falcón, M., & Franco, R. (2008). Efecto del espesor y del pH del agar Mueller-Hinton en el antibiograma. *Rev Panam Infectology*, 64-69.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). *Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. Mexico: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Rosato, A. (2013). *Microbiologia Farmaceutica Seconda Edizione*. Napoli: EdiSES.
- Routledge. (1998). Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and applied of Pharmacology*, 12 - 19.
- Scientific Committee on Consumer Safety. (2008). *Opinion on parabens*. Scientific Committee on Consumer Products.
- Scientific Committee on Consumer Safety. (2010). *SCCS recommends use levels for most widely used parabens*. Brussels: Colipa The European Cosmetic Association.
- Schamberg. (1967). Allergic Contact Dermatitis to Methyl and Propyl Paraben. *Jama Dermatology*, 626-628.
- Schorr. (1966). Paraben sensitivity. *Arch Derm*, 721-723.

- Skrubis, G., & Seven. (1972). Wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils. *Flavour Industry*, 566-568,572.
- Smart. (1972). Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetic. *J.Soc.Cosmetic*, 721-736.
- Soliman, F., & Kashory, E. (1994). Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 29-33.
- Soliman, F., El-Kashoury, E., Fathy, M., & Gonaid, M. (1994). Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*, 29.
- Soni. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chemical Toxicology*, 985-1015.
- Stainer, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., & Painter, P. R. (1989). *Microbiología 2 Ed.* Ed. Reverté.
- Steinberg, D. (2011). Effective vs. Ineffective Preservation Using Water Activity. *Cosmetics & Toiletries*, 1-7.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., & Sökmen, A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zahary et P.H. Davis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1132.
- The United States Pharmacopeia Convention Inc.USA. (2010). *United States Pharmacopeia 33 and National Formulary 28, Supplement 1*. Estados Unidos.
- Tolosa. (2011). *Propuesta de modelo de norma para certificar/acreditar productos cosméticos "naturales", con "contenido orgánico" y "orgánicos" sustentables*. Buenos Aires: Departamento de Investigaciones Universidad de Belgrano.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smania, E., & Smania, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 369-380.
- Vanden Berghe, D., & Vlietinck, A. (1991). Screening for antibacterial and antiviral agents in Hostettmann K (ed). *Methods in Plant Biochemistry*, 47-69.
- Varga, J., Kocsubé, S., Toth, B., Frisvad, J., Perrone, G., Susca, A., y otros. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1925-1932.

- Vargas, A., & Bottia, E. (2008). *Estudio de la Composición de aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolivar y el Peñon. Santander Colombia*. Bucaramanga: Tesis de grado Universidad Industrial de Santander.
- Vargas, A., & Bottia, E. (2008). *Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón*. Santander, Colombia: Universidad Industrial de Santander.
- Vasquez, S. (18 de Junio de 2013). Parroquia de Calderon un Polo de Desarrollo. *EL TELEGRAFO*, pág. 10.
- Vera. (2004). Protección Microbiológica de Cosméticos. *GCL Latinoamerica*, 42-46.
- Yesil Celiktas, O., Kodabas, H., Bedir, E., Vardar Sukan, F., & Ozek, T. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 553-559.
- Zaccarelli, F. (2006). Extracto de Romero. *Industria Alimenticia*.
- Zaouali, Y., Messaoud, C., Ben Salah, A., & Boussaïd, P. (2005). Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 512-520.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-262 Reference Number: ATCC® 9027™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2014/03 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2012/5/2
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark, and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p></p>	

Fuente: Microbiologics, 2012.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-138 Reference Number: ATCC® 6538™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2013/12 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2012/2/8
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>TESTING CERT #2655.01</p>	

MEDINA S.A. Distribuidor de
Microbiologics, Inc. para este producto
y certificado con originales
Lote: Expiración:

Fuente: Microbiologics, 2012.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-255 Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2014/06 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2012/8/9
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p> TESTING CERT #2655.01</p>	

Fuente: Microbiologics, 2012.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-228 Reference Number: ATCC® 10231™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2014/05 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2012/7/13
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p>(1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>  TESTING CERT #2655.01</p>	

Fuente: Microbiologics, 2012.

Anexo 5 : Certificado de Análisis *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Aspergillus brasiliensis</i> Catalog Number: 0392 Lot Number: 392-157 Reference Number: ATCC® 16404™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 100 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2014/02 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2012/5/1				
Performance Macroscopic Features: Rapidly growing colonies which are initially white or pale yellow, quickly become black with conidia (spore) production. Reverse is pale yellow. Microscopic Features: Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle		Medium: PDA Method: Lactophenol Blue (1)				
Vitek None <table border="1"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>		Phenotypic Features	Results			Other Features/ Challenges: Results  Brad Goskowitz, President AUTHORIZED SIGNATURE
Phenotypic Features	Results					
Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods. Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information. Individual products are traceable to a recognized culture collection. (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.						
 TESTING CERT #2655.01						

Fuente: Microbiologics, 2012.

Anexo 6 : Ficha Técnica Sodium Laureth Sulfate



Informe Técnico

Produto	LAURIL ÉTER SULFATO DE SÓDIO
INCI	<i>Sodium laureth-2 sulfate</i>
Definição	Tensoativo aniônico
Propriedades	<p>O LAURIL ÉTER SULFATO DE SÓDIO é, sem dúvida, o tensoativo aniônico mais empregado na Indústria Cosmética e Farmacêutica, em função de sua versatilidade e do seu custo-benefício. Obtido sinteticamente a partir da reação dos álcoois graxos (Láurico) de origem natural (pode ser dos ácidos graxos de coco, babaçu ou palmiste) com óxido de etileno, forma o éter etoxilado que, em seguida, é sulfatado, formando o Lauril Éter Sulfato de Sódio.</p> <p>O LAURIL ÉTER SULFATO DE SÓDIO é um tensoativo suave, de baixo poder de irritação. É um produto fácil de se trabalhar, compatível com quase todos os outros tensoativos usados em formulações de shampoos e sabonetes líquidos (outros tensoativos aniônicos, tensoativos não-iônicos, tensoativos anfóteros, sarcosinatos, betaínas, amidas e amins oxidas, alquil glicosídeos, etc.), e compatível também com quase todos os tipos de ingredientes usados em shampoos, como os extratos vegetais, de algas marinhas, ativos bactericidas e anti-caspas, espessantes, emolientes, proteínas, aminoácidos, colágenos, lanolina, bioativos, silicone e seus derivados, espessantes, umectantes, etc.</p> <p>O LAURIL ÉTER SULFATO DE SÓDIO é um tensoativo aniônico com alto poder de detergência, espuma e limpeza, sendo utilizado nas formulações cosméticas de shampoos de todos os tipos e formas (shampoos perolados, shampoos transparentes, shampoos anticaspas, shampoo-condicionadores, etc), sabonetes líquidos, espuma de banhos, shower-géis, creme de barbear, creme dental, sabonete líquido antisséptico para linha hospitalar, loções antissépticas de limpeza, sal de banho líquido, etc.</p>
Aplicações	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Shampoos de todos os tipos ▪ Sabonetes líquidos ▪ Espumas de banho ▪ Shower-géis ▪ Creme de barbear ▪ Creme dental ▪ Sabonetes antissépticos ▪ Loções de limpeza

Informações farmacotécnicas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentração de Uso: 16 a 30% ▪ Solúvel em água ▪ O pH da formulação deverá ficar entre 5 e 9 (em pH < 4 ou >9, pode haver hidrólise, formando ácidos graxos livres e com separação de fases) ▪ Incompatível com a maioria das substâncias catiônicas
Bibliografia	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Dossiê técnico do fabricante</i> 2. <i>Manual de Incompatibilidades farmacotécnicas em preparações de uso tópico – ANFARMAG – 2003</i>

Deg Importação de Produtos Químicos Ltda.

Rua: Jurupari, 775 / 779 / 803 - Cep 04348-070 - Jd. Oriental - São Paulo - SP
 Rua: José Mariano Filho, 200 - Cep 04347-180 - Jd. Oriental - São Paulo - SP
 Tel.: 11 5033-3700 - Fax: 11 5033-3711 - sac@deg.com.br - www.deg.com.br - www.fagron.com.br



Fuente: Fagron, 2003.

Anexo 7: Ficha Técnica Cocoamidopropilbetaína

FICHA TÉCNICA.

PROBETAINA CAPB

COCOAMIDOPROPIL BETAINA

La **PROBETAINA CAPB** es un surfactante anfotérico biodegradable, con características de suavizante y espumante. Su estructura es de Amido Betaina (Coco Amido Propil Betaina).

La **PROBETAINA CAPB** es fabricada con las especificaciones de calidad requeridas para aplicaciones industriales, cosméticas y de tocador.

Por ser un producto anfotérico, la **PROBETAINA CAPB**, es compatible con todo tipo de surfactante (aniónico, catiónico y no iónico), además, mantiene esta compatibilidad con agentes espumantes y surfactantes en un amplio rango de pH.

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	
Apariencia	Líquido transparente
Color	Levemente amarillo
Nombre químico	Cocoamidopropil betaina
%Ingrediente Activo	29.0 - 31.0
% Sólidos Totales (2g, 2h / 100□ c -105□c)	37.0 max.
pH (sol. Acuosa 10%)	6.0 - 8.0
% Cloruro de Sodio	5.5 max.

APLICACIONES Y GUIA DE USOS

La **PROBETAINA CAPB** incorporada en champúes proporciona excelente acondicionamiento y manejabilidad al cabello. Estas propiedades se manifiestan particularmente en sistemas con bajo pH.

La **PROBETAINA CAPB** combinada otros surfactantes aniónicos, aumenta la viscosidad, permitiendo obtener formulaciones de productos desde líquidos viscosos, hasta geles.

El uso de **PROBETAINA CAPB**, en sistemas que contengan agentes tales como proteínas o polímeros catiónicos, aumenta la deposición de esos agentes en el cabello o la piel.

Por sus características de humectabilidad y acondicionamiento, es usada en forma general en detergentes.

El uso de **PROBETAINA CAPB**, en ciertos sistemas de surfactantes, incrementa el punto de nube del sistema.

Actúa como agente humectante en limpiadores alcalinos y ácidos.

Además, por su compatibilidad con amonios cuaternarios y otros germicidas, la **PROBETAINA CAPB** puede ser usada en limpiadores, desinfectantes y sanitizantes tanto ácidos como alcalinos.

En formulaciones de champúes no irritantes la **PROBETAINA CAPB** puede usarse en dosis aproximadas del 10% en peso del mismo.

MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Por su naturaleza química no presenta riesgo alguno para su manejo. Si hay contacto directo con la piel y/o los ojos, lavar con abundante agua.



PROTECNICA INGENIERIA S.A

Carrera 34 N. 13 - 150 Arroyohondo - Yumbo
PBX 6647330 - 31. Ventas 664 8172 - 6651894
FAX 665 5350 - 665 4461. A.A 5331 Cali - Colombia
E-Mail: ventas@protecnicaing.com

Debe almacenarse en tambores bien cerrados, a la sombra y a temperaturas inferiores a 40 °C.

La **PROBETAINA CAPB** permanece inalterable en sus propiedades fisicoquímicas por temporadas superiores a un año en condiciones óptimas de almacenamiento.

Siga las recomendaciones y procedimientos de seguridad de su compañía para el manejo de este producto.

Remítase a la hoja de seguridad MSDS para mas detalles.

PRESENTACION

Tambor plástico de 200 Kilogramos netos.

Fabricado por:

PROTECNICA INGENIERIA S.A.
Cali-Colombia.

Fecha ultima revision: Diciembre 20 del 2002

 **PROTECNICA INGENIERIA S.A**
Carrera 34N. 13 - 150 Arroychondo - Yumbo
PBX 664 7330 - 31. Ventas 664 8172 - 6651894
FAX 665 5350 - 665 4461. A.A 5331 Cali - Colombia
E-Mail: ventas@protecnicaing.com

Fuente: Protécnica, 2002.

Anexo 8 : Ficha técnica PEG-150 pentaeritritil tetraestearato y PEG-6 glicéridos caprílicos/capricos



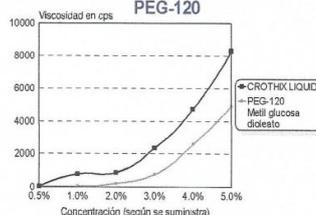
PERSONAL CARE

CROTHIX™ LIQUID

PEG-150 pentaeritritil tetraestearato (y) PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos (y) agua

CROTHIX LIQUID* es una versión líquida un 45% activa de CROTHIX, nuestro espesador de alto rendimiento para sistemas tensioactivos acuosos. Al ser un líquido fácil de usar, CROTHIX LIQUID funciona especialmente bien en sistemas de mezcla fríos y proporciona a los formuladores la eficiencia de espesamiento para crear champúes, lociones corporales, geles para la ducha y jabones líquidos u otros productos a base de jabón que son económicos, así como atractivos desde un punto de vista reológico. Al igual que CROTHIX, CROTHIX LIQUID no requiere neutralización, no forma subproductos de nitrosaminas, y contribuye a menudo a una sensación 'acondicionada' en productos de enjuague.

Viscosidad comparativa
CROTHIX LIQUID en función del espesador
PEG-120



Como se ha mostrado en el gráfico de arriba, CROTHIX LIQUID produce una mayor viscosidad de una base de champú ALS que PEG-120 metil glucosa dioleato, y a concentraciones del 1-2%, proporciona una viscosidad mucho mayor que este espesador convencional. Dicho rendimiento permite el uso de CROTHIX LIQUID a concentraciones menores que el producto PEG-120, y demuestra tanto su eficacia como economía como un espesador.

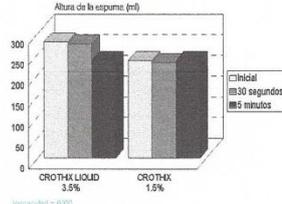
El uso de CROTHIX LIQUID en formulaciones cosméticas y de otra clase está cubierto por la patente de EE.UU. No. 5,192,462 asignada a Croda Inc.

CROTHIX LIQUID puede usarse para espesar productos como champúes, geles para baños o jabones líquidos, precalentando simplemente el material a una temperatura superior a 50°C y añadiéndole a la base tensioactiva fría mezclando. En la mayoría de los casos, la mezcla resultante es transparente, siempre que el pH sea mayor o igual que 5.0. Sin embargo, lo mejor es comprobar cada formulación individual, ya que algunos sistemas pueden oscurecerse si se mezclan de esta manera. Si se desea, las formulaciones que son bastante viscosas pueden mezclarse y hacer que sea más fácil agitarlas. Los productos tipo emulsiones como lociones corporales, acondicionadores y lociones pueden formularse fácilmente incorporando CROTHIX LIQUID en la fase olea y calentando la mezcla a una temperatura superior a 50°C antes de formar la emulsión.

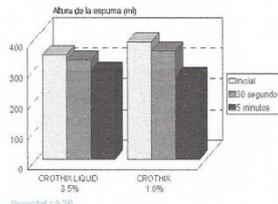
Las evaluaciones en la compañía de una loción de champú para bebés, usando cada una CROTHIX LIQUID al 3,5% en lugar de CROTHIX, hicieron ver que los productos CROTHIX LIQUID son esencialmente los mismos y muestran características de lavado y sensación similares. Estos productos también producen una espuma similar —a saber,

burbujas de tamaño pequeño al principio y de mayor tamaño durante el segundo mojado. Abajo se muestran los resultados de las pruebas de altura de la espuma.

**Loción transparente para el cuerpo
BP-48-1/BP-48**



**Champú para bebés
SH-86-2/SH-86-1**



Observe lo siguiente: La concentración de PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos en la fórmula de loción transparente para el cuerpo disminuyó para tener en cuenta el contenido de este material en CROTHIX LIQUID.

Al igual que CROTHIX, la mejor forma de usar CROTHIX LIQUID es a un pH comprendido entre 5,0 y 9,0, tolera muy bien la sal, y a diferencia de los carbómeros, no necesita neutralizarse. El material es muy soluble en sistemas tensioactivos aniónicos, no iónicos y anfóteros, y es compatible con las sales catiónicas. Se ha descubierto que CROTHIX LIQUID da muy buen resultado como componente espesador de una serie de mezclas de tensioactivos sin DEA que desarrolló Croda usando CRODASINIC™ LS-30 (lauril sarcosinato sódico) con ALES, ALS, SLES o SLS como agente tensioactivo principal. (Consulte en la hoja de datos de CRODASINIC LS-30 (DS-71R-1) los datos de formación de espuma y viscosidad, y concentraciones de uso precisas).

Concentraciones de uso típicas: 1-8%

Equivalentes de CROTHIX/CROTHIX LIQUID

Como espesador líquido, CROTHIX LIQUID es tanto económico como eficiente; sin embargo, a un 45% activo requiere una mayor concentración que CROTHIX y tal vez sea necesario usarlo a una concentración hasta 2 1/2 veces mayor para producir la misma viscosidad. Hemos desarrollado un conjunto de equivalentes de CROTHIX/CROTHIX LIQUID para ayudar a los formuladores que estén usando CROTHIX y deseen reemplazarlo por nuestro producto CROTHIX LIQUID o que puedan ser responsables de formular sistemas de mezcla fríos.

Estos equivalentes funcionales se dan en forma de cuatro conjuntos separados de formulaciones de CROTHIX/CROTHIX LIQUID y se muestran en una serie de tablas fáciles de seguir que empiezan en la página siguiente. Se ha probado en el laboratorio cada formulación de CROTHIX LIQUID y se ha encontrado que es equivalente tanto en actividad (% de sólidos) como en rendimiento a la versión respectiva de CROTHIX. Las formulaciones son duplicados de sistemas de champú básicos basados en ALES, ALS, SLES o SLS y contienen un 1% de CROTHIX o la concentración equivalente de CROTHIX LIQUID y una concentración ajustada de agente tensioactivo. La equivalencia ha sido determinada midiendo la viscosidad (cps) y la altura de la espuma (m). Los valores aparecen debajo de los ingredientes indicados para cada una de las fórmulas de CROTHIX y CROTHIX LIQUID. Se indican las concentraciones de uso precisas para cada ingrediente, permitiendo a los formuladores calcular fácilmente la concentración de CROTHIX LIQUID según su propia fórmula o hacer los ajustes necesarios en caso de que se use una mezcla de agentes tensioactivos.

Como siempre, nuestros químicos de aplicaciones están disponibles y pueden ayudarle en la formulación o aclarar las dudas que puedan tener. Puede llamar al Laboratorio de aplicaciones en nuestro Centro Técnico Norteamericano al (732) 417-0800.

CROTHIX LIQUID está aprobado para ser usado en Japón, citado como "polioxietileno pentaeritritol tetraestearato (150EO), glicéridos polioxietileno caprílico/cáprico (6EO), agua" y es adecuado para champúes para ser distribuidos por todo el mundo.

Análisis típico

ASPECTO	Líquido transparente a oscuro
OLOR	Suave, característico
VALOR ÁCIDO	5,0 máx.
VALOR DE SAPONIFICACIÓN	35-43

Laureth sulfato amónico (ALES) (2 moles, 25% activo)

<i>Fórmula CROTHIX</i>	<i>% WW</i>	<i>Fórmula CROTHIX LIQUID</i>	<i>% WW</i>
ALES	33,6	ALES	33,6
CRODATERIC™ CAS 50	7,0	CRODATERIC CAS 50	7,0
CROTHIX	1,0	CROTHIX LIQUID	4,0
Germaben II	1,0	Germaben II	1,0
Agua desionizada	57,4	Agua desionizada	54,4
*Viscosidad, cps	38.500	*Viscosidad, cps	34.000
†Altura de la espuma, ml	680/620	†Altura de la espuma, ml	580/530

* RVT Spindle #TC, 10 rpm, @ 25°C

† Los valores representan la altura de la espuma en la lectura inicial y a los 5 minutos.

Lauril sulfato amónico (ALS) (28% activo)			
<i>Fórmula CROTHIX</i>	<i>% WW</i>	<i>Fórmula CROTHIX LIQUID</i>	<i>% WW</i>
ALS	30,0	ALS	30,0
CRODATERIC CAS 50	7,0	CRODATERIC CAS 50	7,0
CROTHIX	1,0	CROTHIX LIQUID	1,5
Germaben II	1,0	Germaben II	1,0
Agua desionizada	61,0	Agua desionizada	60,5
*Viscosidad, cps	225	*Viscosidad, cps	215
†Altura de la espuma, ml	725/680	†Altura de la espuma, ml	750/700

* RVT Spindle #3, 20 rpm, @ 25°C

† Los valores representan la altura de la espuma en la lectura inicial y a los 5 minutos.

Laureth sulfato sódico (SLES) (3 moles, 30% activo)			
<i>Fórmula CROTHIX</i>	<i>% WW</i>	<i>Fórmula CROTHIX LIQUID</i>	<i>% WW</i>
SLES	28,0	SLES	28,0
CRODATERIC CAS 50	7,0	CRODATERIC CAS 50	7,0
CROTHIX	1,0	CROTHIX LIQUID	2,2
Germaben II	1,0	Germaben II	1,0
Agua desionizada	63,0	Agua desionizada	61,8
*Viscosidad, cps	29	*Viscosidad, cps	29
†Altura de la espuma, ml	650/570	†Altura de la espuma, ml	625/580

* RVT Spindle #2, 50 rpm, @ 25°C

† Los valores representan la altura de la espuma en la lectura inicial y a los 5 minutos.

Lauril sulfato sódico (SLS) (29% activo)				
<i>Fórmula CROTHIX</i>	<i>% W/W</i>		<i>Fórmula CROTHIX LIQUID</i>	<i>% W/W</i>
SLS	29,0		SLS	29,0
CRODATERIC CAS 50	7,0		CRODATERIC CAS 50	7,0
CROTHIX	1,0		CROTHIX LIQUID	2,2
Germaben II	1,0		Germaben II	1,0
Agua desionizada	62,0		Agua desionizada	60,8
*Viscosidad, cps	31		*Viscosidad, cps	34
† Altura de la espuma, ml	815/710		† Altura de la espuma, ml	810/735

* RVT Spindle #2, 50 rpm, @ 25°C

† Los valores representan la altura de la espuma en la lectura inicial y a los 5 minutos.

CRODATERIC CAS 50: Cocamidopropil Hidroxisultaina

Non-warranty

The information in this publication is believed to be accurate and is given in good faith, but no representation or warranty as to its completeness or accuracy is made. Suggestions for uses or applications are only opinions. Users are responsible for determining the suitability of these products for their own particular purpose. No representation or warranty, expressed or implied, is made with respect to information or products including, without limitation, warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, non-infringement of any third party patent or other intellectual property rights including, without limit, copyright, trademark and designs. Any trademarks identified herein are trademarks of the Croda group of companies.
©2009 Croda Inc

Loción Corporal Transparente

BP-48-2

Debido a la incorporación de GLYCEROX™ 767, esta loción corporal transparente imparte efectos emolientes que producen una sensación limpia, refrescante y también lubricante haciéndolo sin dejar una sensación posterior demasiado aceitosa. CROTEIN™ C-50 se usa para acondicionar. CROTHIX™ LIQUID es el espesador.

Ingredients	%
Parte A	
Agua desionizada	54,40
SLES (3 moles)	20,00
CRODATERIC™ CAS 50 (cocamidopropil hidroxisultaina)	21,00
AEDT disódico	0,10
Parte B	
INCROMIDE™ CDEA (cocamida DEA)	3,00
GLYCEROX 767 (PEG-6 triglicéridos cápricos/caprílicos)	2,00
CROTHIX LIQUID (PEG-1 50 pentaeritritil tetraestearato (y) PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos (y) agua)	3,50
Parte C	
CROTEIN C-50 (colágeno hidrolizado)	1,00
INCROMECTANT™ LAMEA (acetamida MEA (y) lactamida MEA)	1,00
Solución de ácido cítrico al 10%	1,00
Propilenglicol (y) diazolidinil urea (y) metilparabén (y) Propilparabén	1,00
Suppliers: 1. Croda 2. Germaben II, ISP	

pH = 5,5 ± 0,5 ; Viscosidad = 6.000 cps ± 10% (RVT, Spindle #3, 10 rpm a 25°C)

Procedimiento

Combine los ingredientes de la Parte A mezclando. Combine los ingredientes de la Parte B mezclando y calentando a 50°C. Añada lentamente la Parte B a la Parte A mezclando. Añada ingredientes de la Parte C a la Parte A individualmente mezclando. Mezcle hasta que la mezcla sea uniforme.

Champú Para Bebés

SH-86-3

Este champú para bebés dispone de CROVOL™ A-70 y CRODATERIC™ CAS 50, agentes tensioactivos derivados naturalmente que dan a esta fórmula su suavidad. Además de una capacidad de reducir la irritación de los sistemas de agentes tensioactivos/champú, CROVOL A-70 también se usa aquí como agente humedecedor y solubilizador de fragancias. CRODATERIC CAS 50 es un reforzador de espuma suave, produciendo una espuma cremosa. CROTHIX™ LIQUID se usa para espesar la fórmula.

Ingredients	%
Parte A	
SLES (3 moles)	20,00
CRODATERIC CAS 50 (cocamidopropil hidroxisultaina)	12,00
Agua desionizada	48,50
Parte B	
CROVOL A-70 (PEG-60 glicéridos de almendra)	15,00
CROTHIX LIQUID (PEG-150 pentaeritritil tetraestearato (y) PEG-6 glicéridos caprílicos/cápricos (y) agua)	3,50
Parte C	
Propilenglicol (y) diazolidinil urea (y) metilparabén (y) Propilparabén	1,00

Suppliers: 1. Croda 2. Germaben II, ISP

pH = 6,22 ± 0,5; Viscosidad = 9.200 cps ± 10% (RVT, Spindle #4, 10 rpm a 25°C)

Procedimiento

Combine los ingredientes de la Parte A mezclando. Combine los ingredientes de la Parte B mezclando y calentando a 50°C. Añada la Parte B a la Parte A mezclando. Añada los ingredientes de la Parte C de uno en uno mezclando. Ajuste el pH si es necesario con una solución acuosa del 10% de HCl. Enfrie mezclando hasta alcanzar la temperatura de llenado deseada.

Anexo 9: Ficha Técnica Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben

Herbal extracts	Cosmetic ingredients
	<h3 data-bbox="550 443 678 474">Phenova</h3> <p data-bbox="550 481 694 504">Art. No. NA21076</p> <p data-bbox="1204 452 1252 474">07/04</p> <p data-bbox="550 542 1252 609">Phenova is a fully active liquid preservative suitable for the anti-microbial protection of Cosmetic and pharmaceutical applications. The following advantages of Phenova are emphasised:</p> <ul data-bbox="566 631 1252 1348" style="list-style-type: none">➤ Broad spectrum anti-microbial activity - Phenova exhibits rapid microbiocidal activity against Gram negative bacteria, as well as Gram positive bacteria, yeast's and moulds.➤ Suitable concentrations show rapid bactericidal activity, even against such species as <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, which is resistant to many preservatives and is a frequent contaminant of tropical preparations.➤ Easy incorporation - being a liquid, miscible with many organic solvents, surfactants and emulsifiers, Phenova is easily incorporated into the materials to be preserved.➤ Good compatibility - Phenova is chemically inert and is therefore compatible with the majority of types of chemical compounds. At the correct concentrations, it maintains strong, extensive efficacy in the presence of such materials as proteins, gums, anionic and non ionic surfactants. Phenova is compatible with both anionic and cationic systems and maintains its anti-microbial activity an acid, neutral and mildly alkaline pH conditions. Phenova does not cause any change in colour or odour to the final products; this is particularly important in Cosmetic products.➤ Non-volatile - Phenova is non-volatile. There should be no loss of preservative from the product even after prolonged storage.➤ Highly stable - Phenova remains fully stable over a wide pH and temperature range. There is no significant degradation of Phenova when strongly heated in the pH range 3 - 8. Aqueous solution of Phenova will withstand autoclave sterilisation without detriment to the preservative.➤ Low toxicity - A comprehensive dossier of toxicological data on Phenova is available. Phenova has a low order of toxicity, (oral LD₅₀ for rats is 1,55 ml/kg body weight) being non-irritant to skin, eye and mucous membranes at used concentrations. Phenova has been shown to be devoid of skin sensitising effects.➤ Fully biodegradable - At the extremely dilute conditions found in effluent, Phenova is biodegradable and thus presents no pollution hazard.➤ Other advantages - Phenova has perfume fixative properties and thus increases the increases the retention time of volatile perfumes in the product. This preservative does not contain formaldehyde and is not a formaldehyde-donor.➤ Concentration of parabens : 28% <p data-bbox="1173 1451 1252 1473">Page 1 of 2</p> <div data-bbox="343 1505 502 1653"><p>Environmental Management System ISO 14001 certified 2003 BVQI Certificate No. 140 546</p></div> <p data-bbox="343 1675 502 1697">CRODAROM</p> <p data-bbox="550 1680 861 1706">Parc d'activités « Les Plaines », 48230 Chanac, France Tel (+33) 4 66 48 20 27 Fax (+33) 4 66 48 28 41</p> <p data-bbox="909 1691 1077 1706">e-mail: Marketing@crodarom.fr</p>



Phenova

07/04

Art. No. NA21076

Phenova is a solution of Esters of p-hydroxybenzoic acid in Phenoxyethanol (Ethylenglycol-monophenylether).

Specifications

Colour / Odour	:	A practically colourless to orange-brown clear liquid. The odour is faintly aromatic.
Specific Density (20°C)	:	1.120 - 1.130
Refraction Index (20°C)	:	1.530 - 1.545

Supplementary technical information

(In addition to the specifications and values mentioned on the certificate of analysis, we also offer the following information in good faith)

INCI Name	:	Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben, Propylparaben, Isobutylparaben
Solubility	:	Soluble in Propylene Glycol, Ethanol and aqueous-alcoholic solutions; hardly soluble in water. In this case the solubility can be improved by adding approx. 15 % Propylene Glycol.
Dosage	:	In emulsions: approx. 0.7% (in aqueous phase especially when Propylene glycol is added) In shampoos: approx. 0.7% Average use level: 0.4 - 1% Effect against fungi (Candida albicans) : 0.5%
Storage	:	Between 15-25°C, dark in closed containers.
Shelf life	:	When stored accordingly, stable for 24 months.

INCI Name:	CAS-No.:	EINECS No.:
Phenoxyethanol	122-99-6	204-589-7
Methylparaben	99-76-3	202-785-7
Ethylparaben	120-47-8	204-399-4
Butylparaben	94-26-8	202-318-7
Propylparaben	94-13-3	202-307-7
Isobutylparaben	4247-02-3	224-208-8

This data sheet replaces the earlier one dated 01/96, 01/02

Above mentioned specifications are based on our latest information. They do not release the buyer from performing a quality check. No legally binding promise regarding the suitability of the product for a specific use may be derived. Freedom from patent restrictions must not be assumed.

Page 2 of 2


CRODAROM

Parc d'activités « Les Plaines », 48230 Chanac, France
Tel (+33) 4 66 48 20 27 Fax (+33) 4 66 48 28 41

e-mail: Marketing@crodarom.fr

Fuente: Crodarom, 2002