

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO
UNIDAD DE POSTGRADOS
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

Tema: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE
EMULSIONES DE MARCO (*Ambrosia arborescens* Mill) Y MATICO (*Aristeguietia
glutinosa* Lam) SOBRE HONGOS PATÓGENOS CAUSANTES DE LA
DERMATOMICOSIS

Tesis previa la obtención del Título en
“MAGISTER EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS”

Autoras:

CLARA GISELA DÁVILA MOLINA
LOURDES ANGÉLICA PAZOS GAMBARROTI

Directora de Tesis: ING. TATIANA MOSQUERA, MSC

Marzo 2015

Quito-Ecuador

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE GRADO

Nosotros, Clara Gisela Dávila Molina y Lourdes Angélica Pazos Gambarrotti, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaramos que los conceptos y análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, Marzo 2015

Clara Gisela Dávila Molina
CI 1715492011

Lourdes Angélica Pazos Gambarrotti
CI 1705355962

DEDICATORIA

A nuestras queridas familias por su amor, sacrificio, paciencia y apoyo en todo momento.

“I have learned that success is to be measured not so much by the position that one has reached in life as by the obstacles which he has overcome while trying to succeed.”

Booker T. Washington

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Tutora y amiga, Ing. Tatiana Mosquera Msc. Por su dirección, entrega e impulso para el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad por el apoyo para el desarrollo de nuestro trabajo experimental, contando siempre con la ayuda y comprensión de los Ingenieros Edison Osorio, Carina Hidalgo, Marco Ibarra y Erika Paredes, quienes estuvieron prestos con su ayuda y conocimientos.

A Ing. Luis Omar Gutiérrez por su ayuda incondicional durante la etapa de nuestros estudios, así como un importante soporte durante la ejecución del trabajo experimental de este proyecto.

A Dra. Wilma Gallegos por su valiosa amistad, colaboración y apoyo.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.3 OBJETIVOS	4
1.4 HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 LA PIEL.....	6
2.1.1 Funciones de la piel.....	7
2.1.2 Constitución de la piel.....	7
2.2 FORMULACIONES COSMÉTICAS	10
2.2.1 Cremas.....	10
2.2.2 Lociones	10
2.2.3 Suspensiones	11
2.2.4 Geles.....	11
2.3 EMULSIONES	11
2.3.1 Ventajas de las emulsiones.....	11
2.3.2 Tipos de emulsiones	12
2.3.3 Componentes de las emulsiones cosméticas.....	13
2.3.4 Sistema H.L.B.	15
2.4 CONSERVADORES.....	15
2.5 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.....	16
2.5.1 Carbomer.....	17
2.5.2 Chitosan.....	18
2.5.3 Cetyl alcohol.....	19
2.5.4 Dimethicone	19
2.5.5 Lactic acid	20
2.5.6 Lanoline.....	20
2.5.7 Paraffinum liquidum.....	21
2.5.8 Polysorbate 80.....	21
2.5.9 Propylene glycol.....	21
2.5.10 Steareth-2.....	22
2.5.11 Steareth-21.....	22
2.5.12 Stearic acid	22
2.5.13 Stearyl alcohol	23
2.5.14 Triethanolamine.....	23
2.6 PRINCIPIOS ACTIVOS ANTIFÚNGICOS	24

2.6.1	Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	24
2.6.2	Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	26
2.7	ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR HONGOS.....	28
2.7.1	Clasificación de las micosis superficiales.....	28
2.7.2	Características de los Hongos Dermatofitos estudiados	31
2.8	ANTIMICÓTICOS	34
2.8.1	Clasificación.....	34
CAPÍTULO 3.....		35
ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA.....		35
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN	35
3.2	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	35
3.3	DISEÑO EXPERIMENTAL	35
3.3.1	Diseño Plackett-Burmann.....	36
3.3.2	Diseño Factorial	37
3.3.3	Evaluación antifúngica	38
3.4	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN	39
3.4.1	Descripción del proceso de obtención de activos naturales	39
3.4.2	Descripción del proceso de obtención de quitosano	40
3.4.3	Acondicionamiento del extracto blando de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	42
3.4.4	Formulación de emulsiones o/w	43
3.4.5	Formulación de geles y lociones	47
3.4.6	Estudio de estabilidad preliminar	49
3.4.7	Evaluación de la actividad antifúngica de las formulaciones de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) y Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	51
CAPÍTULO IV.....		60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		60
4.1	DESARROLLO Y ESTABILIDAD PRELIMINAR DE FORMULACIONES DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN	60
4.1.1	Formulación de cremas de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	60
4.1.2	Formulación de emulsiones o/w de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	69
4.1.3	Interpretación de todos los resultados obtenidos en la estabilidad de formulaciones del Diseño Plackett-Burman.....	78
4.2	REFORMULACIONES ADICIONALES DE CREMAS.....	79
4.3	DESARROLLO Y ESTABILIDAD PRELIMINAR DE FORMULACIONES DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL COMPLETO	80
4.3.1	Diseño gel y loción de quitosano para extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	80
4.3.2	Diseño gel y loción de quitosano para aceite esencial Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	82
4.3.3	Interpretación de todos los resultados obtenidos en la estabilidad de formulaciones del Diseño Factorial Completo	84
4.4	REFORMULACIONES ADICIONALES DE LAS FORMAS COSMÉTICAS: CREMA, LOCIÓN Y GEL.....	85
4.5	EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i>	86
4.5.1	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	86
4.5.2	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	90

4.5.3	Análisis estadístico de resultados	95
CAPÍTULO 5	113
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	113
5.1	CONCLUSIONES	113
5.2	RECOMENDACIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Capas de la piel.....	6
Figura N° 2 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	24
Figura N° 3 Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	26
Figura N° 4 Procedimiento de siembra en placa por homogenización.....	55
Figura N° 5 Procedimiento de siembra en placa por estriado	56
Figura N° 6 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	62
Figura N° 7 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	63
Figura N° 8 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	63
Figura N° 9 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	66
Figura N° 10 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	67
Figura N° 11 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	68
Figura N° 12 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	71
Figura N° 13 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	72
Figura N° 14 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	72
Figura N° 15 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	75
Figura N° 16 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	76
Figura N° 17 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearereth21 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	76
Figura N° 18 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto para formulaciones en gel y lociones de quitosano Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	81
Figura N° 19 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto formulaciones en gel y lociones de quitosano Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	83
Figura N° 21 Comparación de formulaciones de cremas y lociones de Marco (<i>Ambrosia arborescense</i> Mill) versus clotrimazol	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Valores de HLB en función del tipo de emulsión	15
Tabla 2 Materias primas utilizadas en la formulación cosmética del presente trabajo de investigación	17
Tabla 3 Clasificación de las Micosis.	30
Tabla 4 Clasificación de los antifúngicos por su estructura	34
Tabla 5 Valores de HLB para las diferentes materias primas utilizadas en el presente estudio	43
Tabla 6 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Steareth 21	44
Tabla 7 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Tween 80	45
Tabla 8 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Alcohol cetílico	45
Tabla 9 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Alcohol estearílico	46
Tabla 10 Formulación de geles con los principios activos objetos de estudio	47
Tabla 11 Formulación de lociones con los principios activos objetos de estudio	48
Tabla 12 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Tween 80 y Steareth2+Steareth 21 Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	61
Tabla 13 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT	64
Tabla 14 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	65
Tabla 15 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT	68
Tabla 16 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Tween 80 y Steareth2+Steareth 21 Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	70
Tabla 17 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT	73
Tabla 18 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	74
Tabla 19 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT	77
Tabla 20 Composición de fórmulas estables para extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	78
Tabla 21 Composición de fórmulas estables para Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	79
Tabla 22 Composición de fórmulas estables para extracto blando de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	80
Tabla 23 Composición de fórmulas estables para aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	80
Tabla 24 Matriz experimental de Diseño Factorial completo de dos factores para <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco).....	81
Tabla 25 Análisis de varianza para Δ pH en formulaciones de Marco.....	82
Tabla 26 Matriz experimental de Diseño Factorial completo de dos factores para Aceite Esencial <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	82
Tabla 27 Análisis de varianza para Δ pH en formulaciones de Matico	83
Tabla 28 Composición de fórmulas estables para extracto blando de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	84
Tabla 29 Composición de fórmulas estables para Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	85
Tabla 30 Composición de fórmulas estables para extracto blando de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	85
Tabla 31 Composición de fórmulas estables para Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	86
Tabla 32 Halos de inhibición de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533 en formulaciones de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	86
Tabla 33 Halos de inhibición de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188 en formulaciones de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	88
Tabla 34 Halos de inhibición de <i>Microsporumcanis</i> ATCC 36299 en formulaciones de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	89

Tabla 35 Halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en formulaciones de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	90
Tabla 36 Halos de inhibición de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533 en formulaciones de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	91
Tabla 37 Halos de inhibición de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188 en formulaciones de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	92
Tabla 38 Halos de inhibición de <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299 en formulaciones de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam).....	93
Tabla 39 Halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en formulaciones de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	94
Tabla 40 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Trichophyton mengagrophytes</i>	96
Tabla 41 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Trichophyton mengagrophytes</i>	96
Tabla 42 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Trichophyton mengagrophytes</i>	97
Tabla 43 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Trichophyton mengagrophytes</i>	97
Tabla 44 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Trichophyton mengagrophytes</i>	98
Tabla 45 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Trichophyton mengagrophytes</i>	98
Tabla 46 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	99
Tabla 47 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	100
Tabla 48 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	100
Tabla 49 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	101
Tabla 50 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	101
Tabla 51 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	102
Tabla 52 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Microsporum canis</i>	103
Tabla 53 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Microsporum canis</i>	103
Tabla 54 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Microsporum canis</i>	104
Tabla 55 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Microsporum canis</i>	104
Tabla 56 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Microsporum canis</i>	105
Tabla 57 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) frente a <i>Microsporum canis</i>	105
Tabla 58 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Candida albicans</i>	106

Tabla 59 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Candida albicans</i>	107
Tabla 60 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) frente a <i>Candida albicans</i>	107
Tabla 61 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)de frente a <i>Candida albicans</i>	108
Tabla 62 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)de frente a <i>Candida albicans</i>	108
Tabla 63 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)de frente a <i>Candida albicans</i>	109
Tabla 64 Resumen del test estadístico de Kruskal-Wallis para las diferentes formulaciones.	109

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	Fórmula de determinación del grado de desacetilación del quitosano.....	42
Ecuación 2	Fórmula de cálculo para realizar las diferentes diluciones	43
Ecuación 3	Cálculo del componente A de la pareja de emulsificantes.....	44
Ecuación 4	Cálculo del componente B de la pareja de emulsificantes	44
Ecuación 5	Fórmula para cálculo del volumen en función de la altura	50
Ecuación 6	Determinación del número de esporas por mL	53
Ecuación 7	Determinación del número total de esporas.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Características de extracto blando de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) y aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) obtenidos por Ayala-Vásquez	124
Anexo 2 Características del quitosano obtenido por Dávila-Pazos	125
Anexo 3 Certificado de Herbario Nacional de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) de la especie utilizada por Ayala-Vásquez para obtener el activo utilizado en este estudio	126
Anexo 4 Certificado de Herbario Nacional de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam) de la especie utilizada por Ayala-Vásquez para obtener el activo utilizado en este estudio	127
Anexo 5 Imágenes de la formulación de algunas cremas de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill) y Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	128
Anexo 6 Imágenes de algunas placas en las que no se muestra inhibición	131
Anexo 7 Imágenes de placas Petri en las que se muestra inhibición de <i>Candida albicans</i> y <i>Microsporum canis</i>	132

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite Esencial.
°C	Grados Celsius.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
CPS	Cantidad suficiente para.
D	Densidad.
DMSO	Dimetil sulfóxido
g	Gramos
H.L.B.	Hydrophilic-Lipofilic-Balance
INCI	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos.
λ	Longitud de Onda
mm	Milímetros.
mL	Mililitros.
MR	Formulaciones con Marco
MT	Formulaciones con matico
mμ	Microlitro
N°	Número
O/W	Aceite/ agua
%	Porcentaje
pH	Potencial Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto.
UFC	Unidad formadora de colonias.
UV	Ultravioleta.
T	Temperatura
TSA	Tryptic Soy Agar.
TSB	Tryptic Soy Broth.
μl	Microlitros.
W/O	Agua / aceite

GLOSARIO

Activo cosmético: Ingrediente cosmético que en la formulación es responsable al menos de una determinada acción del producto cosmético.

Aceite esencial: Esencia aromática procedente de una planta. Posee un olor agradable y volátil. Se puede inhalar, ingerir, aplicar sobre la piel mediante masajes o mezclar en el agua del baño. Se utiliza en cosmética como suavizante, regenerante o tonificante. Está compuesto por ésteres, acetonas, aldehídos y alcoholes.

Antifúngicas: Toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

Conservadores: Sustancias que evitan el crecimiento de microorganismos

Dermatomicosis: Infecciones de la piel causadas por hongos

Dermis: Capa que da elasticidad y fuerza a la piel. Limita con la capa o estrato basal de la epidermis y la hipodermis. Está constituida principalmente por fibras elásticas y colágeno.

Dispersabilidad: También conocida como solubilidad, es la propiedad de las emulsiones determinada por la fase continua, si la fase continua es hidrosoluble, la emulsión puede ser diluida con agua, si la fase continua es oleosoluble, la emulsión se puede disolver en aceite.

Emulsión: Sistema de dos fases que consiste en la mezcla de dos líquidos completamente inmiscibles, donde existe uno disperso como infinitos glóbulos en otro, los cuales no forman un sistema homogéneo, requiriendo el uso de un vehículo emulsionante, para formar una dispersión estable.

Emulsión Aceite-Agua (O/W): Emulsiones en donde la fase dispersa es el aceite

Emulsión Agua- Aceite (W/O): Emulsiones en donde la fase dispersa es el agua

Emulsionante: Sustancias que ayudan a estabilizar la emulsión y evitan que ésta se separe.

Epidermis: Parte exterior del cuerpo que se halla en estrecho contacto con el entorno.

Estabilidad: Capacidad que tiene un producto o un principio activo de mantener determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad

establecidas, o las propiedades iniciales. Se refiere a la no coalescencia de las partículas de la emulsión y la no sedimentación.

Estrato corneo: Protección y barrera casi impermeable, tanto a nivel de penetración como expulsión. Formado células epiteliales queratinizadas lo que le confiere una elasticidad.

Forma Cosmética: Es la presentación individualizada de un producto cosmético listo para su empleo.

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.

Hipodermis: Capa más profunda de la piel. Sus células conjuntivas forman el tejido conjuntivo que sirve de conexión con otros tejidos o sirve para sostener determinados órganos.

In vitro: (latín: *dentro del vidrio*), se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Lipofílica - Lipófila: Comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos

pH de la piel: Determinado por la emulsión epicutánea o manto hidrolipídico formado por una fase acuosa proveniente del agua de las glándulas sudoríparas sebáceas.

Reología: Estudio de los principios físicos que regulan el movimiento de los fluidos.

Solubilidad: Capacidad de una sustancia o un cuerpo para disolverse al mezclarse con un líquido.

Surfactante: Son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases.

Tensoactivos: Sustancias que disminuyen la tensión superficial de una emulsión. De acuerdo al carácter químico pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos o anfotéricos.

Viscosidad: Propiedad establecido como la oposición de un fluido a las deformaciones tangenciales. Es la principal característica de los sistemas emulsionados.

RESUMEN

Las industrias del sector farmacéutico y cosmético en Ecuador se encuentran en crecimiento especialmente en la categoría de productos naturales, lo que ha impulsado la investigación de actividad de ingredientes naturales Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) en formulaciones con posible actividad antifúngica probada *in vitro* sobre los principales hongos causantes de dermatomicosis.

Se ensayaron formulaciones en: crema, loción y gel, bajo dos diseños experimentales. El primer diseño estadístico, Placket-Burmann para cremas, considerando variables: Concentración de fase oleosa, Concentración de activo, Tipo de emulsificantes, Concentración de emulsificante y Concentración de quitosano, la estabilidad preliminar evaluó el volumen de coalescencia versus el volumen total de cada fórmula. Obteniéndose un total de 10 formulaciones estables para Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y 15 formulaciones estables para Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), siendo clara la relación de quitosano con la estabilidad de la fórmula. El segundo diseño estadístico, Factorial completo se aplica para lociones y geles con las siguientes variables: Tipo de formulación y concentración del activo, se evalúa estabilidad preliminar en función de variación de pH. Teniéndose un total de 4 formulaciones estables para Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y 4 formulaciones estables para Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam). En las cuales no se evidencia estadísticamente a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ que influya el tipo de formulación (loción y gel) ni la concentración del activo.

La evaluación antifúngica *in vitro* se realiza sobre las formulaciones estables, frente a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231 mediante el método modificado de Kirby-Bauer, el estudio determina que al menos una de las formulaciones presentó actividad antifúngica, análisis que fue llevado a cabo con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ utilizando el Test de Kruskal-Wallis. Teniéndose que las formulaciones de cremas y lociones que contienen 1% y 3% de extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) tienen actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Microsporum canis*. Para el caso de las formulaciones que contienen Matico

(*Aristeguietia glutinosa* Lam) se tiene respuesta antifúngica frente a *Candida albicans* sólo en concentraciones mayores al 10%.

Descriptores:Marco, *Ambrosia arborescens* Mill, Matico, *Aristeguietia glutinosa* Lam, antifúngico, quitosano, fórmulas cosméticas, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*

ABSTRACT

The pharmaceutical and cosmetic industries in Ecuador are interested in developing natural products, for that reason in this study was considered the evaluation of antifungal activity *in vitro* of natural ingredients as Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) and Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) in cosmetic formulations.

Three types of cosmetic formulation were considered: cream, lotion, gel, via two experimental designs for analyzing the preliminary stability before of the evaluation of antifungal activity *in vitro*. The first statistical design (Plackett-Burmann) for creams which considerate variables like Concentration of oil phase, Concentration of active, Type of emulsifiers, Concentration of emulsifiers and Concentration of chitosan, for the evaluation of stability, response was coalescence volume. Obtaining a total of ten stable formulations for *Ambrosia arborescens* Mill and fifteen stable formulations for *Aristeguietia glutinosa* Lam, being chitosan the main factor for stability. The second statistical design, Full Factorial applied for lotions and gels with the following variables: Type of formulation and Concentration of active, preliminary stability is evaluated in terms of variation of pH. Obtaining a total of four stable formulations for *Ambrosia arborescens* Mill and four stable formulations for *Aristeguietia glutinosa* Lam.

Antifungal evaluation *in vitro* is performed on the stable formulations, with *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299 and *Candida albicans* ATCC 10231, using the modified Kirby-Bauer method, the study determined that at least one formulation show antifungal activity, data analysis was performed with Kruskal-Wallis test, significance level $\alpha = 0.05$. The results showed that formulations of lotions and creams which contain 1% and 3% extract of *Ambrosia arborescens* Mill have antifungal activity on *Candida albicans* and *Microsporum canis*. In the case of formulations which contain *Aristeguietia glutinosa* Lam have antifungal activity on *Candida albicans* at concentrations above 10%.

Keywords: Marco, *Ambrosia arborescens* Mill, Matico, *Aristeguietia glutinosa* Lam, antifungal, chitosan, cosmetic formulations, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La eficiencia de tratamientos tópicos antimicóticos depende de la penetración que tienen los principios activos en el tejido. Debiendo ser determinados los niveles de concentración óptimos bajo los cuales hace efecto el principio activo. En la administración tópica, el principio activo debe ser capaz de pasar a través del estrato córneo que es la capa más externa de la piel hasta llegar a la epidermis viable. Es así, que la formulación desempeña un papel clave en la penetración de dichos principios en la piel. (SIVGE, 2013)

Estos métodos alternativos pueden ser basados también en principios activos endémicos, conociendo que la herbolaria ecuatoriana y latinoamericana han realizado importantes contribuciones al desarrollo de la medicina científica y por ende a la salud humana, ya que en nuestro país existen alrededor de 35000 especies que tienen interés médico y potencial terapéutico para elaboración de nuevos productos; cerca del 30 % de la población ecuatoriana esta desprotegida de medicina, por esta razón la Asamblea Mundial de Salud recomendó aprovechar lo positivo y beneficioso de la medicina tradicional.(NARANJO, 2010).

1.2 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Las lesiones de la piel más estudiadas están relacionadas con diferentes formas de dermatitis, alergias de la piel, acné e infecciones bacterianas de la piel, varias de las plantas medicinales,

aceites esenciales o extractos naturales obtenidos de las mismas presentan relación con dichas enfermedades ya que poseen actividad curativa sobre estas patologías (CENIVAM, 2008)

Los hongos productores de micosis superficiales son oportunistas y son mayormente susceptibles los pacientes diabéticos, pacientes con SIDA, cáncer o cualquier otra afección debilitante o crónica. A nivel mundial, se indica una prevalencia de 5% a 10% de micosis por *Candida albicans* en los servicios de dermatología. Otras especies aisladas con mayor frecuencia son tinea corporis y tinea capitis, los siguientes hongos: *Microsporium canis* (9%), *Trichophyton mentagrophytes* (8,8%), *Trichophyton rubrum* (8,6%). En nuestro país las infecciones dérmicas no es un tema tratado con todo el interés que este lo requiere, es así que dichas infecciones han proliferado rápidamente apareciendo entonces cuadros graves de dermatomicosis en diabéticos(VILLARES, 2012).

El medicamento más utilizado para lesiones es Clotrimazol (compuesto derivado de la familia de los imidazoles) comúnmente usado para el tratamiento de infecciones por levaduras, candidiasis oral, y dermatofitosis (tiña). También se utiliza para tratar el pie de atleta y tinea corporis. (FDA, 2011). Es un agente antifúngico de amplio espectro. *In vitro* el Clotrimazol exhibe actividad fungistática y fungicida contra especies aisladas de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis*.

Entre los efectos secundarios del uso de este medicamento están el eritema, picazón, ampollas, peladuras, edema, prurito, urticaria y en general irritación de la piel. Sensación de quemadura, irritación, sequedad, picazón, foliculitis, erupciones acneiformes, hipopigmentación, dermatitis perioral, dermatitis de contacto alérgica, maceración de la piel, infección secundaria, atrofia de la piel, estrías y miliria. No se recomienda su aplicación durante el embarazo, por lo que lo que se busca es dar una alternativa para evitar estas lesiones.(VADEMECUM, 2009)

Afortunadamente en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar mayor interés por los productos naturales, orgánicos y ecológicos, se ha

intensificado nuestras afecciones. (HERNANDEZ, 2011). Las propiedades antimicrobianas o antifúngicas de plantas medicinales pueden ser aprovechadas para tratar aquellas afecciones de la piel.

Ambrosia arborescens Mill (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* Lam (Matico) pertenecen a la familia de las Asteraceae, que se caracterizan por ser plantas aromáticas, con propiedades medicinales. Estas dos especies reportan varios estudios sobre su actividad, entre ellas: “Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae”(ZAPATA, DURAN, STASHENKO, BETANCUR-GALVIS, & MESA, 2010)en una formulación cosmética(IBARRA & PAREDES, 2013).Estudios que constituyen la base de la presente investigación, la misma que se enfoca en algunos de los hongos patógenos causantes de dermatomicosis.

Las industrias del sector farmacéutico y cosmético en Ecuador se encuentran en auge de crecimiento y contribuyen enormemente al desarrollo del país tanto en la transformación de materias primas como en la manufactura de productos terminados, diversificando así la oferta internacional y de este modo beneficiando a los actores de la economía popular y solidaria (PROECUADOR, 2012). Contando con 62 empresas relacionadas con varias etapas de la industrialización de las plantas medicinales en la región andina, de los cuales 42% se concentra en la producción de medicamentos a base de plantas, el otro 42% en la agricultura, la recolección y procesamiento(GRUPTA, 2006)

Estos precedentes impulsan el desarrollo de nuevos productos con materia prima endémica y habiendo sido ya evaluada actividad antifúngica de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) (AYALA & VÁSQUEZ, 2014), se pretende en este estudio ensayar dicha actividad *in vitro* en el desarrollo de fórmulas cosméticas que los contengan.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de emulsiones elaboradas con Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis.

Objetivos específicos

- Desarrollar formulaciones de cremas en base al diseño experimental Plackett-Burman cuyas variables son el tipo y concentración de extracto y/o aceite Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), concentración de base lipofílica, concentración de emulsificante, tipo de parejas de emulsificantes y concentración de quitosano.
- Desarrollar formulaciones en forma de loción y gel en base al diseño experimental factorial cuyos variantes son el tipo y concentración de extracto y/o aceite Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), y tipo de formulación.
- Determinar la estabilidad preliminar de las formulaciones desarrolladas de acuerdo a los diseños experimentales definidos
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de formulaciones cuya estabilidad preliminar sea aceptada, frente a los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporium canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231.

1.4 HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa (Ha)

Entre las formulaciones elaboradas con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) y extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) al menos una de ellas presentará actividad antifúngica *in vitro*.

Hipótesis nula (Ho)

Las formulaciones elaboradas con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) y extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) no presentan actividad antifúngica *in vitro*.

CAPÍTULO 2

2 MARCO TEÓRICO

2.1 LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo, tiene una superficie de aproximadamente 2 m^2 . Junto con sus derivados (cabello, uñas, sudor glándulas sebáceas) conforman el sistema intergumentario. Protege a los órganos internos del mundo exterior y al mismo tiempo constituye un enlace entre ellos. (UNIVERSITY OF MARYLAND MEDICAL CENTER, 2013)

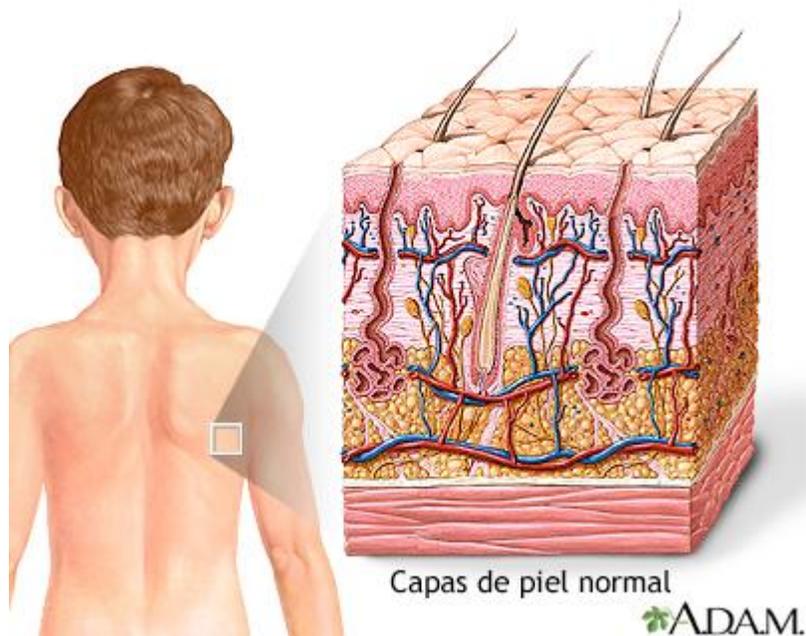


Figura N° 1 Capas de la piel

2.1.1 Funciones de la piel

Las principales funciones son las siguientes:

- Protección del cuerpo de factores externos tales como las bacterias, los químicos, la temperatura y de los rayos ultravioleta.
- Impide la pérdida de humores corporales.
- Como órgano sensorial y mediante la presencia de terminaciones nerviosas independientes y de receptores especiales, la piel posibilita la percepción y localización de estímulos mecánicos como la presión, el roce y la vibración así como también la temperatura y el dolor.
- Almacena tejido adiposo en toda la hipodermis, el cual cumple una función aislante y modeladora y en caso de necesidad puede servir como fuente de energía al organismo humano. (NEBRASKA MEDICINE, 2011)

2.1.2 Constitución de la piel

Desde exterior hacia el interior la piel está constituida por tres capas de tejidos y cada una de ellas desempeña funciones específicas:

- epidermis,
- la dermis o corion
- capa grasa subcutánea, hipodermis o subcutis.

2.1.2.1 La epidermis

Constituye la parte más externa de la piel y recubre todo el cuerpo. Consta de varias capas, siendo la más profunda el estrato basal o germinal que está compuesto de queratinocitos que recibe esta denominación debido a su capacidad para llevar a cabo la síntesis de la queratina que es proteína estructural insoluble con una gran resistencia a las altas temperaturas y al pH. Los queratinocitos son responsables de la división celular (mitosis) y continua regeneración de la epidermis.

Otra capa de la epidermis es el estrato espinoso, constituido por varias capas de células cuboidales firmemente unidas entre sí por medio de puentes celulares (desmosomas), que son los que confieren a las células su apariencia espinosa y entre los cuales se almacena agua. Estas células sintetizan la queratina.

Más superficial se encuentra el estrato granular, compuesto por 3 a 5 capas de células con gránulos con proteínas en su interior.

La parte más externa de la epidermis se denomina estrato córneo, está formado células epiteliales queratinizadas sin vida que ya no tiene núcleo y están deshidratadas. Sus células están aplastadas y reducidas a laminillas. Está impregnada de sustancia grasa, que confiere a esta capa queratinizada una elasticidad que le permite oponerse a la evaporación. La capa córnea es una protección, una barrera casi impermeable, tanto a nivel de penetración como expulsión. La estructura general del estrato córneo, simula una pandereta de ladrillos, siendo los ladrillos los queratinocitos y el cemento los lípidos extracelulares. Existen varios tipos de lípidos, como colesterol o ceramidas y la correcta función parece depender de una proporción adecuada. El uso de jabones comunes remueve los lípidos de la piel, disminuyendo su función de barrera, reseándola. El estrato córneo es más delgado en los párpados y genitales y más grueso en las plantas de los pies y palmas de las manos (donde se denomina estrato lucido (AESTHETIC MEDICAL GROUP, 2009)

La epidermis se encuentra en constante recambio, reemplazándose por completo en 3 a 4 semanas.

Otras unidades funcionales de la epidermis de gran importancia son las células de Langerhans (esenciales para la inmunorreacción de la piel), las células sensoriales de Merkel y los melanocitos. Estos últimos elaboran y almacenan la melanina, sustancia que da color a la piel.

La cantidad y distribución de la melanina son los factores causantes de las diferentes pigmentaciones de la piel y de los cabellos. Cuando la piel se encuentra expuesta a la radiación solar, en los melanocitos se produce una reacción de defensa contra los rayos UV aumentando

síntesis de la melanina, la cual manifiesta sus efectos sobre la piel a través del conocido “bronceado solar”. (HARTMANN, 1999)

2.1.2.2 La Dermis

La dermis es la capa de tejido conectivo inmediatamente subyacente a la epidermis. Es pobre en células y rica en matriz extracelular (conjunto de proteínas y proteoglicanos que rodean a las células). Es un tejido resistente y elástico que actúa de almohadilla del cuerpo frente a lesiones mecánicas, y proporciona nutrientes a la epidermis y apéndices cutáneos. Se divide en dermis papilar, adyacente a la epidermis, rica en vasos sanguíneos y con mayor cantidad de células, y en la dermis reticular o corión más profunda y rica en fibras. En la dermis existen glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, terminales nerviosos, vasos linfáticos y sanguíneos y folículos pilosos. (WILKINSON, 2008)

Las Funciones de la dermis son asegurar la nutrición de la epidermis gracias a su red sanguínea y linfática y proporcionar la solidez mecánica del revestimiento cutáneo. Es debido a estas funciones que todo tratamiento estético, para que sea efectivo debe penetrar hasta la dermis, tanto para alimentar como para estimular. (PALENCIA, 2008)

2.1.2.3 La Hipodermis

También conocida como tejido subcutáneo, es la capa más profunda de la piel. Sus células conjuntivas forman el tejido conjuntivo que sirve de conexión con otros tejidos o sirve para sostener determinados órganos. Está formada por tejido adiposo, especializada en la reserva de grasas. La capa de grasa actúa como aislante térmico, ayudando a conservar el calor corporal. Las funciones de la hipodermis son proteger el organismo de agresiones exteriores, proteger el organismo de posibles traumatismos moderados, proteger el organismo contra la pérdida de calor, estéticamente es la encargada de dar textura a la piel. Cuando la hipodermis se encuentra en mal estado la piel forma pliegues y se afloja. (GENOMA SUR, 2013)

2.2 FORMULACIONES COSMÉTICAS

Las formulaciones cosméticas tienen como función principal cumplir con las expectativas del consumidor, sean éstas, de limpieza para eliminar polvo, suciedad, sebo y otras secreciones, células muertas, depósitos y maquillaje aplicado o de protección de agresores externos como rayos UV, modificación de ciertas propiedades y funciones de los tejidos corporales, evitar el desecamiento de las capas superficiales de la epidermis, y/o introducir sustancias activas al interior de la epidermis, todo esto con la finalidad de mejorar la estética de los usuarios. Las formulaciones cosméticas no son medicamentos, su función no es curar, pero pueden ser coadyuvantes de un tratamiento al disminuir los síntomas como mejorar la apariencia, quitar picazón, etc. Existe una gran cantidad de formulaciones cosméticas, dependiendo de su función, viscosidad, forma de aplicación, composición química, se clasifican en cremas, lociones, suspensiones, geles, polvos. (MARTINEZ, 2012) (WILKINSON, 2008)

2.2.1 Cremas

Son preparaciones cosméticas de consistencia pastosa, semisólida, están constituidas generalmente por agua y aceites de origen vegetal. Los principios activos que se añadan son los que diferencian el uso y aplicación, así se puede mencionar cremas que forman una capa protectora que impide la pérdida de humedad natural de la piel, otras funciones puede ser controlar el exceso de grasa, disminuir las líneas de expresión, etc. (MARTINEZ, 2012)

2.2.2 Lociones

Son formas cosméticas líquidas formadas por un excipiente o un grupo de excipientes mezclados entre sí y en los que tanto los principios activos como los aditivos y correctores se encuentran perfectamente disueltos. Pueden estar constituidas por agua y alcoholes, polioles en los cuales se disuelven los principios activos (ejemplo perfumes) o también pueden ser a base de aceites o grasas de baja densidad (ejemplo brillantinas). (MARTINEZ, 2012)

2.2.3 Suspensiones

Son formas cosméticas en las que parte de sus componentes se encuentran en estado sólido, dispersas dentro de un excipiente líquido. Para evitar que las partículas de polvo se depositen en el fondo del recipiente o a floten sobre la superficie (según la densidad), se suelen usar espesantes, que hagan al excipiente más viscoso y dificulten el movimiento de las partículas sólidas en su interior. (MARTINEZ, 2012)

2.2.4 Geles

Son un tipo particular de suspensión en la cual el sólido suspendido se encarga de aumentar la viscosidad del excipiente hasta transformarlo en un líquido denso, un semisólido o incluso un sólido.

Son sistemas dispersos, por lo general transparentes o translucidos, formados por líquidos (hidrófilos o hidrófobos) a los que se adicionan sustancias de naturaleza coloidal capaces de formar una estructura continua, cuya naturaleza y características definen las propiedades reológicas del conjunto. (MARTINEZ, 2012)

2.3 EMULSIONES

Las 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. Constituyen la forma cosmética más común y de mayor aceptación por parte del consumidor (OLMO, 1995),

2.3.1 Ventajas de las emulsiones

De acuerdo a Ponce, 2014 se tienen las siguientes ventajas al formular emulsiones (PONCE, 2014):

- Compatibilización física de componentes.
- Control de las características físicas.
- Facilita la aplicación y manejo de compuestos.

- Incrementa la aceptación de compuestos.
- Incrementa la permanencia de perfumes y aromas.
- Incrementa la seguridad del manejo de elementos.
- Aspectos económicos.

2.3.2 Tipos de emulsiones

Las emulsiones que se utilizan en cosmética consisten en una fase acuosa polar y una fase oleosa no polar, en donde la fase dispersa, discontinua o interna es el líquido desintegrado en glóbulos y el líquido circundante es la fase continua o externa, según estas fases se forman emulsiones aceite en agua (O/W), cuando la fase dispersa es el aceite, y, emulsiones agua en aceite (W/O), en donde se da el caso contrario. (PARUTA, 2008)

2.3.2.1 Emulsión O/W

En esta forma de emulsión, las gotitas oleosas de la preparación se sitúan dentro de la fase acuosa. Estas emulsiones se absorben rápidamente en la piel, no dejan residuos grasos, se extienden sobre la piel, la parte acuosa se evapora generando un efecto refrescante. La fase oleosa interna hidrata y engrasa la piel. Ejemplo de este tipo de emulsiones son las cremas limpiadoras, humectantes, y para el cuidado diario normal. (PARUTA, 2008)

2.3.2.2 Emulsión W/O (agua en aceite)

En éstas, la fase interna consiste en gotitas de agua rodeadas por la fase oleosa. Las emulsiones agua en aceite no se absorben con tanta rapidez en la piel. Forman una película oleosa protectora (efecto oclusivo) que reduce la pérdida transepidérmica de agua (TEWL). Garantizan una intensa hidratación cutánea y generan un cociente aceite/humedad equilibrado. En función de estas características, las emulsiones agua en aceite son muy eficaces en el tratamiento de procesos cutáneos secos. Son adecuadas para liberar principios activos en la piel y no pueden ser lavadas con agua sola. (PARUTA, 2008)

2.3.2.3 Emulsión W/OW (agua en aceite en agua):

A más de las emulsiones agua en aceite (W/O) y aceite en agua (O/W), existen las emulsiones agua en aceite en agua (W/O/W) son emulsiones múltiples, en las que gotitas de aceite que contienen gotitas de agua se dispersan en una fase acuosa contigua; (PARUTA, 2008)

2.3.3 Componentes de las emulsiones cosméticas

2.3.3.1 Fase acuosa (WILKINSON, 2008)

Constituida en su mayor parte por agua, la cual debe tener un bajo contenido de minerales, por esta razón es que debe usarse agua desionizada y microbiológicamente pura, para evitar inconvenientes de desestabilización de las fórmulas. Por lo general, en esta fase suelen ser incorporados agentes humectantes (glicerina, propilenglicol, etc.), coloides hidrófilos que dificultan los fenómenos de coalescencia, aportando estabilidad a las emulsiones o/w (derivados de celulosa, gomas, carbómeros, quitosano, etc.). (DEL POZO, JUVÉ, & VISCASILLAS, 2007)

2.3.3.2 Fase oleosa (DEL POZO, JUVÉ, & VISCASILLAS, 2007) (GODOY, SALINAS, & VELASCO, 1994)

En la mayoría de formulaciones se considera la adición de componentes de este tipo para producir un efecto emoliente, renovando la flexibilidad y suavidad de la piel.

Entre los posibles componentes de esta fase destacan los siguientes:

- Parafinas y vaselinas: actúan como diluyentes de componentes de naturaleza poco polar.
- Aceites vegetales: integrados en la formulación por sus propiedades emolientes y en algunos casos por propiedades cosméticas específicas.
- Ceras: incrementan notablemente la viscosidad de la fase oleosa, confieren brillo en cremas y mejoran el sensorial de aplicación.
- Alcoholes grasos: son agentes estabilizadores de las emulsiones que actúan como coemulgentes.

- Lanolina y derivados: por sus propiedades de emoliencia y lubricidad.
- Siliconas: modulan la oclusividad de los otros componentes de la fase oleosa.

2.3.3.3 Emulsionantes

Son considerados como una tercera fase de la emulsión y su función es estabilizar las emulsiones al proveer de una barrera física en la interfase que no sólo reduzca la probabilidad de su ruptura, sino que realmente prevenga que las gotitas se toquen unas con otras, al mismo tiempo que se hace más fácil la emulsificación al reducir la tensión superficial interfacial. Los principales emulsionantes son los tensoactivos que disminuyen la tensión superficial. (WILKINSON J. , 2008)

2.3.3.3.1 Clasificación de los agentes emulsificantes: (GODOY, SALINAS, & VELASCO, 1994)

- **Aniónicos:** son aquellos que se caracterizan por poseer un grupo polar capaz de ionizarse en solución acuosa, adquiriendo una carga negativa.
- **Catiónicos:** se caracterizan por su grupo polar hidrofílico que se ioniza al disolverse en un medio acuoso, adquiriendo una carga positiva.
- **No iónicos:** son los más usados en Farmacia por ser más compatibles, de baja toxicidad y más estables, entre ellos tenemos los alcoholes de larga cadena, como el colesterol, derivados del sorbitán (span, tween).
- **Anfóteros:** se caracterizan por poseer un grupo polar hidrofílico y un grupo catiónico y aniónico como por ejemplo la lecitina.
- **Modificadores de la viscosidad:** Cuasi emulsionantes, pseudo emulgentes se usan únicamente en emulsiones de uso interno, para tener emulsiones líquidas-fluidas. Actúan a nivel de la interfase, pero no disminuyen la tensión superficial, solamente aumentan la viscosidad y coadyuvan a mantener la estabilidad del preparado, evitando que los glóbulos sedimenten, formando películas multimoleculares.(WILKINSON, 2008)

2.3.4 Sistema H.L.B.

El equilibrio hidrofílico- lipofílico es una propiedad importante del emulsionante puesto que determina el tipo de emulsión que se va a preparar. Atlas Chemical Company, ha ideado una escala lineal que permite que el equilibrio total de cada emulsionante se pueda expresar como un número sencillo: el número H.L.B. cuyas siglas significan Hydrophilic-Lipofilic-Balance, es el peso por ciento del contenido hidrófilo de la molécula dividido por un factor arbitrario de 5. Así, si un emulsionante no iónico fuese 100 por ciento hidrofílico, tendrá un valor HLB de $100/5$ o 20. Por tanto, la escala HLB se extiende (en teoría), desde 20 para una molécula totalmente hidrófila, hasta 0 para una totalmente lipófila. El valor HLB solo puede determinarse de este modo sencillo en los emulsionantes no iónicos. Para los emulsionantes aniónicos y catiónicos, el valor numérico es superior a 20. (WILKINSON, 2008)

De acuerdo al valor de HLB se define el tipo de emulsiones de la siguiente manera:

Tabla 1 Valores de HLB en función del tipo de emulsión

HLB	Tipo de emulsión/uso
1-3.5	Antiespumantes
4-6	Emulsificante (agua en aceite)
7-9	Humectante
8-18	Emulsificante (aceite en agua)
13-15	Detergente
15-18	Solubilizante

Fuente: Emulsiones Farmacéuticas, Prof. Abraham Vega (VEGA & MIRANDA, 2009)

2.4 CONSERVADORES

Se utilizan para evitar el crecimiento de microorganismos que pueden desarrollarse en los cosméticos porque en la mayoría de los casos el mayor componente es el agua que es un medio propenso para su desarrollo. Además se debe considerar que los cosméticos están expuestos a agentes contaminantes durante su uso, como son el medio ambiente y el propio consumidor.

Si un cosmético no tiene suficiente cantidad de conservantes, los microorganismos se multiplicarían en gran número y el producto sufriría un deterioro que puede manifestarse

como separación de fases de la emulsión, presencia de moho, pérdida de viscosidad, cambios de olor o color, enranciamiento, aparición de tinciones, etc.

Otros conservantes muy utilizados en cosmética son los derivados de parabenos, triclosán, Metilcloroisotiazolinona y Metilisotiazolinona (Khatón CG). (BALDRICH, 2012)

2.5 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad antifúngica *in vitro* utilizando las concentraciones de principio activo definidos en el estudio de Ayala y Vásquez en 2014, aplicándolas en fórmulas cosméticas. Por este motivo, es que las formulaciones de esta investigación son básicas en lo que se refiere al contenido de componentes que mejoren propiedades sensoriales y se prescinde del uso de conservantes, justamente para evitar falsos positivos y evidenciar la actividad antifúngica de estos activos cuando están presentes en una formulación cosmética.

Una vez comprobadas las hipótesis de este trabajo, es posible mejorar las propiedades sensoriales y conservantes de fórmulas cuyo fin sea la producción en gran escala.

Uno de los criterios de selección de las materias primas, fue la disponibilidad de ellas en el mercado nacional para el caso de los componentes de la fase oleosa.

Se considera también la selección de la materia prima quitosano, la cual fue obtenida en esta investigación por procesos de hidrólisis ácida y alcalina a partir de caparzones de camarón de acuerdo al procedimiento de extracción de quitina y desacetilación de la misma, presentado en la tesis de Dávila en 2010 (DÁVILA, 2010). El quitosano es considerado como un coloide hidrófilo, lo cual brinda propiedades de estabilización de formulaciones cosméticas. (KLINKESORNA, 2013). Además, se conoce que el quitosano tiene actividad antifúngica (PEÑA, SÁNCHEZ, & CALAHORRA, 2013), por lo que en la presente investigación son considerados blancos negativos que contienen este principio para poder evaluar la sinergia que tiene este, frente a los activos de este estudio y ver si puede repotenciarse la actividad en conjunto de estos en las formulaciones.

La utilización de parejas de emulsificantes en esta investigación, fue considerada en función de la disponibilidad de ellos en el mercado, además de que la mezcla de los diferentes emulsificantes ofrece una alternativa de formulación cuando no se tiene uno con el valor deseado de HLB para un sistema particular. Por esta razón, es que se seleccionaron parejas de emulsificantes cuyo HLB se encuentre entre 8-10, para asegurar de este modo una adecuada emulsificación o/w.

Tabla 2 Materias primas utilizadas en la formulación cosmética del presente trabajo de investigación

Cremas	Geles	Lociones
Chitosan (Quitosano)	Carbomer (Carbopol 980)	Chitosan (Quitosano)
Cetyl alcohol (Alcohol cetílico)		
Lanoline (Lanolina)	Dimethicone (Dimeticona)	
Lactic acid (Ácido láctico)		
Paraffinum liquidum (Aceite de vaselina)		
Polysorbate 80 (TWEEN 80)		
Propylene glycol (Propilenglicol)	Propylene glycol (Propilenglicol)	Lactic acid (Ácido láctico)
Steareth-2		
Steareth-21		
Stearic acid	Triethanolamine (Trietanolamina)	
Stearyl alcohol (Alcohol estearílico)		

Elaborado por: Las autoras

A continuación se encuentran detalladas las propiedades de las materias primas mencionadas ordenadas alfabéticamente de acuerdo a su nomenclatura INCI:

2.5.1 Carbomer

Nombre comercial: Carbopol

Carbomer es un término utilizado para una serie de polímeros principalmente a base de ácido acrílico. Los carbómeros se presentan en forma de polvo blanco, utilizados con frecuencia en formulaciones de geles en cosméticos y productos de cuidado personal. Los carbómeros se pueden encontrar en una amplia variedad de tipos de productos.

En su estructura molecular cuenta con gran cantidad de grupos carboxilo, propiedad que le permite aumentar su volumen en presencia de agua. Al disolverse en el agua, las moléculas de carbopol cambian su configuración e incrementan la viscosidad del líquido, dando lugar a la formación de un gel. Las reacciones de neutralización en medios acuosos permiten que el carbopol se hinche incrementando su volumen, simultáneamente que su viscosidad.(COSMETICS INFO, 2008)

2.5.2 Chitosan

Nombre comercial: Quitosano

Es un aminopolisacárido derivado del exoesqueleto de crustáceos, es considerado biorenovable, biodegradable, biocompatible, bioadhesivo y no tóxico. Estas propiedades hacen que sea un gran polímero natural valioso para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas. El quitosano y sus derivados tienen variadas aplicaciones en formulaciones cosméticas de cuidado de la piel, cuidado del cabello y productos de cuidado oral, ya que se le atribuyen propiedades de modificador reológico, de retención de humedad, liberador controlado de principios activos y estabilizante de emulsiones. (SHIGEIRO & KEIJI, 1991)

Además, al quitosano de bajo peso molecular y alto grado de desacetilación, se le atribuyen propiedades bactericidas y antifúngicas (PARK, KIM, & PARK, 2008).

Además de acuerdo a la literatura científica, recomiendan el uso de quitosano en formulaciones no sólo porque les aporta estabilidad, sino porque se menciona que este en la proporción adecuada junto con principios activos antimicóticos (clotrimazol, ketoconazol, etc.) puede repotenciar su actividad. (BHUPENDRA & PRAJAPATI, 2010)

Por esta razón es que es incorporado como parte de los componentes de las diferentes formulaciones, con la posibilidad de aumentar el efecto antifúngico de los activos naturales analizados.

2.5.3 Cetyl alcohol

Nombre comercial: Alcohol cetílico

También conocido como 1-hexadecanol o alcohol palmitilo, es un alcohol graso con la fórmula molecular $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{OH}$. Se utiliza para dar consistencia, emolencia y estabilidad a las emulsiones.

En la industria cosmética se usa como un opacificante en shampoo, o como un emoliente, emulsionante o agente espesante en la fabricación de cremas para la piel y lociones, proporciona una sensación suave y nutritiva. Está indicado para todo tipo de piel pero especialmente para pieles secas, ya que previene la deshidratación.

Se utiliza normalmente entre un 2 - 5% en combinación con otro emulsionante y se incorpora en la fase oleosa, en emulsiones de aceite en agua. (DAVIS, 2015)

2.5.4 Dimethicone

Nombre comercial: Dimeticona

Las dimeticonas y otras siliconas son inertes, hidrófobas aunque no grasas, y tienen una tensión superficial baja. Se usan en la preparación de barreras tópicas para la preparación de la piel contra irritantes solubles en agua.

En cosmética se usa:

- Como antiespumante, requiriéndose muy pequeñas cantidades.
- En preparados para la piel forma una película protectora no grasienta que resiste el agua y los irritantes transportados por ella, y sin embargo, permite la transpiración cutánea. Además posee propiedades emolientes y confiere propiedades de hidrorrepelencia.
- En preparados para el cabello, aporta lubricación, brillo, suavidad y resistencia a la humedad.

- En preparados antiperspirantes y desodorantes, disminuye el efecto blanqueante de las sales antiperspirantes, además de actuar como emoliente y lubricante. (ACOFARMA, 2010)

2.5.5 Lactic acid

Nombre comercial: Ácido láctico.

El ácido láctico es un alfa-hidroxiácido (AHA) que forma parte del Factor Hidratante Natural (NMF), y se utiliza en cosmética como hidratante, astringente y como renovador celular (el pH de mayor actividad se sitúa en 3.8). A dosis bajas es hidratante y astringente, y a dosis más elevadas produce un efecto "peeling" de renovación celular.

También se utiliza para llevar a pH fisiológico o corregir el pH de distintas formas cosméticas como champús, emulsiones, lociones jabonosas, geles, etc. (ACOFARMA, 2007)

2.5.6 Lanoline

Nombre comercial: Lanolina.

Es una cera natural producida por las glándulas sebáceas de algunos mamíferos, especialmente del ganado ovino, también llamada grasa lanar (cuando está en crudo), *Adeps Lanae*, cera de lana o grasa anhidra de la lana, se trata de una sustanciagrasa de textura similar a la de la vaselina, translúcida, cerúlea, untuosa, pegajosa y amarillenta, casi inodora en sus mejores calidades, que se derrite entre 36° y 41,5° C. Abunda en la lana del ganado ovino en general, pero suele obtenerse de la lana del cordero del género y especie *Ovisaries* (L).

Es un poderoso hidratante, emoliente y emulsificante agua/aceite (w/o). Actúa como humectante, suavizando y proporcionando textura a la piel. Aporta funcionalidad al producto terminado. Útil en productos para el cuidado de la piel, cabello, cosméticos color y jabones grado económico. (CRODA, 2014)

2.5.7 Paraffinum liquidum

Nombre comercial: Aceite de vaselina

Aceite altamente refinado de petróleo que consiste en una combinación compleja de hidrocarburos obtenida del tratamiento intensivo de una fracción de petróleo con ácido sulfúrico y óleum, o por hidrogenación, o por una combinación de hidrogenación y tratamiento con ácido.

Utilizado en la formulación de cosméticos por sus propiedades antiestáticas, emolientes y de protección de la piel. (COSING-COSMETICS, 2009)

2.5.8 Polysorbate 80

Nombre comercial: Tween 80

Es un surfactante no iónico y emulsificante utilizado en alimentos y cosméticos. Se le conoce también como Polisorbato80, PEG (80) sorbitánmonooleato, monooleato depolioxietilensorbitán. Peso específico: 1.07 (25°C), HLB (hidrófilo-lipófilo) Valor: 15.0

Ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones bioquímicas, incluyendo solubilización de las proteínas, aislamiento de núcleos de células, crecimiento de bacilos de tuberculosa, emulsionantes y dispersantes en productos de medicamentos y alimentos.(SIGMA ALDRICH, 2010)

2.5.9 Propylene glycol

Nombre comercial: Propilenglicol

Considerado como solvente para muchas sustancias químicas orgánicas insolubles en agua. Es un líquido claro, incoloro, ligeramente viscoso, totalmente miscible con agua.

Además entre sus aplicaciones es considerado como agente humectante, agente de acondicionador de la piel, solubilizante y estabilizador de espumas. (DOW CHEMICAL COMPANY, 2012)

2.5.10 Steareth-2

Nombre comercial: Steareth-2

Es un tensoactivo iónico suave. Posee propiedades humectantes, emulsionantes, solubilizantes, acondicionadores y agentes de acoplamiento. Se utilizan en diversos artículos de higiene personal y cosméticos tales como enjuagues en crema, acondicionadores, aceites de baño, cremas, lociones, desodorantes, antitranspirantes y productos para el afeitado. Es un emulsionante auxiliar O/W.

El HLB de 4.9. La concentración a utilizar es de 0.5 a 5 % (THE PERSONAL FORMULATOR, 2015)

2.5.11 Steareth-21

Nombre comercial: Steareth-21

Es un emulsionante no iónico para cremas y lociones cosméticas y farmacéuticas. Es un sólido blanco, con un tenue olor característico, y se presenta en pellets. Tiene propiedades humectantes, emulsionantes, solubilizantes, acondicionadores y agentes de acoplamiento.

Es un emulsionante primario O/W. HLB de 5.5. Se suele utilizar en un rango de concentraciones entre 0,5-5% (THE PERSONAL FORMULATOR, 2015)

2.5.12 Stearic acid

Nombre comercial: Ácido esteárico

El ácido esteárico posee propiedades emolientes y protectoras, impide la desecación de la capa córnea de la piel, y que se absorbe fácilmente a través de ésta.

Se utiliza como emulgente para la formación de cremas base, empleadas algunas veces como emulsiones evanescentes, parcialmente neutralizadas. (ACOFARMA, 2008)

2.5.13 Stearyl alcohol

Nombre comercial: Alcohol estearílico

(También conocido como octadecilalcohol o 1-octadecanol) es un compuesto orgánico con la fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{OH}$. Se clasifica como un alcohol graso. Tiene la forma de gránulos o copos blancos, que son insolubles en agua. Posee una amplia gama de usos como un ingrediente en lubricantes, resinas, perfumes y cosméticos. Se utiliza como un emoliente, emulsionante y espesante en ungüentos de diversos tipos, y es ampliamente utilizado como un recubrimiento del cabello en los shampoo y acondicionadores para el cabello. Tiene baja toxicidad. (CRODA, 2014)

2.5.14 Triethanolamine

Nombre comercial: Trietanolamina

Líquido claro, viscoso e incoloro, el cual forma emulsiones mediante la reducción de la tensión superficial de las sustancias a emulsionar de manera que los ingredientes solubles en agua y solubles en aceite se pueden mezclar juntos. También se utilizan para controlar el pH de cosméticos y productos de cuidado personal. (COSMETICS INFO, 2013)

2.6 PRINCIPIOS ACTIVOS ANTIFÚNGICOS

2.6.1 Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Figura N° 2 Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)



Fuente: Andrea Buestán y Ana Guaraca

Arbusto de una altura de 1 a 3m, presenta ramas grises, hojas aromáticas, opuestas de color verde brillante, con bordes dentados y envés claro. Las flores son tubulares, en espigas solitarias, de tonalidad fucsia y brácteas marrón oscuro. El fruto es de color negro y contiene una semilla pequeña oscura en su interior. Crece en la región interandina del Ecuador, entre 3000 a 3700m sobre nivel del mar.

Propiedades y usos

Tradicionalmente se le atribuyen propiedades variadas tales como: cicatrizante, en lavados antisépticos, en infusión sirve para evacuar cálculos biliares, para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio y en dolencias gastrointestinales, dolor de cabeza, además tiene propiedades astringentes, antireumáticas, antimicrobiales. (ACOSTA & SOLIS, 1992) (VALENCIA, PITMAN, LEÓN, & JORGENSEN, 2000)

Composición química

El componente activo más importante del matico es el tanino que se encuentra en una concentración del 5.7%, al cual se le atribuye las propiedades cicatrizantes. También contiene cumarinas, flavonoides, esteroides, alcaloides, triterpenos, saponinas y fenoles.(CRUZ, 2009)

En un estudio publicado en 2014, fueron identificados dos diterpenoides labdano de las partes aéreas de *Aristeguietia glutinosa* Lam a los cuales demuestran la inhibición de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial del parásito responsable de la enfermedad de Chagas y la inhibición de la biosíntesis de esteroides de la membrana de *T. curzi*. (VARELA, SERNA, TORRES, YALUFF, & OTROS, 2014)

Actividad farmacológica

El extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Aristeguietia glutinosa* Lam ha sido probado contra las bacterias (*B. subtilis* , *S. epidermidis* , *S. aureus* , *E. coli* ,*P. aeruginosa* , *K. pneumoniae* y *S. typhi*) y hongos (*T. rubrum* , y *M. canis*) mostrándose excelentes resultados de inhibición. (VARELA, SERNA, TORRES, YALUFF, & OTROS, 2014).

De acuerdo al estudio de Ayala, Vásquez en 2014 se evidencia la actividad antifúngica del aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) en un rango de concentraciones de 2-5%.

2.6.2 Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Figura N° 3 Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)



Fuente: Marco Ibarra y Erika Paredes

Es una especie nativa de la Cordillera de América del Sur y crece entre los 2.500 y 3.000 metros sobre el nivel de mar. Crece en toda la región interandina del Ecuador, sobre todo en la región central y norte.

Se trata de un arbusto de 0.50 a 1.50 m de altura, ramas imbricadas en la base, las superiores con cicatrices foliares, el cual presenta capítulos unisexuales, monoicos de flores submasculinas indeterminadas en número, todas hermafroditas, estériles y de flores femenina, 1- 4 apétalas. (CRUZ, 2009)

Propiedades y usos

En la Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador, De la Torre y Navarrete en 2008, hacen una recopilación de los principales usos que le dan a esta especie, entre ellos (DE LA TORRE & NAVARRETE, 2008):

- Utilizado como insecticida para eliminar pulgas, piojos, moscos y chinches de las viviendas en las poblaciones Kichwa de la Sierra Ecuatoriana.
- Para el tratamiento de hemorroides, retrasos de menstruación, reumatismos, disentería, dolores musculares y catarros sanguinolentos (Etnia no especificada en Carchi).

- Abortivo (Etnia no especificada en Pichincha).
- En el tratamiento de abscesos (etnia no especificada-Chimborazo).
- Planta macerada es utilizada como antimicótico (etnia no especificada-Tungurahua).

Composición Química

En los estudios químicos y biológicos realizados por Vera en 2008 de varios extractos de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill), se caracterizaron 5 sesquiterpen lactonas y 5 compuestos fenólicos: benzyl β -D-glucopyranoside 0.25%; 3,4,5,7-tetrahydroxy-3-6-8-trimethoxyflavone 4.5%; limocitrin 8.5%; salicylic acid 0.62% y p-hydroxyacetophenone 0.8% (VERA, 2008). En el estudio de Cruz en 2009, se determina la presencia de algunos alcaloides como psilostachina, damsina. (CRUZ, 2009)

Actividad Farmacológica

La psilostachina es activa frente a áfidos (*Macrosiphum euphorbiae*) y ácaros (*Tetranychus urticae*), mientras que la damsina muestra actividad antitumoral y moluscicida. (CRUZ, 2009)

En el estudio realizado por Ibarra y Paredes en 2013 se demuestra que el extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) inhibe el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* replicándose esta inhibición en una formulación de jabón líquido que contenía este activo. (IBARRA & PAREDES, 2013)

En el estudio realizado por Ayala y Vásquez en 2014 se demuestra que el extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill), inhibe el crecimiento de los hongos responsables de dermatomicosis: *Trichophyton mentragrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Candida albicans* en un rango de concentraciones de 300 a 700pm. Mientras que para el. (AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

2.7 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR HONGOS

Las micosis son infecciones producidas por hongos que tienen la capacidad de rebasar las barreras que utiliza el organismo para protegerse de las infecciones producidas por cualquier agente agresor como lo son la piel y las mucosas. En el caso de las micosis superficiales los agentes causan lesión por alteración de esta barrera (piel), o por mecanismos propios del agente como sus factores de patogenicidad. (BELEÑO, 2013)

2.7.1 Clasificación de las micosis superficiales

Las micosis superficiales según el agente etiológico se clasifican en:

- Micosis dermatofíticas
- Micosis no dermatofíticas

Las micosis producidas por dermatofitos se caracterizan por afectar la piel y sus anexos (pelo, uña). En este caso los dermatofitos cuentan con una enzima denominada queratinasa, la cual permite al hongo mayor invasividad del tejido. Las dermatofitosis son producidas por hongos dermatofitos pertenecientes a tres géneros hasta ahora conocidos como son *Trichophyton*, *Microsporum*, o *Epidermophyton*, los cuales según su ecología pueden ser antropofílicos cuando tienen al hombre como su huésped principal, los zoofílicos pueden infectar a animales inferiores, y también infectar a los humanos, los geofílicos viven en la tierra como saprofitos pero pueden infectar a animales inferiores y a humanos.

Las lesiones producidas por dermatofitos son denominadas Tineas o Tiñas, se caracterizan por producir prurito, descamación, borde eritematoso cuando se trata de la piel, en el caso de las uñas provoca cambios en la lámina ungueal, con engrosamiento, opacidad, y puede llegar al desprendimiento completo sin provocar dolor, y en el caso del cuero cabelludo se puede observar descamación y afectar al folículo piloso tanto externamente (ataque ectotrix) como internamente (ataque endotrix).(GONZÁLEZ, 2005)

En nuestro medio los dermatofitos frecuentemente aislados pertenecen a los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, cada género con sus respectivas especies, como se muestra a continuación:

- *Epidermophyton: Epidermophyton floccosum*

- *Microsporum: Microsporum canis*

Microsporum gypseum

- *Trichophyton: Trichophyton mentagrophytes*

Trichophyton rubrum

Trichophyton tonsurans

Los dermatofitos son hongos que característicamente producen lesiones superficiales aprovechando situaciones como traumatismo, maceración que van a favorecer la contaminación con el agente, la incubación (alrededor de cuatro días), luego expansión y diseminación de las lesiones que varía desde algunas semanas a tres o cuatro meses, las manifestaciones se comienzan a observar cuando la velocidad de crecimiento del hongo iguala o sobrepasa la renovación de las estructuras afectadas. (GONZÁLEZ, 2005)

Las lesiones producidas por dermatofitos pueden afectar tanto la piel como sus anexos, (pelo y uña), ocasionando daño en los tejidos queratinizados, en la estructura normal de las mismas provocando la descamación de ese tejido superficial, y toma el nombre según el área anatómica que se encuentra afectando, por ejemplo tiña de la cabeza, de la barba, del cuerpo, de las manos, inguinal o crural, del pie, de las uñas. Así entonces en la piel la lesión se caracteriza por comenzar muy pequeña y progresivamente se va extendiendo desde el punto de inicio presentando borde eritematoso, elevado, pruriginoso, a nivel del pelo del cuero cabelludo, puede afectar tanto externa como internamente, afectando la cutícula del mismo con posterior fractura, por lo que macroscópicamente se observa una zona de pseudo alopecia (caída parcial del pelo)(BELEÑO, 2013)

Existe otro grupo de micosis superficiales que pueden afectar al hombre que se encuentran fuera de esta clasificación de dermatofíticas y no dermatofíticas como son las micosis oportunistas, causadas por agentes que generalmente son saprofitos ya sea en el ambiente o en la flora normal pero aprovechan condiciones de labilidad del sistema inmunológico del paciente para provocar su lesión.

A continuación se muestra una tabla que representa la clasificación de las micosis, los agentes que las producen y los tipos de lesión:

Tabla 3 Clasificación de las Micosis.

Micosis superficiales	Agentes etiológicos	Área que puede afectar	Tipo de lesión
Dermatofíticas			
Tinea o tiña	<i>Epidermophyton floccosum</i>	Áreas de piel desprovistas de vello, pies, uñas.	En piel se caracteriza por lesión descamativa, pruriginosa, borde bien definido eritematoso. En el pelo puede producir ataque ectotrix o endotrix, con fragmentación del cabello, y en las uñas pueden presentar cambio de sus características normales, pierde su brillo, su textura y se van desprendiendo del lecho ungueal.
	<i>Microsporum canis</i>	Cuero cabelludo, cabello, uñas, piel desprovistas de vello	
	<i>Microsporum gypseum</i>	Piel desprovistas de vello.	
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Cuero cabelludo, piel de la barba, piel desprovista de vello, pies uñas.	
	<i>Trichophyton rubrum</i>	Piel de la barba, piel desprovista de vello, pies uñas.	
	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Cuero cabelludo, cabello.	
No Dermatofítica			
Pitiriasis versicolor	<i>Malassezia furfur</i> , <i>Malassezia ovalis</i>	Piel de cara, cuello, tórax, miembros superiores.	Manchas de hipo o hipercrómicas en las zonas descritas.
Tiña negra	<i>Cladosporium werneckii</i>	Palmas	Mancha hipercrómica en palma de manos
Pilonodosis (Piedra blanca, Piedra negra)	<i>Trichosporum beigelli</i> <i>Piedraia hortae</i>	Áreas con vello como axila, pubis. Pelo del cuero cabelludo.	Nódulo color claro alrededor del vello El cabello presenta nódulo de color oscuro
Oportunistas			
Candidiasis	<i>Candida albicans</i> y otras especies	Mucosa oral, tracto digestivo, piel, tracto vaginal.	Lesiones en la mucosa denominadas aftas, redondeadas tipo úlcera, muy dolorosa, en la piel se caracteriza por lesiones húmedas, dolorosas.
Otomicosis	<i>Aspergillus</i> y sus especies	Oídos	Lesiones descamativas, pruriginosas en conducto auditivo externo
Queratomicosis	<i>Fusarium</i> y sus especies	Epitelio corneal	Lesión ulcerativa que progresivamente va opacando la córnea

Fuente: Dra. M Allevato. (ALLEVATO M, 2007)

2.7.2 Características de los Hongos Dermatofitos estudiados

2.7.2.1 *Microsporum canis*

Son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anejos cutáneos. Su principal característica es que invaden las capas superficiales de la piel, pelos y uñas.

Producen manifestaciones clínicas muy variables, desde síntomas leves hasta lesiones supuradas e inflamatorias intensas que reciben el nombre de dermatofitosis o tiñas.

Afecta en el 90% de los casos a niños de 1 a 10 años, a un 3% de menores de 1 año, y 3% de personas entre 11 y 20 años.

Estas tiñas se caracterizan por una placa escamosa que puede alcanzar varios centímetros de diámetro.(BENEKE, 1980)

Causa de tiña en gatos, perros y monos. Puede no causar sintomatología y ser colonizados del pelaje de animales. Cuando se transmite al ser humano es una especie muy contagiosa que da lugar a brotes epidémicos familiares o escolares. Provoca tiña capitis, tiñas corporis principalmente en niños. Raramente es causa de onicomycosis.

Macroscópicamente son colonias con anverso lanoso o algodonoso blanco o de color gamuza amarillento parduzco en el centro.

Manifestaciones clínicas:

- a) Tiña capitis: en el 90% de los casos afecta a niños de 1 a 10 años. Se caracteriza por una placa escamosa que puede alcanzar varios centímetros de diámetro.
- b) Tiña corporis: es una dermatofitosis de la piel lampiña con parasitación de la capa córnea y en ocasiones del pelo terminal
- c) Tiña facial: es la infección de la cara por dermatofitos en niños mujeres y varones.

2.7.2.2 *Tricophyton mentagrophytes*

Producen dermatofitosis de la piel cabelluda. Puede manifestarse por placas pseudoalopécicas pequeñas caracterizadas por una descamación, pelos cortos, gruesos y quebradizos alternos con pelos sanos, o bien por placas pseudoalopécicas (sin pelo) grandes, con múltiples pústulas,

formación de abscesos, salida de exudado purulento. Se acompaña de adenopatía regional y dolor.(BARAN, 2011)

2.7.2.3 *Tricophyton rubrum*

Hongo filamentoso con microconidios piriformes (de 3-5,5 x 2-3,5 μm), sésiles sobre las hifas formando racimos. Macroconidios muy escasos (de 40-55 x 6- 7,5 μm), con varios tabiques, de formas irregulares, de pared fina y lisa, al final de la hifa. Abundan las clamidosporas intercalares, presencia de hifas en raqueta y ausencia de filamentos espirales. Crece bien en la mayoría de los medios de cultivo comunes. Suele formar dos tipos de colonias: unas rojizas en anverso y reverso y las otras blancas con el reverso de color rojizo (pigmento rojo frecuente). Crecimiento rápido, aspecto finamente veloso, que va tomando un aspecto aterciopelado. La superficie presenta surcos radiales poco profundos. Los bordes suelen ser netos y las prolongaciones radiales le dan aspecto desflecado. Cuando las colonias son blancas presentan mayor micelio aéreo que les da un aspecto algodonoso. El reverso se tiñe del pigmento rojo que se difunde hasta los bordes formando una franja roja que rodea la masa blanca central. (ARISTEGUI, 2013)

Es la causa más frecuente de enfermedades de la piel como el pie de atleta, prurito de Jockey y tiña y enfermedades de las uñas. Causa el 80 % de las dermatofitosis que afecta piel y uñas y su distribución es mundial.

Tiene las siguientes formas clínicas:

- 1) Dermatofitosis de piel cabelluda: puede presentarse como placas pseudoalopécicas pequeñas, caracterizadas por descamación, pelos cortos, gruesos y quebradizos alternos con pelos sanos, o zonas pseudoalopécicas grandes con abscesos. Se acompaña de adenopatía regional y dolor a la digito presión
- 2) Dermatofitosis del cuerpo: se presentan placas escamosas, rodeadas por un borde levantado eritematosos con pústulas y/ o vesículas. Ocasionan prurito.
- 3) Dermatofitosis inguinal: predomina en el sexo masculino. Se inicia en el pliegue inguinal y se extiende hacia la cara anterior del muslo y posteriormente al pubis, abdomen y pliegues interglúteos.

- 4) Dermatitis de la mano: afecta principalmente la cara palmar de la mano, es unilateral y se caracteriza por descamación difusa con aumento de líneas de la piel. Prurito inconstante.
- 5) Dermatitis de los pies: puede presentarse en tres formas clínicas: a) vesiculosa, que es la más frecuente en las áreas de no apoyo del pie, b) interdigital y c) hiperqueratósica.
- 6) Dermatitis de las uñas: la forma clínica de la distrofia ungueal es la onicomiosis subungueal distal lateral, uñas engrosadas y formación de líneas longitudinales blanquecino amarillentas, cambio de coloración de las uñas y uñas pulverulentas.(NAVARRETE, 2008)

2.7.2.4 *Candida albicans*

Es un hongo levaduriforme que comúnmente infecta la piel. Es bastante común y puede comprometer casi cualquier área de la piel en el cuerpo. Casi siempre se presenta en áreas húmedas, calientes y con pliegues como las axilas y la ingle.(MEDLINEPLUS, 2012)

Las infecciones causadas por levaduras, sobre todo la *Candida albicans*, afectan a la boca, donde se forman aftas o llagas blancas, acompañadas de picor, inflamación y malestar al comer, y a la zona vulvovaginal, ocasionando secreciones vaginales anormales, escozor y malestar durante las relaciones sexuales y la micción.

Candida albicans suele presentarse como una célula oval con un tamaño medio de 2 a 4 micras; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas cuyos extremos presentan diámetros de 3 a 5 micras.

El hombre es el principal reservorio de este tipo de hongo. Podemos encontrarlo de forma habitual en piel, estómago, colon, recto, boca y garganta de individuos sanos, en principio no es patógeno, ya que la flora bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio.

Ahora bien, si el equilibrio existente se rompe *Candida albicans* empieza a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas Candidiasis o micosis candidiásica, que

pueden consistir en leves infecciones de mucosas y piel o desencadenar diseminaciones sistémicas graves, pudiendo afectar órganos vitales.(CASTRO, 2011)

2.8 ANTIMICÓTICOS

Antifúngico es una sustancia que elimina o detiene el crecimiento de hongos. Agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Stuttman y Fishbein, 1967)(CRUZ, 2009)

2.8.1 Clasificación

Los antimicóticos pueden clasificarse según criterios convencionales que atienden con el grupo químico al que pertenecen en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros; de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (ALLEVATO M, 2007)

Tabla 4 Clasificación de los antifúngicos por su estructura

POLIENOS	Nistatina, natamicina, anfotericina B
AZOLES	Imidazol: miconazol, clotrimazol, ketoconazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol, (ketoconazol). Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
ALILAMINAS	Terbinafina, naftifina
LIPOPÉPTIDOS	Papulacandinas. Triterpenoglicosilados. Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina.
PIRIMIDINAS	Flucitosina.
OTROS	Ioduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin.

Fuente: Prof. Dra. M. Allevato y col. Antifúngicos (ALLEVATO M, 2007)

CAPÍTULO 3

3 ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación de este trabajo es de índole experimental.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se tiene una población de microorganismos causantes de dermatomicosis, la cual ha sido detallada en el capítulo 2 y de esa población se tiene una muestra que son los microorganismos seleccionados para el estudio de la actividad antifúngica.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño de experimentos y análisis posterior de datos, fueron llevados a cabo con la plataforma estadística del programa Minitab 15 (Minitab, 2006).

3.3.1 Diseño Plackett-Burmann

El Diseño Plackett-Burman es un tipo de diseño fraccional, que se caracteriza por producir experimentos más eficientes, pues cada observación proporciona información sobre todos los factores, y es factible ver las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor en el mismo experimento. La respuesta a cualquier factor observado en diferentes condiciones indica si los factores actúan en las unidades experimentales de manera independiente. La interacción entre factores ocurre cuando su interacción no es independiente. Este diseño es recomendable cuando se manejan muchos factores que influyen en un proceso, en espera que solo unos cuantos sean importantes, los cuales son seleccionados en base a este tipo de diseño.

El objetivo de este diseño es determinar por medio de la estabilidad preliminar las formulaciones adecuadas previa la evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica.

Estableciéndose en base a los esquemas de formulación un diseño experimental factorial fraccionado Plackett-Burman:

3.3.1.1 Variable dependiente:

- Volumen de coalescencia

3.3.1.2 Variables independientes:

- **Concentración de la fase oleosa**

La composición de la fase oleosa corresponde a la mezcla de lanolina (35%), ácido esteárico (5%) y aceite de vaselina (60%).

En el presente estudio se realizaron formulaciones variando el contenido de la fase oleosa en la formulación, estableciéndose dos concentraciones de prueba: 20% y 40%.

- **Concentración de principio activo**

Basándose en el estudio anterior (AYALA & VÁSQUEZ, 2014) en donde se hacen estudios de los rangos de concentración óptimos para tener efecto antifúngico. Se establecen dos niveles de concentración, para las formulaciones que contienen

Ambrosia arborescens Mill (Marco) de 500 y 700ppm; mientras que para las formulaciones que contienen *Aristeguietia glutinosa* Lam (Matico) de 3 y 5%.

- **Tipo de emulsificantes**

Son establecidas las parejas de emulsificantes en función del valor de HLB 8.4, estas parejas de emulsificantes son: steareth2 (64%) y tween80 (36%); steareth2 (67%) y steareth21 (33%); steareth2 (64%) y alcohol cetílico (36%); steareth2 (57%) y alcohol estearílico (43%).

- **Concentración de emulsificante**

Se establecen dos niveles de la concentración de la mezcla de emulsificantes de acuerdo a las proporciones establecidas anteriormente, las cuales corresponden al 2% y 5% en la formulación final.

- **Concentración de quitosano**

Se establecen dos niveles de concentración del quitosano en la formulación, estos son de 0 y 2%.

Para poder establecer el diseño experimental debido a que se tienen cuatro niveles en “Tipo de emulsificantes” el diseño se subdivide en dos diseños parciales: uno que contiene los tipos de emulsificantes steareth2+tween80, steareth2+steareth21; y otro que contiene steareth2+alcohol cetílico y steareth2+alcohol estearílico, para cada diseño parcial se establecen 14 corridas que incluyen dos puntos centrales por bloque y dos réplicas, teniéndose un total de 28 formulaciones basadas en aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) y 28 formulaciones basadas en extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill).

3.3.2 Diseño Factorial

Se contempla ensayar también con otras formas cosméticas que contemplan geles con carbómero y lociones basadas en quitosano, para evaluar la influencia que el tipo de forma cosmética tiene en la actividad antifúngica *in vitro*. Se trata de un diseño de dos factores para fórmulas basadas en extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y otro similar para aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), esta diferenciación es realizada

debido a que tienen rangos de concentración diferentes para su aplicación (Ayala & Vásquez, 2014), con dos niveles, es decir un factorial 2^2 teniéndose un total de 4 fórmulas para el aceite y 4 fórmulas para el extracto, con una réplica. Se considera un diseño factorial completo debido a que se desea probar a más de la estabilidad la acción antifúngica y descartar que exista problema con el tipo de formulación por el vehículo que lleva el principio activo.

3.3.2.1 Variable dependiente:

- Variación de pH (Δ pH)

3.3.2.2 Variables independientes:

- **Tipo de formulación**

Se considera una fórmula en gel y una fórmula en loción.

- **Concentración de principio activo**

- Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam): 600-1200ppm
- Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill): 4-8%

3.3.3 Evaluación antifúngica

3.3.3.1 Variable dependiente

- Inhibición del crecimiento (halos) de especies de hongos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231.

3.3.3.2 Variables dependientes

- Concentración de aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) en la formulación propuesta
- Concentración de extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) en la formulación propuesta

3.3.3.3 Indicadores

- Factores físicos: Temperatura en °C, tiempo de incubación en horas, volumen del medio de cultivo en mililitros.
- Factores químicos: pH, volumen de disolvente en mililitros.
- Factores biológicos: diámetros de halos de inhibición en milímetros

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

3.4.1 Descripción del proceso de obtención de activos naturales

A continuación se describe brevemente la obtención de los activos naturales guiados por los estudios de Ayala, Vásquez en 2014 (AYALA & VÁSQUEZ, 2014):

3.4.1.1 Desinfección, limpieza y secado del material vegetal

El material vegetal debe ser acondicionado previo los diferentes métodos de extracción, para ello deben ser separadas las hojas de los tallos, procurando que estas no se encuentren deterioradas, manchadas ni con evidencia de ataque de microorganismos. Posteriormente, estas deben ser sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% en agua durante 10 minutos para reducir la carga bacteriana, enjuagar y secar a temperatura ambiental.

Para la extracción del aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) se prefiere la metodología de destilación por arrastre de vapor del material fresco, en el caso de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) se prefiere la maceración del material previamente secado, el proceso de secado de este no debe exceder los 50°C.

3.4.1.2 Obtención de extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Debe ser colocadas las hojas secas y trituradas en alcohol etílico en relación 1:4, el recipiente debe ser oscuro y de cierre hermético, además debe asegurarse que el alcohol cubra completamente el material vegetal, el tiempo de maceración es de aproximadamente 72h con agitación ocasional.

Transcurrido el tiempo de maceración, el material es filtrado en papel filtro; el filtrado obtenido se somete a extracción del solvente por medio de un rotavapor al vacío, cuyas condiciones de operación no deben sobrepasar los 35°C, de este modo se obtiene una pasta pegajosa y semilíquida.

3.4.1.3 Obtención del aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

El material vegetal se coloca en un reactor de acero inoxidable hermético para destilación, suministrándose a este vapor de agua a una temperatura de 92°C. El vapor condensa a través del refrigerante durante 45 minutos hasta obtener la separación del aceite esencial y agua. Posteriormente, el aceite esencial debe ser separado por medio de un embudo de separación y el producto obtenido debe ser filtrado a través de un filtro de celulosa/sulfato de sodio anhidro/celulosa a fin de eliminar cualquier material extraño y el resto de humedad asociada.

3.4.2 Descripción del proceso de obtención de quitosano

3.4.2.1 Extracción de quitina a partir de caparazones de camarón.

3.4.2.1.1 Acondicionamiento de la materia prima

Materiales: vasos de precipitación de 1000mL, solución hidróxido de sodio 0.1N

Equipos: Estufa MEMMERT modelo BE-400

Procedimiento:

Se llevó a cabo mediante el lavado de los caparazones con agua en donde fueron separados parcialmente los residuos adheridos a ellos, siendo utilizada una solución de NaOH 0.1N en la cual fueron sumergidos los caparazones y puestos a reposar durante 24 horas. Posteriormente, el material fue secado a 50°C durante 6 horas.

3.4.2.1.2 Desmineralización (Parada, Crespín, Miranda, & Katime, 2004)

Materiales: vasos de precipitación de 1000mL, solución ácido clorhídrico 1N, agua destilada

Procedimiento:

El principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el CaCO₃, el cual fue eliminado empleando una solución de HCl 1N en donde fueron sumergidos los

caparazones por 3 horas a temperatura ambiente, la relación masa-volumen entre los caparazones y la solución HCl 1N utilizada fue de 1:10. Luego, fueron lavados con abundante agua destilada hasta neutralización de las aguas de filtrado (pH entre 6 y 7).

3.4.2.1.3 Desproteínización (Parada, Crespín, Miranda, & Katime, 2004)

Materiales: Solución hidróxido de sodio 1N

Equipos: Equipo de destilación (balones 1000mL y refrigerantes), plancha de calentamiento con agitador magnético PC-Corning 420, Estufa MEMMERT modelo BE-400

Procedimiento:

El procedimiento utilizado consistió en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa de NaOH 1N por medio de un reflujo durante 3 horas, con el fin de disolver la proteína. Tomando en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la despolimerización parcial de la quitina. La relación masa-volumen entre los caparazones y la solución NaOH 1N utilizado fue de 1:15. Posteriormente, se procedió a lavar con abundante agua destilada hasta neutralización de las aguas de filtrado, para luego ser secado a 50°C

3.4.2.2 Obtención de quitosano

3.4.2.2.1 Desacetilación

Materiales: Solución hidróxido de potasio 70%

Equipos: Equipo de destilación (balones 1000mL y refrigerantes), plancha de calentamiento con agitador magnético PC-Corning 420, Estufa MEMMERT modelo BE-200

Procedimiento:

Consiste en una hidrólisis fuertemente alcalina bajo las condiciones de tiempo de reacción de 4 horas a una temperatura de 105°C utilizando KOH 70%. La relación utilizada entre la cantidad de quitina y el volumen ocupado de KOH 70% es de 1:20. Posteriormente fue lavado el quitosano obtenido con abundante agua destilada hasta neutralización de las aguas de filtrado. (DÁVILA, 2010)

3.4.2.2.2 Determinación del grado de desacetilación del quitosano obtenido

Materiales: Solución ácido clorhídrico 0.3N, solución hidróxido de sodio 0.1N

Equipos: Potenciómetro Jenway 3510, balanza analítica Mettler Toledo modelo ML204/01,

Procedimiento:

Se utilizó el método potenciométrico (Hidalgo, Suárez, & Fernández, 2008) para la determinación del grado de desacetilación, para ello fueron solubilizados 0.5g de quitosano en 20mL de una solución HCl 0.3N con ayuda de agitación y calentamiento de 55°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la titulación con el potenciómetro Jenway 3510, utilizando una solución NaOH 0.1N previamente valorada, con los datos obtenidos se construyó una curva pH vs V_{NaOH} , en donde se visualizan los puntos de inflexión necesarios para el cálculo del grado de desacetilación, los cuales son corroborados por medio de la construcción de una curva dpH/dV_{NaOH} , con el valor de los puntos de inflexión obtenidos y mediante la ecuación 1, se determinó el grado de desacetilación de quitosano.

$$\% \text{NH}_2 = \frac{16.1 \times (\text{Pto. inflexión mayor} - \text{Pto. inflexión menor}) \times N_{\text{NaOH}}}{\text{masa}_{\text{quitosano}}}$$

Ecuación 1 Fórmula de determinación del grado de desacetilación del quitosano

3.4.3 Acondicionamiento del extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Se realiza la dilución de 2000mg del extracto blando de *Ambrosia arborescens* Mill (Marco) en 20mL del diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO), obteniéndose así una concentración de 1000000ppm. Posteriormente se toman 0.3mL de esta solución y se lleva a volumen de 30mL utilizando propilenglicol, de este modo se tienen una solución de 10000ppm, la cual será la solución madre de partida para preparar las diluciones necesarias de principio activo en las formulaciones. La solución madre debe ser almacenada en refrigeración (temperatura menor a 8°C). Las concentraciones utilizadas en la investigación se definieron luego de la revisión bibliográfica del estudio de Ayala, Vásquez 2014.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Ecuación 2 Fórmula de cálculo para realizar las diferentes diluciones

Siendo

C_1 : concentración final en ppm

V_1 : volumen final en ml

C_2 : concentración inicial, 10000ppm

V_2 : volumen de solución de 10000ppm que debe ser añadido para obtener la concentración C_1

3.4.4 Formulación de emulsiones o/w

3.4.4.1 Diseño experimental para cremas

Debido a que se tratan de emulsiones o/w, se realizó un balance tanto para la fase lipofílica como para las parejas de emulsificante, asegurando que el valor de su HLB sea de 8.4, considerando que las emulsiones o/w tienen HLB con valores en el orden de 8 a 18. (VEGA & MIRANDA, 2009)

El valor del HLB es calculado conociendo los valores individuales de HLB cada uno de los componentes, los cuales son aditivos.

Siendo el valor de HLB de las materias primas utilizadas en este estudio las siguientes:

Tabla 5 Valores de HLB para las diferentes materias primas utilizadas en el presente estudio

Materia Prima	Valor de HLB
Lanolin	10
Stearic acid	15
Parafinum Liquidum	7
Steareth-2	4.9
Steareth-21	15.5
Polysorbate-80	15.0
Cetyl alcohol	15.0
Stearyl alcohol	14.0

Fuente: (FERNÁNDEZ, 2008) , (THE HERBARIE, 2004), (UNIDEMA, 2004)

Para calcular la composición que deben tener la pareja de emulsificantes, se utilizan las siguientes ecuaciones (CRODA, 2010):

$$\%A = \frac{(X - HLB_B) \times 100}{HLB_A - HLB_B}$$

Ecuación 3 Cálculo del componente A de la pareja de emulsificantes (CRODA, 2010)

Dónde:

%A: porcentaje del emulsificante A presente en la pareja de emulsificantes.

X: corresponde al valor objetivo de HLB que se desea obtener, para este estudio corresponde a 8.4.

HLB_B: corresponde al valor de HLB teórico del componente B

HLB_A: corresponde al valor de HLB teórico del componente A

$$\%B = 100 - \%A$$

Ecuación 4 Cálculo del componente B de la pareja de emulsificantes (CRODA, 2010)

Dónde:

%B: porcentaje del emulsificante B presente en la pareja de emulsificantes

Tabla 6 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Steareth 21

Descripción	Porcentaje En Formulación	Componentes	
Fase Lipofílica	Factor variable 20%; 40%	35% Lanolin	HLB=8.4
		5% Stearic acid	
		60% Paraffinum liquidum	
Emulsificante	Factor variable 2%;5%	67% Steareth- 2	HLB=8.4
		33% Steareth-21	
Principio Activo	Caso 1 Factor variable 3% y 5%	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	
	Caso 2 Factor variable 500 y 700ppm	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	
Modificador Reológico	Factor variable 0 y 2%	Chitosan	
Fase Hidrofílica	Csp para 100%	Water	

Elaboración: Las autoras

Tabla 7 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Tween 80

Descripción	Porcentaje En Formulación	Componentes	
Fase Lipofílica	Factor variable 20%; 40%	35% Lanolin	HLB=8.4
		5% Stearic acid	
		60% Paraffinum liquidum	
Emulsificante	Factor variable 2%;5%	64% Steareth 2	HLB=8.4
		36% Polysorbate-80	
Principio Activo	Caso 1 Factor variable 3% y 5%	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	
	Caso 2 Factor variable 500 y 700ppm	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	
Modificador Reológico	Factor variable 0 y 2%	Chitosan	
Fase Hidrofílica	Csp para 100%	Water	

Elaboración: Las autoras

Tabla 8 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Alcohol cetílico

Descripción	Porcentaje En Formulación	Componentes	
Fase Lipofílica	Factor variable 20%; 40%	35% Lanolin	HLB=8.4
		5% Stearic acid	
		60% Paraffinum liquidum	
Emulsificante	Factor variable 2%;5%	64% Steareth 2	HLB=8.4
		36% Cetyl alcohol	
Principio Activo	Caso 1 Factor variable 3% y 5%	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	
	Caso 2 Factor variable 500 y 700ppm	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	
Modificador Reológico	Factor variable 0 y 2%	Chitosan	
Fase Hidrofílica	Csp para 100%	Agua	

Elaboración: Las autoras

Tabla 9 Fórmula basada en la pareja de emulsificantes Steareth 2 y Alcohol estearílico

Descripción	Porcentaje En Formulación	Componentes	
Fase Lipofílica	Factor variable 20%; 40%	35% Lanolin	HLB=8.4
		5% Stearic acid	
		60% Paraffinum liquidum	
Emulsificante	Factor variable 2%;5%	57% Steareth 2	HLB=8.4
		43% Stearyl alcohol	
Principio Activo	Caso 1 Factor variable 3% y 5%	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguetia glutinosa</i> Lam)	
	Caso 2 Factor variable 500 y 700ppm	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	
Modificador Reológico	Factor variable 0 y 2%	Chitosan	
Fase Hidrofílica	Csp para 100%	Water	

Elaboración: Las autoras

3.4.4.2 Proceso de preparación de emulsiones o/w

Materiales: vasos de precipitación de 100mL, micropipeta Boeco 250-5000µL

Equipos: balanza analítica Mettler Toledo modelo ML204/01, plancha de calentamiento con agitador magnético PC-Corning 420

Procedimiento:

Debido a que se cuentan con cantidades pequeñas de activos, se estableció la preparación de 25g de cada una de las cremas.

El método de preparación de emulsiones o/w en caliente es llevado a cabo de acuerdo a las siguientes fases:

FASE 1 (lipofílica u oleosa): A una temperatura de aproximadamente 70°C se funden los componentes de la fase lipofílica junto a los emulsificantes hasta que se encuentren completamente homogéneos.

FASE 2 (acuosa): Según corresponda en el diseño experimental, las fórmulas que contengan quitosano deberán ser solubilizadas en agua que contenga una cantidad de ácido láctico en ella

que le brinde una concentración del 0.2%, posteriormente esta muestra es calentada hasta 70°C para poder ser mezclada con la fase lipofílica (ALBUQUERQUE, 2010). En el caso de que sean formulaciones sin contenido de quitosano, el agua es calentada directamente a la temperatura de 70°C.

FASE 3 (emulsificación): Por medio de agitación a velocidad elevada (100-200rpm) incorporar la fase oleosa sobre la fase acuosa hasta conseguir homogenización completa. Dejar reposar hasta que alcance temperatura inferior a los 35°C.

FASE 4 (incorporación de principios activos): Debido a la termolabilidad de los componentes es necesario que la emulsión se encuentre en temperatura inferior a los 35°C, para incorporar con agitación bien sea el extracto blando de *Ambrosia arborescens* Mill (Marco) en dilución de acuerdo a 3.4.1 y para el caso de aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* Lam (Matico) su incorporación directa.

Se establece de manera visual la homogenización de los activos en las diferentes bases de crema, asegurando que las muestras mantengan coloración uniforme de los activos en ellas.

3.4.5 Formulación de geles y lociones

A continuación se detallan los principales componentes de las formulaciones propuestas para gel y loción:

Tabla 10 Formulación de geles con los principios activos objetos de estudio

Descripción	Porcentaje En Formulación	Componentes
Modificador Reológico	Factor fijo 2%	Carbomer
Emoliente	Factor fijo 1%	Dimethicone
Principio Activo	Caso 1 Factor variable 4% y 8%	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)
	Caso 2 Factor variable 600 y 1200ppm	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)
Fase Hidrofílica	Csp para 100%	Water

Elaboración: Las autoras

Tabla 11 Formulación de lociones con los principios activos objetos de estudio

Descripción	Porcentaje En Formulación	Componentes
Modificador Reológico	2%	Chitosan
Principio Activo	Caso 1 Factor variable 4% y 8%	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguetia glutinosa</i> Lam)
	Caso 2 Factor variable 600 y 1200ppm	Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)
Fase Hidrofílica	Csp para 100%	Solución ácido láctico 2% en agua

Elaboración: Las autoras

3.4.5.1 Proceso de preparación de geles y lociones

3.4.5.1.1 Geles

Materiales: vasos de precipitación de 100mL, micropipeta Boeco 250-5000 μ L

Equipos: balanza analítica Mettler Toledo modelo ML204/01, plancha de calentamiento con agitador magnético PC-Corning 420

Procedimiento:

- Incorporar el carbopol 980 (carbomer) en el agua de formulación y agitar hasta asegurar la dispersión del mismo en esta fase.
- Añadir la dimeticona (dimethicone) agitación.
- Adicionar trietanolamina (triethanolamine) con movimiento lento, procurando no incorporar aire hasta que adquiriera consistencia de gel esta solución, aproximadamente a pH 6.5
- Incorporar el principio activo con agitación, se establece de manera visual la homogenización de los activos, asegurando que las muestras mantengan coloración uniforme de los activos en las formulaciones.

3.4.5.1.2 Lociones

Materiales: vasos de precipitación de 100mL, micropipeta Boeco 250-5000 μ L

Equipos: balanza analítica Mettler Toledo modelo ML204/01, plancha de calentamiento con agitador magnético PC-Corning 420

Procedimiento:

- Dispersar el quitosano en la solución de ácido láctico 2%, con agitación.
- Incorporar el principio activo con agitación, se establece de manera visual la homogenización de los activos, asegurando que las muestras mantengan coloración uniforme de los activos en las formulaciones.

3.4.6 Estudio de estabilidad preliminar

Se recomienda que las muestras para evaluación de la estabilidad sean almacenadas en frascos de vidrio neutro, transparente, con tapa que garantice cierre hermético, para evitar contaminación. Tener precaución para evitar la incorporación de aire en el producto, durante el envasado en el recipiente de prueba. Es importante no completar el volumen total del recipiente permitiendo un espacio vacío (head space) de aproximadamente un tercio de la capacidad del frasco para posibles intercambios gaseosos.(ANVISA, 2005)

La duración del estudio es generalmente de quince días y permite seleccionar las formulaciones idóneas, para lo cual estas son sometidas a condiciones de estrés buscando acelerar el surgimiento de posibles señales de inestabilidad, para lo cual las muestras deben ser sometidas a calentamiento en estufas a temperatura controlada ($T = 40 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Se determinan como parámetros de evaluación, las características fisicoquímicas para este estudio fueron considerados el volumen de coalescencia y pH.(ANVISA, 2005). No se considera el volumen de coalescencia para el análisis de estabilidad de lociones y geles, debido a que se consideró dentro del diseño experimental el tipo de formulación como variable, por lo tanto se selecciona pH como idóneo que permite cualificar la variación que tiene este parámetro tanto para geles como para lociones, lo que no permitiría el volumen de coalescencia en el caso de geles.

3.4.6.1 Determinación del volumen de coalescencia

La estabilidad a pesar de estar estrictamente definida en referencia a la variación de la cantidad y del tamaño de las gotas, en la práctica se prefiere utilizar el volumen de las fases separadas por ser fácilmente medible (ANTON & SALAGER, 1986). Cuando se observa la estabilidad en referencia al volumen de fase continua separado, se le llama clarificación; en referencia al volumen de fase dispersa separado, se le llama coalescencia. Se puede reportar este valor como el tiempo que tarda en separarse un volumen fijo, o como el volumen separado en un tiempo fijo. Los mecanismos que actúan son variados y van a determinar la cinética de separación. (SALAGER, 1999)

Materiales: Tubos de ensayo de 20mL

Equipos: Incubadora MEMMERT modelo BE-400

Procedimiento:

El método está basado en Reyes & Di Scipio, una vez obtenidas las diferentes formulaciones en función del diseño experimental obtenido, son colocadas en tubos de ensayo de 20mL de capacidad y son colocados en una estufa a una temperatura de 40°C. Estas muestras son observadas diariamente por un periodo de 15 días para registrar el comportamiento de las fases, como volúmenes de clarificado de agua o coalescido de aceite (V_c) respecto al volumen original registrado de cada una de las fases en el equilibrio (V_T). (REYES & DI SCIPIO, 2012).

- Al finalizar los 15 días, observar cada uno de los tubos con las diferentes formulaciones, aquellos en los cuales se hayan separado las fases deben ser medidos.
- Con ayuda de una regla de graduación ± 0.1 cm determinar la altura de la fase clarificada de agua y compararlo respecto a la altura original. Esta relación equivale a la relación V_c/V_T , para transformar las alturas en volúmenes utilizar la siguiente ecuación:

$$V = 2\pi r^2 \times h$$

Ecuación 5 Fórmula para cálculo del volumen en función de la altura

Dónde:

r: corresponde al radio en cm del tubo de ensayo.

h: altura de la formulación contenida en el tubo de ensayo (cálculo de volumen original) o altura de la fase clarificada (cálculo del volumen clarificado o coalescido de aceite)

3.4.6.2 Determinación de pH

Equipos: potenciómetro Mettler Toledo

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación se coloca una muestra significativa del gel o loción.
- Se coloca el electrodo del potenciómetro, considerando que este debe estar calibrado previamente en un rango de 4 a 7. Agitar levemente.
- Dejar estático el electrodo en la muestra hasta que se estabilice la lectura

3.4.7 Evaluación de la actividad antifúngica de las formulaciones de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Este estudio fue llevado a cabo para determinar la influencia del extracto blando de *Ambrosia arborescens* Mill y AE de *Aristeguietia glutinosa* Lam sobre hongos dermatofitos causantes de dermatomicosis. Algunos de los factores que se consideran de gran influencia en estos ensayos son: la cantidad del inóculo, la composición del medio de cultivo, pH del medio, formato de la prueba, temperatura y humedad de incubación (AYALA & VÁSQUEZ, 2014).

3.4.7.1 Revitalización de las cepas bacterianas

El procedimiento de activación de las cepas de hongos dermatofitos utilizados en esta investigación: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231 sigue los lineamientos establecidos por el proveedor Microbiologics- KWIK-STIK™ (MICROBIOLOGICS, 2011)

Materiales: Medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar, Caldo nutritivo Trypticase Soy Broth

Equipos:Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845, Incubadora MEMMERT modelo BE-400

Procedimiento:

El método de activación depende del material biológico, el proveedor establece lo siguiente(MICROBIOLOGICS, 2011):

- Abrir el embalaje
- Quitar la etiqueta y pegar sobre la placa Petri o ficha de seguimiento.
- Romper la ampolla para liberar el líquido de hidratación.
- Facilitar la bajada del líquido hasta la pastilla.
- Aplastar la pastilla y mezclarla con el líquido.
- Saturar el hisopo.
- Realizar movimientos con el hisopo en espiral desde el centro hasta las paredes de la caja Petri que contiene el medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar (SAB), el hisopo debe ser colocado en un tubo de ensayo con Tryptic Soy Broth (TSB), para su conservación. (AYALA & VÁSQUEZ, 2014)
- Incubar las placas a 25°C en una atmosfera aerobia de 2 a 7 días.
- Una vez activadas las cepas deben ser colocadas en Cryobank para su conservación.

3.4.7.2 Preparación inóculo(AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

3.4.7.2.1 *Trichopyton rubrum, Trychopyton mentagrophytes, Microsporium canis*

Materiales: Cámara de Neubauer MARIENFELD, Vortex Mixer GEMMY modelo VM-300, Micropipeta automática GLASSCO de 10- 100 µl

Equipos: Microscopio MICROS AUSTRIA modelo MCX 100 LCD

Procedimiento:

De acuerdo al Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos descrito por Cadeño y Ames(CAÑEDO & AMES, 2004) se establece lo siguiente:

Se preparó una suspensión de esporas en agua destilada con Tween 80 al 1%, se homogenizó con el Vortex durante 10 min. Se limpia la cámara de Neubauer con alcohol para desinfectar,

se secó y colocó el cubreobjetos. Con una micropipeta automática, se llena la cámara con 10 µL de la suspensión de esporas. Observar al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura. Contar las esporas presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro). También deben ser contadas las esporas que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadrado. Teniéndose un total 10 cuadrados, cinco en cada cámara (cinco arriba y cinco abajo), desinfectar inmediatamente la cámara con alcohol. (AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

El valor obtenido del recuento debe aproximarse a 10^6 para garantizar una cantidad semejante de microorganismo en cada siembra, el cálculo se basa en la siguiente ecuación (ROUSSOS, AQUIAHUATLI, BRIZUELA, OLMOS, RODRÍGUEZ, & Viniegra, 1989):

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} = n_{\text{esporas contadas}} \times 25000 \times \text{factor de dilución}$$

Ecuación 6 Determinación del número de esporas por mL

Dónde:

$n_{\text{esporas contadas}}$: número de esporas contadas en la cámara de Neubauer

factor de dilución: Concentración Tween 80 (1%)

$$\text{Esporas totales} = \frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} \times V_{\text{suspensión}}$$

Ecuación 7 Determinación del número total de esporas

Dónde:

$V_{\text{suspensión}}$: Volumen de la suspensión original de esporas (10 ml)

3.4.7.2.2 *Candida albicans*

Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad

de concentración de peso. Esto quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso, independientemente del tamaño celular del microorganismo. Tales mediciones se hacen normalmente con un espectrofotómetro UV-VIS. Determinándose que a una longitud de onda de 655 nm, se deben hacer diluciones sucesivas que permitan obtener un valor de absorbancia de 0,20 aprox. Lo cual es equivalente a 10^8 células para hongos y levaduras. (AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

Equipos: Centrífuga SELECTA modelo Centro 8/7001356, Vortex Mixer GEMMY modelo VM-300, Espectrofotómetro UV SHIMADZU modelo mini 1240, Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50

Procedimiento (AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

Para el cultivo overnight tomar una porción de la cepa activa e inocular en un tubo de ensayo con 8ml de Tryptic Soy Broth (TSB). Incubar a 25°C durante 18 horas.

Transcurrido este periodo de incubación, mediante centrifugación por 20 minutos a 3000 rpm separar el pellet, para lo cual se descarta el caldo y se añade la cantidad suficiente de suero fisiológico estéril con agitación, hasta obtener una dilución cuya absorbancia correspondan aproximadamente a 0.200 a una longitud de onda de 655nm.

3.4.7.3 Métodos de siembra

3.4.7.3.1 Siembra en placa por homogenización en masa *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*

Materiales: Sabouraud Dextrose Agar, placas Petri desechables, Micropipeta automática GLASSCO de 100-1000 μ l

Equipos: Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50, Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845, Balanza analítica DENVER SCIENTIFIC modelo TR204, Plancha calefactora THERMO SCIENTIFIC modelo SP131015

Procedimiento:

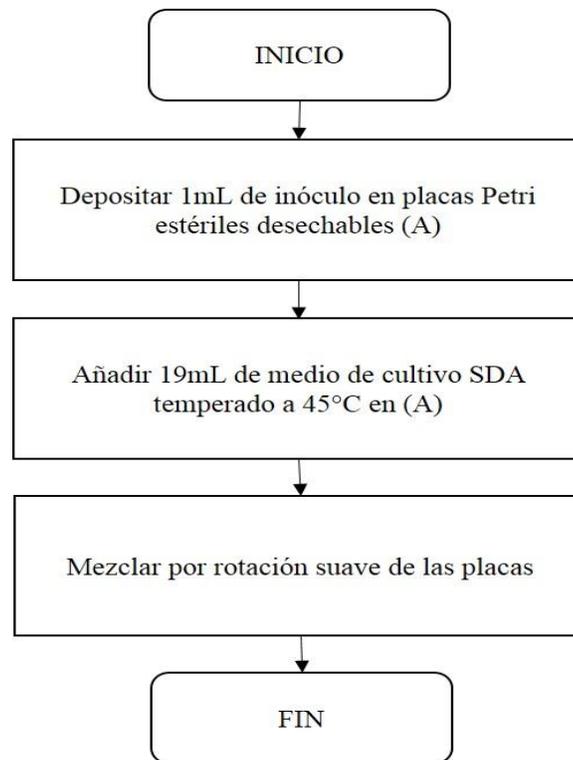


Figura N° 4 Procedimiento de siembra en placa por homogenización

Elaboración: Las autoras

La mezcla de movimiento suave entre inóculo y medio de cultivo asegura la distribución homogénea de ambos, permitiendo el crecimiento de la cepa por todo el agar. (QUIROZ, 2012) Las placas deben ser incubadas por al menos 7 días a una temperatura de 25°C, este tiempo es variable y se encuentra en función de cada cepa, tratando de obtener un crecimiento fúngico confluyente. (ALVAREZ, E., & M., 1990)

3.4.7.3.2 Siembra en placa por estriado *Candida albicans*

Materiales: Placas Petri estériles desechables, Micropipeta automática GLASSCOde 100-1000 µl

Equipos: Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50, Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845, Balanza analítica DENVER SCIENTIFIC modelo TR204, Plancha calefactora THERMO SCIENTIFIC modelo SP131015

Procedimiento:

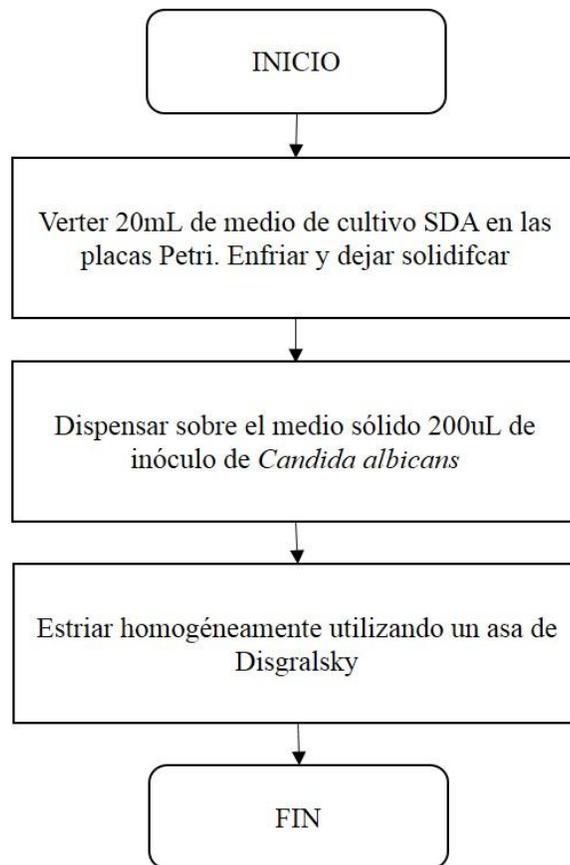


Figura N° 5 Procedimiento de siembra en placa por estriado

Elaboración: Las autoras

Incubar a 25°C durante 5 días.

3.4.7.4 Método modificado de Kirby-Bauer

En general, el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico.

Para lo cual, sobre la superficie de una placa con un medio de cultivo enriquecido, se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas para obtener crecimiento uniforme. A continuación se colocan discos de papel filtro impregnado con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. En principio, el antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. Las placas de prueba son incubadas de acuerdo a las condiciones de crecimiento

del microorganismo y luego se miden los halos de inhibición para evaluar la sensibilidad o resistencia del microorganismo frente al antibiótico. (PEDRIQUE, 2002)

Para el presente estudio, fue tomado el Método modificado de Kirby-Bauer que consiste en reemplazar los discos embebidos del activo por la realización de pozos en agar y la colocación de una cantidad de activo en contacto directo. Técnica que fue tomada por Ayala y Vásquez para la evaluación de la actividad antifúngica, debido a que el crecimiento de los hongos al presentar hifas impide que se tengan resultados confiables al usar el método clásico. (AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

Además, de acuerdo al estudio de Rojas, 2005, se establece que al comparar ambos métodos Kirby-Bauer y Kirby-Bauer modificado, el segundo método tiene mayor sensibilidad. (ROJAS & GARCÍA, 2005), corroborando la selección de esta metodología por Ayala, Vásquez al probar la actividad antifúngica de las materias primas utilizadas en las formulaciones objetos de este estudio.

Equipos: Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50, Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845, Micropipeta automática GLASSCO de 100-1000 μ l, Incubadora MEMMERT modelo BE-400, Pie de rey digital STANLEY

Materiales: Sacabocados y/o tubos de vidrio fusible de diámetro 5mm

Procedimiento:

Una vez realizados los procedimientos de método de siembra descritos anteriormente, asegurando que el agar se encuentre completamente solidificado. Se realizan pozos en la superficie de las placas con agar, utilizando un sacabocados de 5mm de diámetro, en cada pozo son colocados 100 μ L según corresponda a las diferentes formulaciones, un blanco positivo que corresponde a clotrimazol en crema y un blanco negativo el cual tiene la misma base de las formulaciones planteadas pero sin la adición de los principios activos.

Control positivo

Siguiendo los lineamientos de la investigación de Ayala-Vásquez que antecedió a este estudio, se utiliza como control positivo una crema comercial de clotrimazol de concentración 1% del activo, la cual es colocada directamente en cantidad similar a las cremas de estudio. Se comparan la liberación y difusión de un activo como el clotrimazol, con los activos objetos de este estudio en emulsión (crema o loción) y geles.

Control negativo

Para el caso de las cremas, se utilizan como referencia las matrices mostradas en las Tablas 12, y 14 sin colocar ninguno de los activos son preparadas de acuerdo al procedimiento detallado en 3.4.2.2.

El control negativo para las lociones es preparado de acuerdo al procedimiento 3.4.3.1.2 sin colocar ninguno de los activos.

Para los geles, se sigue el procedimiento descrito en 3.4.3.1.1, debiendo ser preparado el control negativo sin adición de los activos de este estudio.

Las placas son incubadas durante 7 a 14 días a 25°C para permitir el crecimiento fúngico confluyente.

Se realizan por triplicado todas las placas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procede a realizar la medición de los halos de inhibición formados con un calibrador o pie de rey (mm) considerando desde el punto de completa inhibición según se aprecie a simple vista. Se realiza la lectura por el reverso de la placa con un fondo negro y luz reflejada.(AYALA & VÁSQUEZ, 2014)

La interpretación de la lectura está fundamentada en el método Kirby- Bauer, que relaciona la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana con el halo de

inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar.(RAMIREZ & CASTAÑO, 2009)

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DESARROLLO Y ESTABILIDAD PRELIMINAR DE FORMULACIONES DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN

4.1.1 Formulación de cremas de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

De acuerdo al diseño experimental se realizaron 28 formulaciones para la forma cosmética “crema” con las variantes mencionadas anteriormente, estas formulaciones fueron sometidas a una estabilidad preliminar que considera el almacenamiento de las mismas a una temperatura de 40°C durante 15 días, teniéndose como respuesta de medida la relación del volumen coalescido y el volumen total de la emulsión (V_c/V_T). Aquellas fórmulas cuyo valor de V_c/V_T sea cero, son consideradas como estables e idóneas para las siguientes fases del estudio.

4.1.1.1 Diseño Steareth-2+Tween80 y Steareth-2+Steareth-21Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Tabla 12 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Tween 80 y Steareth2+Steareth 21 Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Orden Corrida	Concentración extracto Marco (ppm)	Conc. emulsif. (%)	Conc. Quitosano (%)	Tipo de emulsificantes	Fase lipofílica (%)	V _c /V _T
1	700	5	0	steareth2+tween80	20	0,61
2	700	2	2	steareth 2+steareth 21	20	0,00
3	700	2	0	steareth 2+steareth 21	40	0,59
4	600	3,5	1	steareth2+tween80	30	0,00
5	500	2	0	steareth 2+steareth 21	20	0,00
6	500	5	2	steareth 2+steareth 21	40	0,00
7	700	5	0	steareth2+tween80	40	0,98
8	500	2	2	steareth2+tween80	40	0,51
9	500	5	0	steareth 2+steareth 21	20	0,98
10	700	2	2	steareth2+tween80	20	0,00
11	700	5	2	steareth 2+steareth 21	40	0,00
12	600	5	2	steareth2+tween80	20	0,00
13	500	2	0	steareth2+tween80	40	0,61
14	600	3,5	1	steareth 2+steareth 21	30	0,00

Elaboración: Las autoras

Con el soporte del software estadístico Minitab 15 fue analizada la respuesta V_c/V_T de las diferentes formulaciones basadas en las parejas de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21, para lo cual es considerado un análisis de residuales para evidenciar la normalidad de los datos obtenidos, los factores que sean considerados como efectos determinantes en la estabilidad de las formulaciones y análisis de varianza para verificar los efectos principales con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

4.1.1.1.1 Interpretación de gráfico de residuos: Normalidad, Histograma, Carta de Control

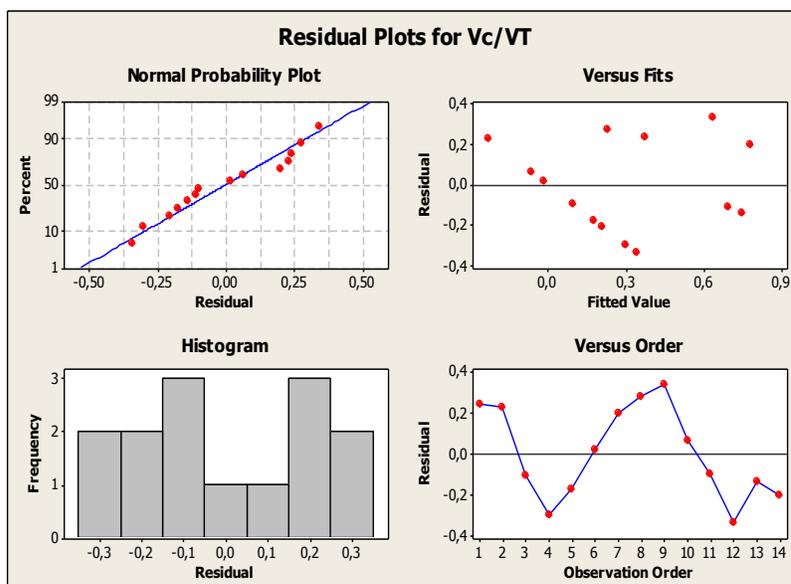


Figura N° 6 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

El análisis de residuos representado en la Figura N°6 permite evidenciar lo siguiente:

- En el diagrama de probabilidad de residuales (Normal Probability Plot), se puede observar que los datos se distribuyen a lo largo de la línea recta, por lo que se afirma que estos siguen una distribución normal.
- En el diagrama de residuos vs valores predichos (Versus Fits), no existe un patrón definido en los puntos por lo que puede concluirse que las varianzas son iguales para todos los tratamientos.
- El histograma tiene una distribución en forma de campana pero presenta una laguna en el centro que podría deberse a los intervalos definidos. Sin embargo los otros diagramas, muestran la normalidad de los datos.
- En la prueba de independencia de los errores (Versus Order), se observa que los datos no siguen ningún patrón definido, por lo que se puede afirmar que los errores son independientes entre sí, no existen errores sistemáticos.

Por lo tanto, al verificar el comportamiento normal de los datos, se puede tener con seguridad que estos son correctos para el análisis estadístico propuesto.

4.1.1.1.2 Pareto

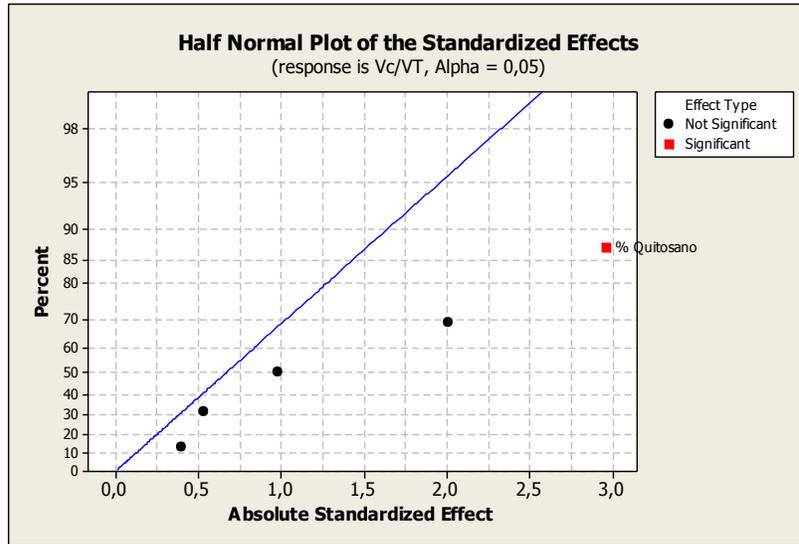


Figura N° 7 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearoth21Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

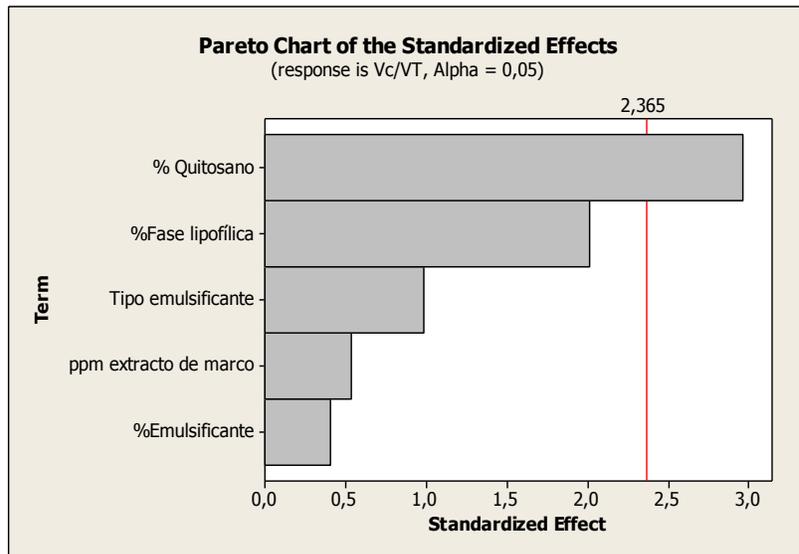


Figura N° 8 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Tween80 y Steareth2+Stearoth21Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

El análisis de variables pareto, permite determinar cuáles de los factores propuestos para la formulación de cremas son considerados influyentes en la estabilidad de las diferentes fórmulas.

Teniéndose, de acuerdo a las Figuras N°7 y 8, que la concentración de quitosano es un factor determinante en estabilidad de las cremas.

4.1.1.1.3 Ecuación general y %explicación (R²)

Tabla 13 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT

Estimated Effects and Coefficients for Vc/VT (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		0,2188	0,09640	2,27	0,057
%Fase lipofílica	0,4088	0,2044	0,10164	2,01	0,084
ppm extracto de marco	0,1131	0,0565	0,10609	0,53	0,611
%Emulsificante	-0,0822	-0,0411	0,10164	-0,40	0,698
% Quitosano	-0,5183	-0,2592	0,08737	-2,97	0,021
Tipo emulsificante	-0,1648	-0,0824	0,08355	-0,99	0,357
Ct Pt		0,5450	0,32407	1,68	0,137

S = 0,309324 PRESS = 24,7371
R-Sq = 65,91% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 36,69%

Analysis of Variance for Vc/VT (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	5	1,02440	1,21573	0,24315	2,54	0,128
%Fase lipofílica	1	0,15284	0,38703	0,38703	4,04	0,084
ppm extracto de marco	1	0,00948	0,02717	0,02717	0,28	0,611
%Emulsificante	1	0,03942	0,01564	0,01564	0,16	0,698
% Quitosano	1	0,70213	0,84179	0,84179	8,80	0,021
Tipo emulsificante	1	0,12051	0,09307	0,09307	0,97	0,357
Curvature	1	0,27058	0,27058	0,27058	2,83	0,137
Residual Error	7	0,66977	0,66977	0,09568		
Total	13	1,96474				

Estimated Coefficients for Vc/VT using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-0,378591
%Fase lipofílica	0,0204420
ppm extracto de marco	0,00056529
%Emulsificante	-0,0273910
% Quitosano	-0,259161
Tipo emulsificante	-0,0824039
Ct Pt	0,544959

Elaboración: Las autoras

El análisis de varianza muestra que el estadístico P para la Concentración de Quitosano es menor que el nivel de significancia establecido para el análisis $\alpha=0.05$, por lo que este factor

es considerado como un efecto principal, siendo corroborado también en el gráfico pareto. Además, pese a que %Fase lipofílica tiene el valor de su estadístico mayor, está muy cercano al nivel de significancia α , por lo cual también es considerado como un efecto principal en la estabilidad de las fórmulas cosméticas en crema cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 en formulaciones de Marco.

4.1.1.2 Diseño Steareth2+Alcohol Cetílico y Steareth2+Alcohol Estearílico Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Tabla 14 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Orden Corrida	Concentración extracto Marco (ppm)	Conc. emulsif. (%)	Conc. Quitosano (%)	Tipo de emulsificantes	Fase lipofílica (%)	Vc/V _T
15	700	5	0	steareth2+alcohol cetílico	20	0,00
16	600	2	2	steareth 2+alcohol estearílico	20	0,00
17	700	2	0	steareth 2+alcohol estearílico	40	0,40
18	600	3,5	1	steareth2+alcohol cetílico	30	0,30
19	500	2	0	steareth 2+alcohol estearílico	20	0,03
20	500	5	2	steareth 2+alcohol estearílico	40	0,07
21	700	5	0	steareth2+alcohol cetílico	40	0,53
22	500	2	2	steareth2+alcohol cetílico	40	0,68
23	500	5	0	steareth 2+alcohol estearílico	20	0,02
24	700	2	2	steareth2+alcohol cetílico	20	0,30
25	700	5	2	steareth 2+alcohol estearílico	40	0,07
26	500	5	2	steareth2+alcohol cetílico	20	0,30
27	500	2	0	steareth2+alcohol cetílico	40	0,02
28	600	3,5	1	steareth 2+alcohol estearílico	30	0,30

Elaboración: Las autoras

Con el soporte del software estadístico Minitab 15 fue analizada la respuesta V_c/V_T de las diferentes formulaciones basadas en las parejas de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico, para lo cual es considerado un análisis de residuales para evidenciar la normalidad de los datos obtenidos, los factores que sean considerados como efectos determinantes en la estabilidad de las formulaciones y análisis de varianza para verificar los efectos principales con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

4.1.1.2.1 Interpretación de gráfico de residuos: Normalidad, Histograma, Carta de Control

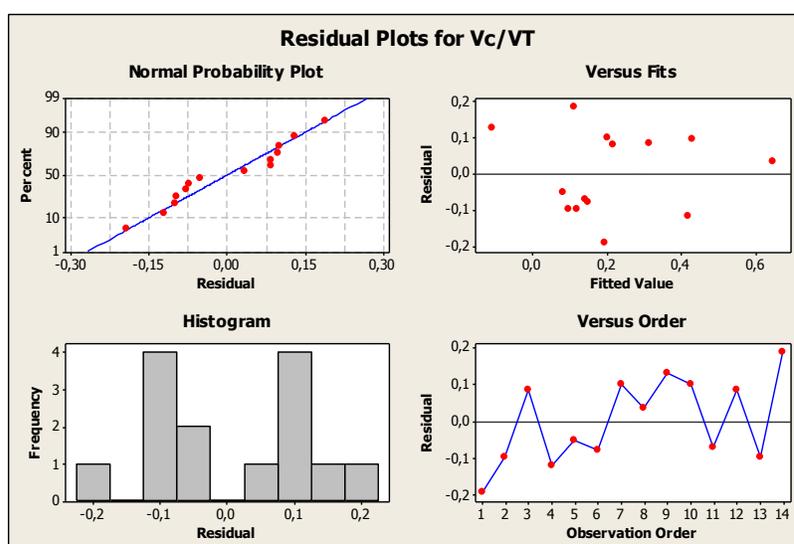


Figura N° 9 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

El análisis de residuos representado en la Figura N°9 permite evidenciar lo siguiente:

- En el diagrama de probabilidad de residuales (Normal Probability Plot), se puede observar que los datos se distribuyen a lo largo de la línea recta, por lo que se afirma que estos siguen una distribución normal.
- En el diagrama de residuos vs valores predichos (Versus Fits), no existe un patrón definido en los puntos por lo que puede concluirse que las varianzas son iguales para todos los tratamientos.

- El histograma tiene una distribución en forma de campana pero presenta una laguna en el centro que podría deberse a los intervalos definidos. Sin embargo los otros diagramas, muestran la normalidad de los datos.
- En la prueba de independencia de los errores (Versus Order), se observa que los datos no siguen ningún patrón definido, por lo que se puede afirmar que los errores son independientes entre sí, no existen errores sistemáticos.

Por lo tanto, al verificar el comportamiento normal de los datos, se puede tener con seguridad que estos son correctos para el análisis estadístico propuesto.

4.1.1.2.2 Pareto

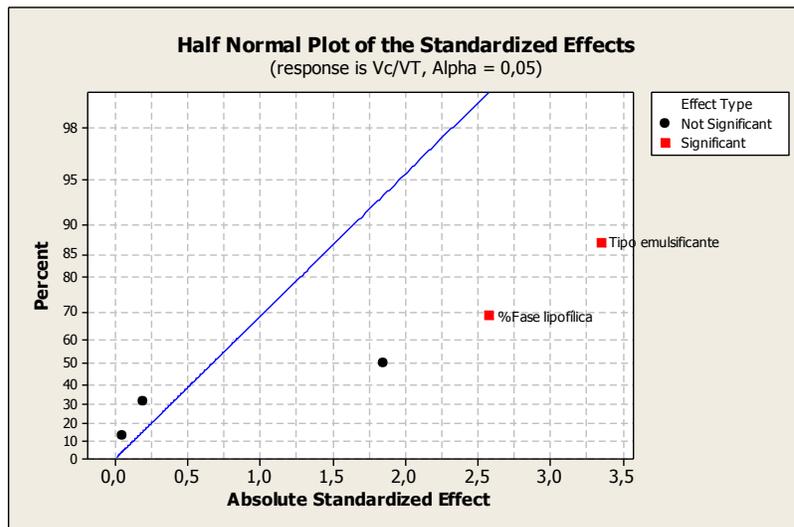


Figura N° 10 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

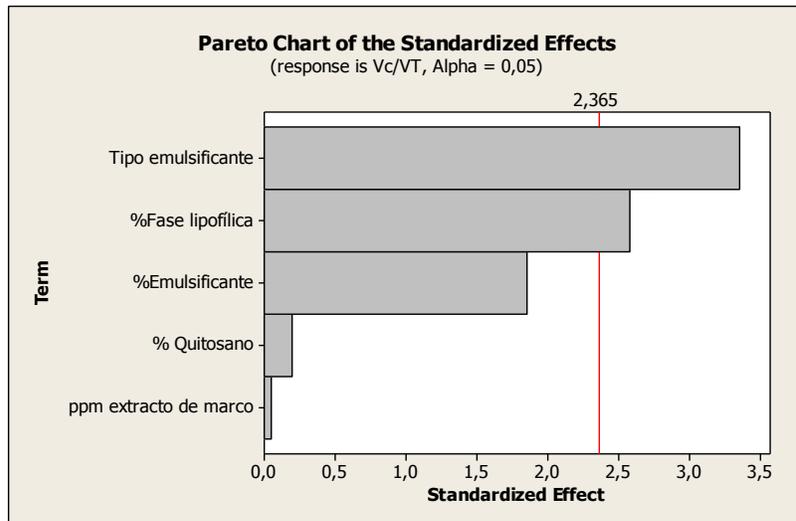


Figura N° 11 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

El análisis de variables pareto de las Figuras N° 10 y 11, permite determinar que el Tipo de emulsificante y el %Fase lipofílica son factores críticos que influyen en la estabilidad de las cremas cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico.

4.1.1.2.3 Ecuación general y %explicación (R^2)

Tabla 15 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT

Estimated Effects and Coefficients for Vc/VT (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		0,2664	0,04696	5,67	0,001
%Fase lipofílica	0,2384	0,1192	0,04620	2,58	0,036
ppm extracto de marco	-0,0053	-0,0026	0,04966	-0,05	0,959
%Emulsificante	-0,1915	-0,0958	0,05159	-1,86	0,106
% Quitosano	0,0183	0,0092	0,04620	0,20	0,849
Tipo emulsificante	-0,3075	-0,1537	0,04587	-3,35	0,012
Ct Pt		-0,2021	0,13485	-1,50	0,178

S = 0,156579 PRESS = 0,853509
R-Sq = 72,47% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 48,87%

Analysis of variance for Vc/VT (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	5	0,396653	0,444482	0,088896	3,63	0,061
%Fase lipofílica	1	0,104533	0,163129	0,163129	6,65	0,036
ppm extracto de marco	1	0,008431	0,000070	0,000070	0,00	0,959
%Emulsificante	1	0,018384	0,084462	0,084462	3,45	0,106
% Quitosano	1	0,017121	0,000963	0,000963	0,04	0,849
Tipo emulsificante	1	0,248184	0,275369	0,275369	11,23	0,012

Curvature	1	0,055072	0,055072	0,055072	2,25	0,178
Residual Error	7	0,171618	0,171618	0,171618	0,024517	
Total	13	0,623343				

Estimated Coefficients for Vc/VT using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	0,138967
%Fase lipofílica	0,0119175
ppm extracto de marco	-2,64435E-05
%Emulsificante	-0,0638354
% Quitosano	0,0091583
Tipo emulsificante	-0,153728
Ct Pt	-0,202113

Elaboración: Las autoras

El análisis de varianza muestra que el estadístico P para el Tipo de emulsificante y la Concentración de la fase lipofílica son menores que el nivel de significancia establecido para el análisis $\alpha=0.05$, siendo considerados como efectos principales corroborados también en el gráfico de pareto, estos son determinantes en la estabilidad de las fórmulas cosméticas en crema cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico en formulaciones de Marco.

4.1.2 Formulación de emulsiones o/w de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

De acuerdo al diseño experimental se realizaron 28 formulaciones para la forma cosmética “crema” con las variantes mencionadas anteriormente, estas formulaciones fueron sometidas a una estabilidad preliminar que considera el almacenamiento de las mismas a una temperatura de 40°C durante 15 días, teniéndose como respuesta de medida la relación del volumen coalescido y el volumen total de la emulsión (V_c/V_T). Aquellas fórmulas cuyo valor de V_c/V_T sea cero, son consideradas como estables e idóneas para las siguientes fases del estudio.

4.1.2.1 Diseño Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Tabla 16 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Tween 80 y Steareth2+Steareth 21 Matico (*Aristeguetia glutinosa* Lam)

Orden Corrida	Concentración aceite matico (%)	Conc. emulsif. (%)	Conc. Quitosano (%)	Tipo de emulsificantes	Fase lipofílica (%)	Vc/V _T
1	5	5	0	steareth2+tween80	20	0,00
2	5	2	2	steareth 2+steareth 21	20	0,00
3	5	2	0	steareth 2+steareth 21	40	0,54
4	4	3,5	1	steareth2+tween80	30	0,00
5	3	2	0	steareth 2+steareth 21	20	0,72
6	3	5	2	steareth 2+steareth 21	40	0,00
7	5	5	0	steareth2+tween80	40	0,38
8	3	2	2	steareth2+tween80	40	0,42
9	3	5	0	steareth 2+steareth 21	20	0,00
10	5	2	2	steareth2+tween80	20	0,00
11	5	5	2	steareth 2+steareth 21	40	0,00
12	3	5	2	steareth2+tween80	20	0,17
13	3	2	0	steareth2+tween80	40	0,69
14	4	3,5	1	steareth 2+steareth 21	30	0,00

Elaboración: Las autoras

Con el soporte del software estadístico Minitab 15 fue analizada la respuesta Vc/V_T de las diferentes formulaciones basadas en las parejas de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21, para lo cual es considerado un análisis de residuales para evidenciar la normalidad de los datos obtenidos, los factores que sean considerados como efectos determinantes en la estabilidad de las formulaciones y análisis de varianza para verificar los efectos principales con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

4.1.2.1.1 Interpretación de gráfico de residuos: Normalidad, Histograma, Carta de Control

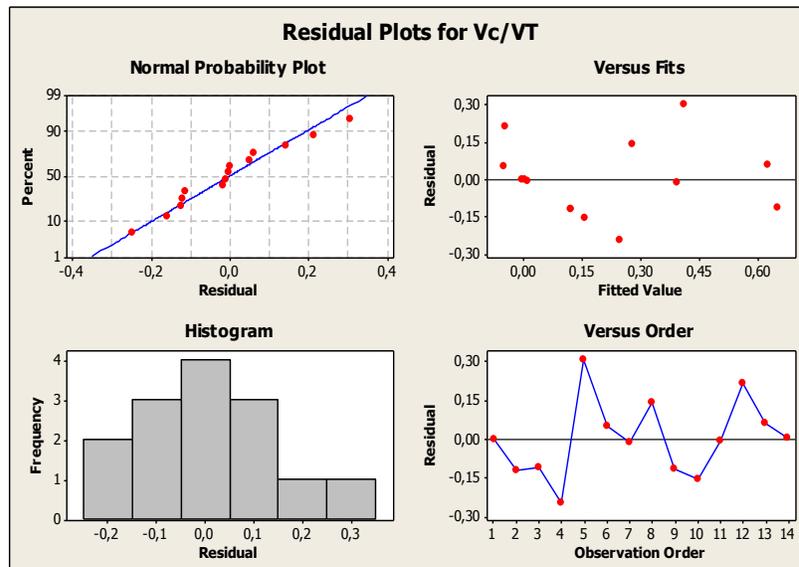


Figura N° 12 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Elaboración: Las autoras

El análisis de residuos representado en la Figura N°12 permite evidenciar lo siguiente:

- En el diagrama de probabilidad de residuales (Normal Probability Plot), se puede observar que los datos se distribuyen a lo largo de la línea recta, por lo que se afirma que estos siguen una distribución normal.
- En el diagrama de residuos vs valores predichos (Versus Fits), no existe un patrón definido en los puntos por lo que puede concluirse que las varianzas son iguales para todos los tratamientos.
- El histograma tiene una distribución en forma de campana simétrica y centrada.
- En la prueba de independencia de los errores (Versus Order), se observa que los datos no siguen ningún patrón definido, por lo que se puede afirmar que los errores son independientes entre sí, no existen errores sistemáticos.

Por lo tanto, al verificar el comportamiento normal de los datos, se puede tener con seguridad que estos son correctos para el análisis estadístico propuesto.

4.1.2.1.2 Pareto

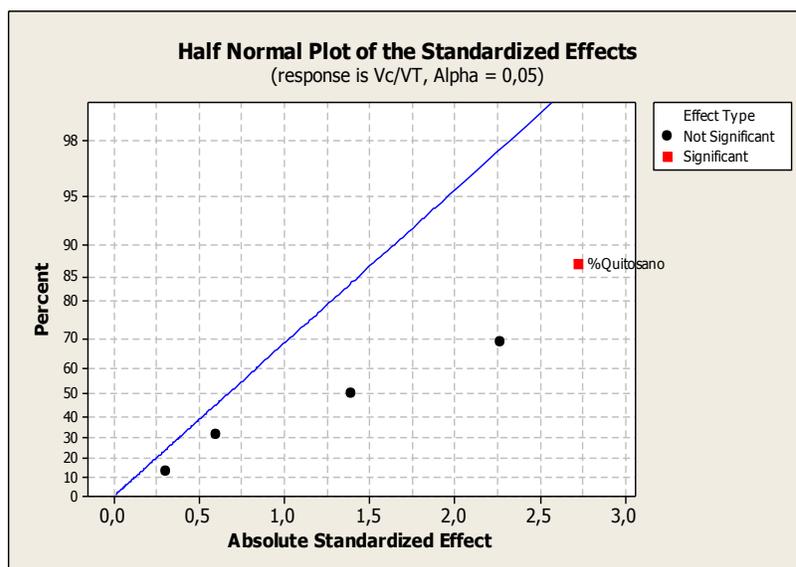


Figura N° 13 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Elaboración: Las autoras

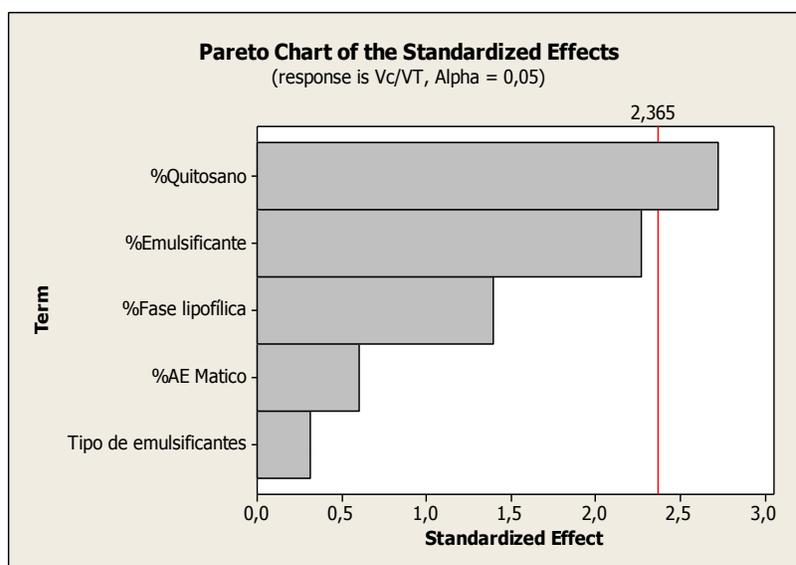


Figura N° 14 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Elaboración: Las autoras

El análisis de variables pareto de las Figuras N° 13 y 14, permiten determinar que la Concentración de Quitosano es un factor crítico que influye en la estabilidad de las cremas cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Tween 80 y Steareth2+Steareth21.

4.1.2.1.3 Ecuación general y %explicación (R²)

Tabla 17 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT

Estimated Effects and Coefficients for Vc/VT (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		0,2283	0,06275	3,64	0,008
%Fase lipofílica	0,1795	0,0898	0,06448	1,39	0,207
%AE Matico	0,0599	0,0300	0,04957	0,60	0,565
%Emulsificante	-0,2928	-0,1464	0,06448	-2,27	0,057
%Quitosano	-0,3504	-0,1752	0,06425	-2,73	0,029
Tipo de emulsificantes	-0,0357	-0,0179	0,05768	-0,31	0,766
Ct Pt		-0,2128	0,16980	-1,25	0,250

S = 0,205401 PRESS = 1,50672
R-Sq = 71,24% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 46,58%

Analysis of Variance for Vc/VT (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	5	0,66520	0,629940	0,125988	2,99	0,093
%Fase lipofílica	1	0,10830	0,081741	0,081741	1,94	0,207
%AE Matico	1	0,02752	0,015414	0,015414	0,37	0,565
%Emulsificante	1	0,24859	0,217538	0,217538	5,16	0,057
%Quitosano	1	0,27700	0,313815	0,313815	7,44	0,029
Tipo de emulsificantes	1	0,00379	0,004049	0,004049	0,10	0,766
Curvature	1	0,06624	0,066243	0,066243	1,57	0,250
Residual Error	7	0,29533	0,295327	0,042190		
Total	13	1,02677				

Unusual Observations for Vc/VT

Obs	StdOrder	Vc/VT	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
5	7	0,720000	0,412313	0,137637	0,307687	2,02R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Coefficients for Vc/VT using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	0,356007
%Fase lipofílica	0,00897548
%AE Matico	0,0299650
%Emulsificante	-0,0976143
%Quitosano	-0,175216
Tipo de emulsificantes	-0,0178696
Ct Pt	-0,212767

Elaboración: Las autoras

El análisis de varianza muestra que el estadístico P para la Concentración de Quitosano es menor que el nivel de significancia establecido para el análisis $\alpha=0.05$, por lo que este factor es considerado como un efecto principal, siendo esto corroborado también en el gráfico Pareto. Además, pese a que el Contenido de Emulsificante tiene el valor de su estadístico mayor, está muy cercano al nivel de significancia α , por lo cual también es considerado como un efecto principal en la estabilidad de las fórmulas cosméticas en crema cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 en formulaciones de Matico.

4.1.2.2 Diseño Steareth2+Alcohol Cetílico y Steareth2+Alcohol Estearílico Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Tabla 18 Matriz experimental de Diseño Plackett-Burman de pareja de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Orden Corrida	Concentración aceite matico (%)	Conc. emulsif. (%)	Conc. Quitosano (%)	Tipo de emulsificantes	Fase lipofílica (%)	Vc/V _T
15	5	5	0	steareth2+alcohol cetílico	20	0,56
16	5	2	2	steareth 2+alcohol estearílico	20	0,00
17	5	2	0	steareth 2+alcohol estearílico	40	0,60
18	4	3,5	1	steareth2+alcohol cetílico	30	0,00
19	3	2	0	steareth 2+alcohol estearílico	20	0,71
20	3	5	2	steareth 2+alcohol estearílico	40	0,00
21	5	5	0	steareth2+alcohol cetílico	40	0,50
22	3	2	2	steareth2+alcohol cetílico	40	0,25
23	3	5	0	steareth 2+alcohol estearílico	20	0,00
24	5	2	2	steareth2+alcohol cetílico	20	0,08
25	5	5	2	steareth 2+alcohol estearílico	40	0,00
26	3	5	2	steareth2+alcohol cetílico	20	0,00
27	3	2	0	steareth2+alcohol cetílico	40	0,56
28	4	3,5	1	steareth 2+alcohol estearílico	30	0,00

Elaboración: Las autoras

Con el soporte del software estadístico Minitab 15 fue analizada la respuesta V_c/V_T de las diferentes formulaciones basadas en las parejas de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico, siendo considerado un análisis de residuales para evidenciar la normalidad de los datos obtenidos, los factores que sean considerados como efectos determinantes en la estabilidad de las formulaciones y análisis de varianza para verificar los efectos principales con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

4.1.2.2.1 Interpretación de gráfico de residuos: Normalidad, Histograma, Carta de Control

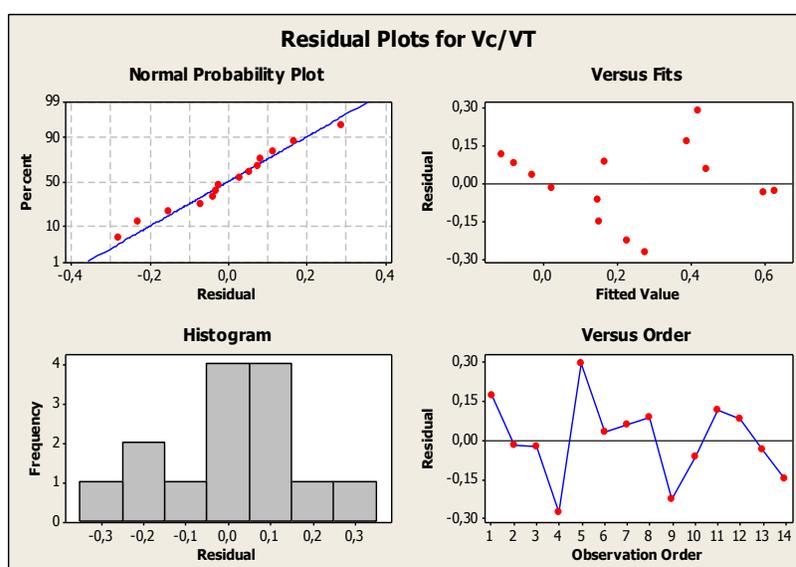


Figura N° 15 Análisis de residuos: Normalidad, Histograma y Carta de Control pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)
Elaboración: Las autoras

El análisis de residuos representado en la Figura N°15 permite evidenciar lo siguiente:

- En el diagrama de probabilidad de residuales (Normal Probability Plot), se puede observar que los datos se distribuyen a lo largo de la línea recta, por lo que se afirma que estos siguen una distribución normal.
- En el diagrama de residuos vs valores predichos (Versus Fits), no existe un patrón definido en los puntos por lo que puede concluirse que las varianzas son iguales para todos los tratamientos.
- El histograma tiene una distribución en forma de campana simétrica y centrada.

- En la prueba de independencia de los errores (Versus Order), se observa que los datos no siguen ningún patrón definido, por lo que se puede afirmar que los errores son independientes entre sí, no existen errores sistemáticos.

Por lo tanto, al verificar el comportamiento normal de los datos, se puede tener con seguridad que estos son correctos para el análisis estadístico propuesto.

4.1.2.2.2 Pareto

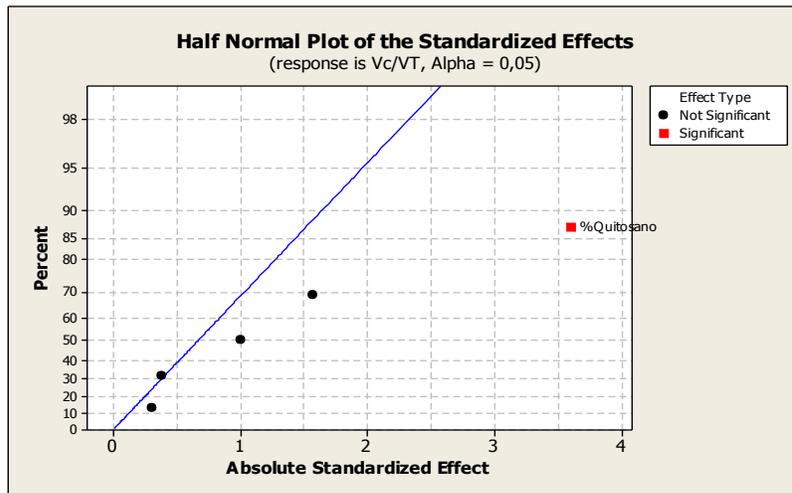


Figura N° 16 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto pareja de emulsificantes Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 Matico (*Aristeguetia glutinosa* Lam)
Elaboración: Las autoras

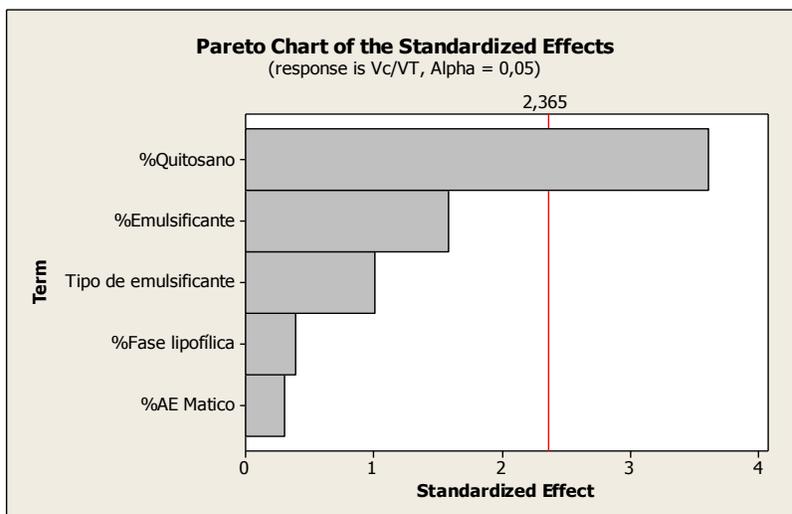


Figura N° 17 Gráfico de efectos estandarizados en diagrama de Pareto Steareth2+Tween80 y Steareth2+Steareth21 Matico (*Aristeguetia glutinosa* Lam)
Elaboración: Las autoras

El análisis de variables pareto de las Figuras N° 16 y 17, permiten determinar que la Concentración de Quitosano es un factor crítico que influye en la estabilidad de las cremas cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico.

4.1.2.2.3 Ecuación general y %explicación (R²)

Tabla 19 Efectos estimados y análisis de varianza para Vc/VT

Estimated Effects and Coefficients for Vc/VT (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		0,2156	0,06254	3,45	0,011
%Fase lipofílica	0,0530	0,0265	0,06871	0,39	0,711
%AE Matico	0,0367	0,0183	0,06016	0,30	0,769
%Emulsificante	-0,1900	-0,0950	0,06016	-1,58	0,158
%Quitosano	-0,4333	-0,2167	0,06016	-3,60	0,009
Tipo de emulsificante	-0,1260	-0,0630	0,06254	-1,01	0,347
Ct Pt		0,1209	0,19914	0,61	0,563

S = 0,208405 PRESS = 1,26299
R-Sq = 71,07% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 46,28%

Analysis of variance for Vc/VT (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	5	0,73106	0,736539	0,147308	3,39	0,071
%Fase lipofílica	1	0,02613	0,006471	0,006471	0,15	0,711
%AE Matico	1	0,00403	0,004033	0,004033	0,09	0,769
%Emulsificante	1	0,10830	0,108300	0,108300	2,49	0,158
%Quitosano	1	0,56333	0,563333	0,563333	12,97	0,009
Tipo de emulsificante	1	0,02926	0,044044	0,044044	1,01	0,347
Curvature	1	0,01600	0,016001	0,016001	0,37	0,563
Residual Error	7	0,30403	0,304028	0,043433		
Total			13	1,05109		

Estimated Coefficients for Vc/VT using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	0,501025
%Fase lipofílica	0,00265217
%AE Matico	0,0183333
%Emulsificante	-0,0633333
%Quitosano	-0,216667
Tipo de emulsificante	-0,0629814
Ct Pt	0,120870

Elaboración: Las autoras

El análisis de varianza muestra que el estadístico P para la Concentración de Quitosano es menor que el nivel de significancia establecido para el análisis $\alpha=0.05$, por lo que este factor es considerado como un efecto principal, siendo corroborado también el gráfico de pareto,

como un efecto principal en la estabilidad de las fórmulas cosméticas en crema cuyas parejas de emulsificantes corresponden a Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico en formulaciones de Matico.

4.1.3 Interpretación de todos los resultados obtenidos en la estabilidad de formulaciones del Diseño Plackett-Burman

A continuación son detalladas las características de las formulaciones cuyos resultados demuestran que son estables, para su identificación (N° Fórmula) se ha utilizado un número consecutivo junto a dos letras “MR” y “MT” que permiten discriminar las formulaciones que corresponden a Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristiguieta glutinosa* Lam) respectivamente.

4.1.3.1 Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

En general, de acuerdo al análisis estadístico de la estabilidad de cremas de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill), se demuestra que los factores que afectan la estabilidad preliminar de las formulaciones son: la concentración de quitosano, porcentaje de emulsificante y porcentaje de fase lipofílica presentes en las diferentes formulaciones. Teniendo las siguientes fórmulas estables, las cuales serán utilizadas para la evaluación antifúngica *in vitro*:

Tabla 20 Composición de fórmulas estables para extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

N° Fórmula	Concentración extracto Marco (ppm)	Conc. emulsif. (%)	Conc. Quitosano (%)	Tipo de emulsificantes	Fase lipofílica (%)
1MR	700	2	2	steareth 2+steareth 21	20
2 MR	600	3,5	1	steareth2+tween80	30
3 MR	500	2	0	steareth 2+steareth 21	20
4 MR	500	5	2	steareth 2+steareth 21	40
5 MR	700	2	2	steareth2+tween80	20
6 MR	700	5	2	steareth 2+steareth 21	40
7 MR	600	5	2	steareth2+tween80	20
8 MR	600	3,5	1	steareth 2+steareth 21	30
9 MR	700	5	0	steareth2+alcohol cetílico	20
10 MR	600	2	2	steareth 2+alcohol estearilico	20

Elaboración: Las autoras

4.1.3.2 Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

De acuerdo al análisis estadístico de la estabilidad de cremas de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), se demuestra que el factor que afecta la estabilidad preliminar de las formulaciones es: la concentración de quitosano.

Considerándose las siguientes fórmulas estables para la evaluación antifúngica *in vitro*:

Tabla 21 Composición de fórmulas estables para Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Nº fórmula	Concentración aceite matico (%)	Conc. emulsif. (%)	Conc. Quitosano (%)	Tipo de emulsificantes	Fase lipofílica (%)
1 MT	5	5	0	steareth2+tween80	20
2 MT	5	2	2	steareth 2+steareth 21	20
3 MT	4	3,5	1	steareth2+tween80	30
4 MT	3	5	2	steareth 2+steareth 21	40
5 MT	3	5	0	steareth 2+steareth 21	20
6 MT	5	2	2	steareth2+tween80	20
7 MT	5	5	2	steareth 2+steareth 21	40
8 MT	4	3,5	1	steareth 2+steareth 21	30
9 MT	5	2	2	steareth 2+alcohol estearílico	20
10 MT	4	3,5	1	steareth2+alcohol cetílico	30
11 MT	3	5	2	steareth 2+alcohol estearílico	40
12 MT	3	5	0	steareth 2+alcohol estearílico	20
13 MT	5	5	2	steareth 2+alcohol estearílico	40
14 MT	3	5	2	steareth2+alcohol cetílico	20
15 MT	4	3,5	1	steareth 2+alcohol estearílico	30

Elaboración: Las autoras

4.2 REFORMULACIONES ADICIONALES DE CREMAS

Debido a que los resultados de la actividad antifúngica *in vitro* de las formulaciones de crema iniciales no generan respuesta de actividad antifúngica, se considera el incremento de las concentraciones del activo en las proporciones descritas en las tablas a continuación, el activo será colocado en la fórmula base 16 (Referencia de Orden de corrida en diseño Plackett-

Burman), se selecciona esta formulación en común para extracto blando de marco y aceite esencial de matico debido a que fue demostrada su estabilidad con ambos activos.

Tabla 22 Composición de fórmulas estables para extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

N° fórmula	Concentración extracto de Marco (ppm)	Fórmula de referencia (“Orden de corrida”)
11MR	3500	16
12 MR	7000	16

Elaboración: Las autoras

Tabla 23 Composición de fórmulas estables para aceite esencial de Matico (*Aristeguieta glutinosa* Lam)

N° fórmula	Concentración A.E. Matico (%)	Fórmula de referencia (“Orden de corrida”)
16MT	8	16
17MT	10	16

Elaboración: Las autoras

4.3 DESARROLLO Y ESTABILIDAD PRELIMINAR DE FORMULACIONES DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL COMPLETO

De acuerdo a este diseño experimental se realizaron dos formulaciones para la forma cosmética “loción” y dos formulaciones para la forma cosmética “gel” en un rango de concentraciones de 600 a 1200ppm en el caso de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y 4 a 8% para Matico (*Aristeguieta glutinosa* Lam), a diferencia de las cremas, en estas formulaciones se analiza como respuesta la variación que tiene el pH en tiempo 0 días (inicial) y 15 días (final) cuando las muestras son almacenadas a una temperatura de 40°C. Utilizando esta respuesta (Δ pH), se ejecuta un análisis estadístico que permite evidenciar si la estabilidad se ve afectada por el tipo de formulación (gel o loción) y la concentración del activo.

4.3.1 Diseño gel y loción de quitosano para extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Tabla 24 Matriz experimental de Diseño Factorial completo de dos factores para *Ambrosia arborescens* (Marco)

Orden Corrida	Concentración extracto de Marco (ppm)	Tipo de formulación	ΔpH
1	600	Loción	0,02
2	600	Gel	0,03
3	1200	Loción	0,01
4	1200	Gel	0,02

Elaboración: Las autoras

4.3.1.1 Pareto

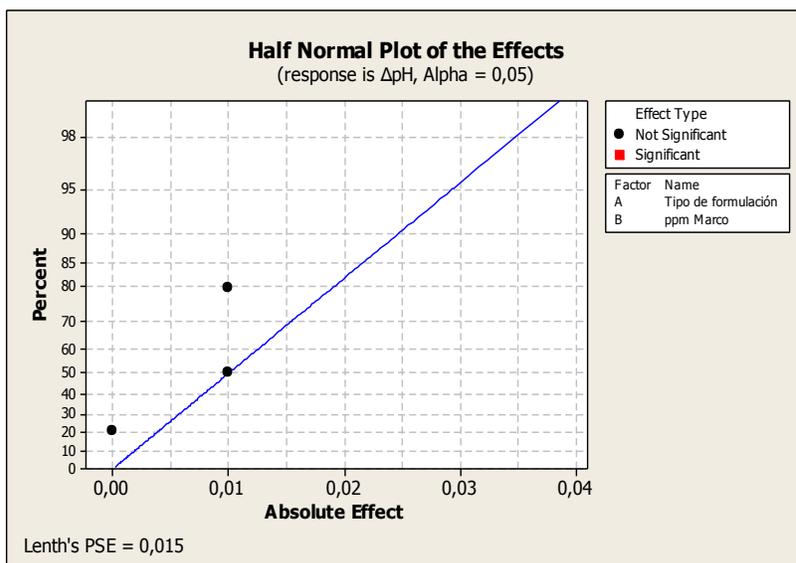


Figura N° 18 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto para formulaciones en gel y lociones de quitosano Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Elaboración: Las autoras

El análisis de variables pareto de la Figura N° 18, permite determinar que ninguna de las variables analizadas llegan a ser consideradas como un factor crítico, de tal manera que la estabilidad de las formulaciones en gel y loción no se ven afectadas por el tipo de forma cosmética (gel, loción) ni por la concentración del activo .

4.3.1.2 Análisis de varianza de formas cosméticas: loción y gel que contienen Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Tabla 25 Análisis de varianza para Δ pH en formulaciones de Marco

Two-way ANOVA: Δ pH versus Concentración marco (ppm). Forma cosmética

Source	DF	SS	MS	F	P
Concentración marco (ppm)	1	0,000025	0,000025	1,00	0,500
Forma cosmética	1	0,000025	0,000025	1,00	0,500
Error	1	0,000025	0,000025		
Total	3	0,000075			

S = 0,005 R-Sq = 66,67% R-Sq(adj) = 0,00%

Elaboración: Las autoras

El análisis de varianza muestra que el estadístico P tanto de la forma cosmética como de la concentración del activo son mayores al nivel de significancia establecido para el análisis $\alpha=0.05$, por lo que estos factores no son considerados críticos en la estabilidad de las formulaciones en gel y loción para Marco (*Ambrosia aboescens* Mill), este análisis también es corroborado por el gráfico pareto.

4.3.2 Diseño gel y loción de quitosano para aceite esencial Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Tabla 26 Matriz experimental de Diseño Factorial completo de dos factores para Aceite Esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Orden Corrida	Concentración AE Matico (%)	Tipo de formulación	Δ pH
1	8	Loción	0,03
2	4	Gel	0,02
3	4	Loción	0,04
4	8	Gel	0,02

Elaboración: Las autoras

4.3.2.1 Pareto

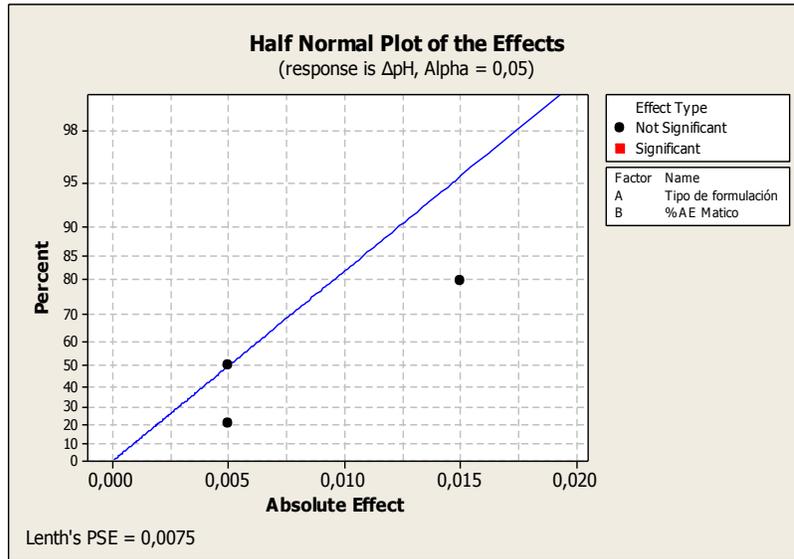


Figura N° 19 Efectos estandarizados normales en Diagrama de Pareto formulaciones en gel y lociones de quitosano Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Elaboración: Las autoras

El análisis de variables pareto de la Figura N° 19, permite determinar que ninguna de las variables analizadas llegan a ser consideradas como un factor crítico, de tal manera que la estabilidad de las formulaciones en gel y loción no se ven afectadas por el tipo de forma cosmética (gel, loción) ni por la concentración del activo .

4.3.2.2 Análisis de varianza de formas cosméticas: loción y gel que contienen Marco (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Tabla 27 Análisis de varianza para ΔpH en formulaciones de Matico

Two-way ANOVA: ΔpH versus Concentración A.E. Matico (%). Forma cosmética

Source	DF	SS	MS	F	P
Concentración A.E. Matic	1	0,000025	0,000025	1,00	0,500
Forma cosmética	1	0,000225	0,000225	9,00	0,205
Error	1	0,000025	0,000025		
Total	3	0,000275			

S = 0,005 R-Sq = 90,91% R-Sq(adj) = 72,73%

Elaboración: Las autoras

El análisis de varianza muestra que el estadístico P tanto de la forma cosmética como de la concentración del activo son mayores al nivel de significancia establecido para el análisis $\alpha=0.05$, por lo que estos factores no son considerados críticos en la estabilidad de las formulaciones en gel y loción para Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), este análisis también es corroborado por el gráfico pareto.

4.3.3 Interpretación de todos los resultados obtenidos en la estabilidad de formulaciones del Diseño Factorial Completo

A continuación son detalladas las características de las formulaciones estables, para su identificación se sigue la misma abreviación propuesta desde el primer diseño, manteniendo el secuencial de acuerdo al número de fórmula que corresponda consecutivamente.

El análisis estadístico, determina que en las formulaciones basadas en geles de carbómero y lociones de quitosano, no se ve afectada su estabilidad por el tipo de formulación ni por el contenido del principio activo, tanto para el extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y para el aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Teniéndose las siguientes formulaciones estables para ser utilizadas en la evaluación de actividad antifúngica in vitro:

Tabla 28 Composición de fórmulas estables para extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Nº fórmula	Concentración extracto de Marco (ppm)	Tipo de formulación
13MR	600	Loción de quitosano
14MR	600	Gel carbómero
15MR	1200	Loción de quitosano
16MR	1200	Gel de carbómero

Elaboración: Las autoras

Tabla 29 Composición de fórmulas estables para Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Nº fórmula	Concentración A.E. de Matico (%)	Tipo de formulación
18MT	8	Loción de quitosano
19MT	4	Gel carbómero
20MT	4	Loción de quitosano
21MT	8	Gel de carbómero

Elaboración: Las autoras

4.4 REFORMULACIONES ADICIONALES DE LAS FORMAS: CREMA, LOCIÓN Y GEL

Los resultados de la actividad antifúngica *in vitro* y el análisis estadístico realizado determinan en primera instancia que no hay actividad antifúngica con las concentraciones establecidas inicialmente de los activos, razón por la cual es considerado el incremento de concentración del extracto blando de Marco y del aceite esencial de Matico en formulaciones de loción, crema y gel de la siguiente manera:

Tabla 30 Composición de fórmulas estables para extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Nº fórmula	Concentración extracto de Marco (%)	Tipo de formulación
17MR	1	Loción de quitosano
18MR	1	Gel carbómero
19MR	3	Loción de quitosano
20MR	3	Gel de carbómero
21MR	1	Crema
22MR	3	Crema

Elaboración: Las autoras

Tabla 31 Composición de fórmulas estables para Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

Nº fórmula	Concentración A.E. de Matico (%)	Tipo de formulación
22MT	10	Loción de quitosano
23MT	15	Gel carbómero
24MT	15	Loción de quitosano
25MT	10	Gel de carbómero
26MT	10	Crema
27MT	15	Crema

Elaboración: Las autoras

4.5 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro*

La evaluación antifúngica *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231 fue realizada por triplicado en las fórmulas seleccionadas como estables, de la siguiente manera:

4.5.1 Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Tabla 32 Halos de inhibición de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 en formulaciones de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

Nº fórmula	Concentración extracto Marco (ppm)	Halos de inhibición (mm) <i>Trichophyton mentagrophytes</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MR	700	0	0	0	23,51	0
2MR	600	0	0	0	26,34	0
3MR	500	0	0	0	23,33	0
4MR	500	0	0	0	25,63	0
5MR	700	0	0	0	24,06	0
6MR	700	0	0	0	23,30	0
7MR	600	0	0	0	25,29	0
8MR	600	0	0	0	26,10	0
9MR	700	0	0	0	25,89	0
10MR	600	0	0	0	24,15	0
11MR	3500	0	0	0	25,62	0
12MR	7000	0	0	0	23,86	0
13MR	600	0	0	0	25,68	0
14MR	600	0	0	0	23,61	0

N° fórmula	Concentración extracto Marco (ppm)	Halos de inhibición (mm) <i>Trichophyton mentagrophytes</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
15MR	1200	0	0	0	24,16	0
16MR	1200	0	0	0	23,63	0
17MR	10000 (1%)	0	0	0	24,43	0
18MR	10000 (1%)	0	0	0	25,20	0
19MR	30000 (3%)	0	0	0	25,04	0
20MR	30000 (3%)	0	0	0	25,85	0
21MR	10000 (1%)	0	0	0	23,95	0
22MR	30000 (3%)	0	0	0	25,04	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que las 22 muestras distribuidas entre cremas, geles y lociones que contienen extracto de marco (*Ambrosia arborescens* Mill) en un rango de concentración de 500 a 30000ppm no presentan actividad antifúngica para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*.

Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta lo cual es importante debido a que las formulaciones que contienen quitosano fueron solubilizadas en solución de ácido láctico el cual podría tener algún tipo de efecto antifúngico, sin embargo con los resultados se descarta que puedan generarse falsos positivos con las formulaciones.

Tabla 33 Halos de inhibición de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 en formulaciones de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

N° fórmula	Concentración extracto Marco (ppm)	Halos de inhibición (mm) <i>Trichophyton rubrum</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MR	700	0	0	0	24,77	0
2MR	600	0	0	0	21,63	0
3MR	500	0	0	0	24,01	0
4MR	500	0	0	0	22,46	0
5MR	700	0	0	0	22,95	0
6MR	700	0	0	0	25,07	0
7MR	600	0	0	0	24,24	0
8MR	600	0	0	0	24,53	0
9MR	700	0	0	0	23,27	0
10MR	600	0	0	0	21,45	0
11MR	3500	0	0	0	24,87	0
12MR	7000	0	0	0	24,81	0
13MR	600	0	0	0	22,33	0
14MR	600	0	0	0	25,26	0
15MR	1200	0	0	0	22,67	0
16MR	1200	0	0	0	22,96	0
17MR	10000 (1%)	0	0	0	24,01	0
18MR	10000 (1%)	0	0	0	24,46	0
19MR	30000 (3%)	0	0	0	25,22	0
20MR	30000 (3%)	0	0	0	22,42	0
21MR	10000 (1%)	0	0	0	23,30	0
22MR	30000 (3%)	0	0	0	24,28	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que las 22 muestras distribuidas entre cremas, geles y lociones que contienen extracto de marco (*Ambrosia arborescens* Mill) en un rango de concentración de 500 a 30000ppm no presentan actividad antifúngica para *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*. Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta lo cual es importante debido a que las formulaciones que contienen quitosano fueron solubilizadas en solución de ácido láctico el cual podría tener algún tipo de efecto antifúngico, sin embargo con los resultados se descarta que puedan generarse falsos positivos con las formulaciones.

Tabla 34 Halos de inhibición de *Microsporium canis* ATCC 36299 en formulaciones de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

N° fórmula	Concentración extracto Marco (ppm)	Halos de inhibición (mm) <i>Microsporium canis</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MR	700	0	0	0	19,80	0
2MR	600	0	0	0	17,82	0
3MR	500	0	0	0	14,10	0
4MR	500	0	0	0	10,11	0
5MR	700	0	0	0	19,50	0
6MR	700	0	0	0	13,03	0
7MR	600	0	0	0	16,94	0
8MR	600	0	0	0	17,76	0
9MR	700	0	0	0	13,59	0
10MR	600	0	0	0	15,94	0
11MR	3500	0	0	0	16,43	0
12MR	7000	0	0	0	9,66	0
13MR	600	0	0	0	11,87	0
14MR	600	0	0	0	9,13	0
15MR	1200	0	0	0	17,20	0
16MR	1200	0	0	0	13,70	0
17MR	10000 (1%)	0	0	0	14,18	0
18MR	10000 (1%)	0	0	0	14,08	0
19MR	30000 (3%)	0	0	0	18,15	0
20MR	30000 (3%)	0	0	0	14,13	0
21MR	10000 (1%)	0	0	0	9,73	0
22MR	30000 (3%)	20,65	17,15	17,62	15,55	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que 21 de 22 muestras distribuidas entre cremas, geles y lociones que contienen extracto blando de marco (*Ambrosia arborescens* Mill) en un rango de concentración de 500 a 30000ppm no presentan actividad antifúngica para *Microsporium canis* ATCC 36299, sin embargo se evidencia que la Fórmula N°22MR (crema) si presenta efecto antifúngico. Los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*. Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta descartando falsos positivos que pudieran ser generados por las formulaciones sin activos.

Tabla 35 Halos de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 en formulaciones de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

N° fórmula	Concentración extracto Marco (ppm)	Halos de inhibición (mm) <i>Candida albicans</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MR	700	0	0	0	18,34	0
2MR	600	0	0	0	18,14	0
3MR	500	0	0	0	18,43	0
4MR	500	0	0	0	19,84	0
5MR	700	0	0	0	17,95	0
6MR	700	0	0	0	17,11	0
7MR	600	0	0	0	15,60	0
8MR	600	0	0	0	16,89	0
9MR	700	0	0	0	17,23	0
10MR	600	0	0	0	16,55	0
11MR	3500	0	0	0	18,15	0
12MR	7000	0	0	0	17,82	0
13MR	600	0	0	0	16,63	0
14MR	600	0	0	0	17,79	0
15MR	1200	0	0	0	20,46	0
16MR	1200	0	0	0	19,44	0
17MR	10000 (1%)	14,25	16,78	15,91	17,93	0
18MR	10000 (1%)	0	0	0	19,07	0
19MR	30000 (3%)	23,02	22,10	22,87	17,27	0
20MR	30000 (3%)	0	0	0	18,79	0
21MR	10000 (1%)	16,75	15,48	16,20	18,07	0
22MR	30000 (3%)	22,79	20,98	20,27	17,94	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que 4 formulaciones de las 22 evaluadas, si presentan actividad antifúngica para *Candida albicans* ATCC 10231, estas formulaciones corresponden a cremas y lociones en rangos de concentración del 1 al 3% de extracto de marco (*Ambrosia arborescens* Mill). Los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*. Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta descartando falsos positivos que pudieran ser generados por las formulaciones sin activos.

4.5.2 Aceite esencial de Matico (*Aristeguetia glutinosa* Lam)

Tabla 36 Halos de inhibición de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 en formulaciones de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

N° fórmula	Concentración A.E. Matico (%)	Halos de inhibición (mm) <i>Trichophyton mentagrophytes</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MT	5	0	0	0	26,64	0
2MT	5	0	0	0	25,24	0
3MT	4	0	0	0	22,87	0
4MT	3	0	0	0	23,34	0
5MT	3	0	0	0	24,50	0
6MT	5	0	0	0	23,98	0
7MT	5	0	0	0	25,44	0
8MT	4	0	0	0	22,87	0
9MT	5	0	0	0	24,33	0
10MT	4	0	0	0	24,48	0
11MT	3	0	0	0	26,01	0
12MT	3	0	0	0	24,39	0
13MT	5	0	0	0	24,48	0
14MT	3	0	0	0	25,00	0
15MT	4	0	0	0	25,42	0
16MT	8	0	0	0	23,65	0
17MT	10	0	0	0	25,51	0
18MT	8	0	0	0	25,77	0
19MT	4	0	0	0	25,45	0
20MT	4	0	0	0	25,81	0
21MT	8	0	0	0	23,88	0
22MT	10	0	0	0	25,00	0
23MT	15	0	0	0	22,79	0
24MT	15	0	0	0	22,54	0
25MT	10	0	0	0	24,64	0
26MT	10	0	0	0	25,66	0
27MT	15	0	0	0	27,66	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que las 27 muestras distribuidas entre cremas, geles y lociones con aceite esencial de matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) en un rango de concentración de 3 a 15% no presentan actividad antifúngica para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in*

vitro. Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta descartando falsos positivos que pudieran ser generados por las formulaciones sin activos.

Tabla 37 Halos de inhibición de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 en formulaciones de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

N° fórmula	Concentración A.E. Matico (%)	Halos de inhibición (mm) <i>Trichophyton rubrum</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MT	5	0	0	0	24,53	0
2MT	5	0	0	0	25,11	0
3MT	4	0	0	0	25,57	0
4MT	3	0	0	0	24,86	0
5MT	3	0	0	0	24,26	0
6MT	5	0	0	0	23,80	0
7MT	5	0	0	0	21,79	0
8MT	4	0	0	0	23,08	0
9MT	5	0	0	0	23,22	0
10MT	4	0	0	0	23,12	0
11MT	3	0	0	0	24,26	0
12MT	3	0	0	0	23,52	0
13MT	5	0	0	0	24,15	0
14MT	3	0	0	0	22,64	0
15MT	4	0	0	0	23,92	0
16MT	8	0	0	0	23,28	0
17MT	10	0	0	0	22,54	0
18MT	8	0	0	0	24,57	0
19MT	4	0	0	0	20,97	0
20MT	4	0	0	0	23,31	0
21MT	8	0	0	0	24,30	0
22MT	10	0	0	0	25,04	0
23MT	15	0	0	0	25,36	0
24MT	15	0	0	0	23,28	0
25MT	10	0	0	0	24,47	0
26MT	10	0	0	0	23,30	0
27MT	15	0	0	0	24,99	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que las 27 muestras distribuidas entre cremas, geles y lociones con aceite esencial de matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) en un rango de concentración de 3 a 15% no presentan actividad antifúngica para *Trichophyton rubrum*

ATCC 28188, los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*. Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta descartando falsos positivos que pudieran ser generados por las formulaciones sin activos.

Tabla 38 Halos de inhibición de *Microsporium canis* ATCC 36299 en formulaciones de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

N° fórmula	Concentración A.E. Matico (%)	Halos de inhibición (mm) <i>Microsporium canis</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MT	5	0	0	0	13,41	0
2MT	5	0	0	0	14,13	0
3MT	4	0	0	0	10,39	0
4MT	3	0	0	0	16,74	0
5MT	3	0	0	0	10,41	0
6MT	5	0	0	0	13,72	0
7MT	5	0	0	0	17,12	0
8MT	4	0	0	0	16,75	0
9MT	5	0	0	0	21,04	0
10MT	4	0	0	0	11,20	0
11MT	3	0	0	0	16,94	0
12MT	3	0	0	0	17,36	0
13MT	5	0	0	0	11,91	0
14MT	3	0	0	0	15,64	0
15MT	4	0	0	0	14,79	0
16MT	8	0	0	0	12,64	0
17MT	10	0	0	0	14,16	0
18MT	8	0	0	0	13,99	0
19MT	4	0	0	0	15,45	0
20MT	4	0	0	0	13,23	0
21MT	8	0	0	0	14,77	0
22MT	10	0	0	0	12,68	0
23MT	15	0	0	0	17,82	0
24MT	15	0	0	0	13,07	0
25MT	10	0	0	0	12,27	0
26MT	10	0	0	0	17,56	0
27MT	15	0	0	0	15,91	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que las 27 muestras distribuidas entre cremas, geles y lociones con aceite esencial de matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) en un rango de concentración de 3 a 15% no presentan actividad antifúngica para *Microsporum canis* ATCC 36299, los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*. Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta descartando falsos positivos que pudieran ser generados por las formulaciones sin activos.

Tabla 39 Halos de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 en formulaciones de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

N° fórmula	Concentración A.E. Matico (%)	Halos de inhibición (mm) <i>Candida albicans</i>				
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Control (+)	Control (-)
1MT	5	0	0	0	17,16	0
2MT	5	0	0	0	18,73	0
3MT	4	0	0	0	17,59	0
4MT	3	0	0	0	15,43	0
5MT	3	0	0	0	17,98	0
6MT	5	0	0	0	18,14	0
7MT	5	0	0	0	16,59	0
8MT	4	0	0	0	18,18	0
9MT	5	0	0	0	18,27	0
10MT	4	0	0	0	18,38	0
11MT	3	0	0	0	17,65	0
12MT	3	0	0	0	17,37	0
13MT	5	0	0	0	17,80	0
14MT	3	0	0	0	17,64	0
15MT	4	0	0	0	18,15	0
16MT	8	0	0	0	18,06	0
17MT	10	0	0	0	17,56	0
18MT	8	0	0	0	17,70	0
19MT	4	0	0	0	19,28	0
20MT	4	0	0	0	18,17	0
21MT	8	0	0	0	17,97	0
22MT	10	13,90	13,40	13,87	18,76	0
23MT	15	0	0	0	16,85	0
24MT	15	18,99	17,80	18,21	18,22	0
25MT	10	0	0	0	17,82	0
26MT	10	0	0	0	17,61	0
27MT	15	0	0	0	17,06	0

Elaboración: Las autoras

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que 2 formulaciones de las 22 evaluadas, si presentan actividad antifúngica para *Candida albicans* ATCC 10231, estas formulaciones corresponden a lociones con concentraciones de 10 y 15% del aceite esencial de matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam). Los resultados del control positivo aseguran que la técnica fue utilizada de manera adecuada, por lo tanto se descarta error en la técnica de evaluación *in vitro*.

Para todos los casos, el control negativo no presenta respuesta lo cual es importante debido a que las formulaciones que contienen quitosano fueron solubilizadas en solución de ácido láctico el cual podría tener algún tipo de efecto antifúngico, sin embargo con los resultados se descarta que puedan generarse falsos positivos con las formulaciones.

4.5.3 Análisis estadístico de resultados

Para el análisis de los resultados de la actividad antifúngica, se establece como metodología el Test de Kruskal-Wallis, el cual es un estudio no paramétrico que se realizó con el software estadístico Minitab 15, para lo cual son considerados los datos obtenidos de los halos de inhibición de las diferentes formulaciones. Se evalúa de forma independiente los resultados obtenidos según el tipo de forma cosmética, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$

Se establecen las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: Ninguna de las concentraciones de principio activo en las formulaciones poseen medianas estadísticamente diferentes.

Hipótesis alternativa: Al menos una de las concentraciones de principio activo en las formulaciones es estadísticamente diferente a las demás.

4.5.3.1 Test de Kruskal-Wallis para el estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones frente a *Tricophyton mengagrophytes*

4.5.3.1.1 Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

4.5.3.1.1.1 Cremas

Tabla 40 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Tricophyton mengagrophytes*

Kruskal-Wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
500	3	0,000000000	12,5	0,00
600	3	0,000000000	12,5	0,00
700	3	0,000000000	12,5	0,00
1200	3	0,000000000	12,5	0,00
3500	3	0,000000000	12,5	0,00
7000	3	0,000000000	12,5	0,00
10000	3	0,000000000	12,5	0,00
30000	3	0,000000000	12,5	0,00
Overall	24		12,5	

H = 0,00 DF = 7 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.1.1.2 Lociones

Tabla 41 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Tricophyton mengagrophytes*

Kruskal-Wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.1.1.3 Geles

Tabla 42 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Tricophyton mengagrophytes*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.1.2 Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

4.5.3.1.2.1 Cremas

Tabla 43 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Tricophyton mengagrophytes*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
3	3	0,000000000	9,5	0,00
4	3	0,000000000	9,5	0,00
5	3	0,000000000	9,5	0,00
8	3	0,000000000	9,5	0,00
10	3	0,000000000	9,5	0,00
15	3	0,000000000	9,5	0,00
Overall	18		9,5	

H = 0,00 DF = 5 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.1.2.2 Lociones

Tabla 44 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Tricophyton mengagrophytes*

kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.1.2.3 Geles

Tabla 45 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Tricophyton mengagrophytes*

kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.2 Test de Kruskal-Wallis para el estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones frente a *Tricophyton rubrum*

4.5.3.2.1 Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

4.5.3.2.1.1 Cremas

Tabla 46 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Tricophyton rubrum*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)					
Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z	
500	3	0,000000000	12,5	0,00	
600	3	0,000000000	12,5	0,00	
700	3	0,000000000	12,5	0,00	
1200	3	0,000000000	12,5	0,00	
3500	3	0,000000000	12,5	0,00	
7000	3	0,000000000	12,5	0,00	
10000	3	0,000000000	12,5	0,00	
30000	3	0,000000000	12,5	0,00	
Overall	24		12,5		

H = 0,00 DF = 7 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.2.1.2 Lociones

Tabla 47 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Tricophyton rubrum*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.2.1.3 Geles

Tabla 48 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Tricophyton rubrum*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.2.2 Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

4.5.3.2.2.1 Cremas

Tabla 49 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Tricophyton rubrum*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
3	3	0,000000000	9,5	0,00
4	3	0,000000000	9,5	0,00
5	3	0,000000000	9,5	0,00
8	3	0,000000000	9,5	0,00
10	3	0,000000000	9,5	0,00
15	3	0,000000000	9,5	0,00
Overall	18		9,5	

H = 0,00 DF = 5 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.2.2.2 Lociones

Tabla 50 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Tricophyton rubrum*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.2.2.3 Geles

Tabla 51 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Tricophyton rubrum*

kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.3 Test de Kruskal-Wallis para el estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones frente a *Microsporum canis*

4.5.3.3.1 Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

4.5.3.3.1.1 Cremas

Tabla 52 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Microsporum canis*

kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
500	3	0,000000000	8,0	-0,53
600	3	0,000000000	8,0	-0,53
700	3	0,000000000	8,0	-0,53
1200	3	0,000000000	8,0	-0,53
10000	3	0,000000000	8,0	-0,53
30000	3	1,76200E+01	17,0	2,67
Overall	18		9,5	

H = 16,83 DF = 5 P = 0,005 (adjusted for ties)

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 16.83 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 0.005

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido 0.05, se concluye que alguna de las concentraciones difiere su respuesta frente a las otras.

4.5.3.3.1.2 Lociones

Tabla 53 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Microsporum canis*

kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000. Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas

diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.3.1.3 Geles

Tabla 54 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Microsporum canis*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.3.2 Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

4.5.3.3.2.1 Cremas

Tabla 55 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Microsporum canis*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
3	3	0,000000000	9,5	0,00
4	3	0,000000000	9,5	0,00
5	3	0,000000000	9,5	0,00
8	3	0,000000000	9,5	0,00
10	3	0,000000000	9,5	0,00
15	3	0,000000000	9,5	0,00
Overall	18		9,5	

H = 0,00 DF = 5 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.3.2.2 Lociones

Tabla 56 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Microsporum canis*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.3.2.3 Geles

Tabla 57 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Microsporum canis*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.4 Test de Kruskal-Wallis para el estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones frente a *Candida albicans*

4.5.3.4.1 Extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill)

4.5.3.4.1.1 Cremas

Tabla 58 Test de Kruskal-Wallis para cremas con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Candida albicans*

Kruskal-Wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo	N	Median	Ave Rank	Z
500	3	0,000000000	6,5	-1,07
600	3	0,000000000	6,5	-1,07
700	3	0,000000000	6,5	-1,07
1200	3	0,000000000	6,5	-1,07
10000	3	1,62000E+01	14,0	1,60
30000	3	2,09800E+01	17,0	2,67
Overall	18		9,5	

H = 11,84 DF = 5 P = 0,037

H = 16,80 DF = 5 P = 0,005 (adjusted for ties)

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 16.80 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 0.005

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido 0.05, se concluye que alguna de las concentraciones difiere su respuesta frente a las otras. Estas concentraciones corresponden a 10000 y 30000ppm (1% y 3%).

4.5.3.4.1.2 Lociones

Tabla 59 Test de Kruskal-Wallis para lociones con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Candida albicans*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	15,91	2,0	-1,96
30000	3	22,87	5,0	1,96
Overall	6		3,5	

H = 3,86 DF = 1 P = 0,050

Elaboración: Las autoras

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es igual al alfa escogido 0.05, se concluye que alguna de las concentraciones difiere su respuesta frente a la otra.

4.5.3.4.1.3 Geles

Tabla 60 Test de Kruskal-Wallis para geles con extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente a *Candida albicans*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (ppm)	N	Median	Ave Rank	Z
10000	3	0,000000000	3,5	0,00
30000	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.4.2 Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)

4.5.3.4.2.1 Cremas

Tabla 61 Test de Kruskal-Wallis para cremas con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Candida albicans*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
3	3	0,000000000	9,5	0,00
4	3	0,000000000	9,5	0,00
5	3	0,000000000	9,5	0,00
8	3	0,000000000	9,5	0,00
10	3	0,000000000	9,5	0,00
15	3	0,000000000	9,5	0,00
Overall	18		9,5	

H = 0,00 DF = 5 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

4.5.3.4.2.2 Lociones

Tabla 62 Test de Kruskal-Wallis para lociones con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Candida albicans*

Kruskal-wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	13,90	2,0	-1,96
15	3	18,21	5,0	1,96
Overall	6		3,5	

H = 3,86 DF = 1 P = 0,050

H = 3,97 DF = 1 P = 0,050 (adjusted for ties)

Elaboración: Las autoras

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es igual al alfa escogido 0.05, se concluye que alguna de las concentraciones difiere su respuesta frente a la otra.

4.5.3.4.2.3 Geles

Tabla 63 Test de Kruskal-Wallis para geles con aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) frente a *Candida albicans*

Kruskal-Wallis Test on Halo inhibición (mm)

Conc. principio activo (%)	N	Median	Ave Rank	Z
10	3	0,000000000	3,5	0,00
15	3	0,000000000	3,5	0,00
Overall	6		3,5	

H = 0,00 DF = 1 P = 1,000

Elaboración: Las autoras

El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) es de 0 y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es de 1.000.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es mayor al alfa escogido 0.05, se concluye que ninguna de las concentraciones tiene medianas diferentes, no existe diferenciación del resultado generado para las diferentes concentraciones testeadas.

Tabla 64 Resumen del test estadístico de Kruskal-Wallis para las diferentes formulaciones.

Componente activo	Tipo	Tipo de cepas	Conclusión del análisis estadístico ($\alpha=0.05$)
Extracto de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	Crema	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188,	No hay diferencia estadísticamente significativa de las diferentes formulaciones cosméticas en su acción antifúngica frente a estas cepas.
		<i>Microsporium canis</i> ATCC 36299	Al menos una de las concentraciones del principio activo es diferente estadísticamente a las demás con respecto a la respuesta que generan los halos de inhibición. Esto se puede evidenciar en las formulaciones cuya concentración es del 3% la cual muestra actividad antifúngica.
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Al menos una de las concentraciones del principio activo es diferente estadísticamente a las demás con

Componente activo	Tipo	Tipo de cepas	Conclusión del análisis estadístico ($\alpha=0.05$)
			respecto a la respuesta que generan los halos de inhibición. Esto se puede evidenciar en las formulaciones cuya concentración es del 1 y 3% las cuales muestran actividad antifúngica.
	Loción	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	No hay diferencia estadísticamente significativa de las diferentes formulaciones cosméticas en su acción antifúngica frente a estas cepas.
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Al menos una de las concentraciones del principio activo es diferente estadísticamente a las demás con respecto a la respuesta que generan los halos de inhibición. Esto se puede evidenciar en las formulaciones cuya concentración es del 1 y 3% las cuales muestran actividad antifúngica.
Gel	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	No hay diferencia estadísticamente significativa de las diferentes formulaciones cosméticas en su acción antifúngica frente a estas cepas.	
Aceite esencial de matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)	Crema	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	No hay diferencia estadísticamente significativa de las diferentes formulaciones cosméticas en su acción antifúngica frente a estas cepas.
	Loción	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	No hay diferencia estadísticamente significativa de las diferentes formulaciones cosméticas en su acción antifúngica frente a estas cepas.
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Al menos una de las concentraciones del principio activo es diferente estadísticamente a las demás con respecto a la respuesta que generan los halos de inhibición. Esto se puede evidenciar en las formulaciones cuya concentración es del 10 y 15% las cuales muestran actividad antifúngica.
Gel	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	No hay diferencia estadísticamente significativa de las diferentes formulaciones cosméticas en su acción antifúngica frente a estas cepas.	

Elaboración: Las autoras

Se evidencia que los resultados obtenidos de la actividad antifúngica para *Candida albicans* en cremas y lociones que contienen extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill), si son estadísticamente representativos. De tal manera que a continuación, es realizada una prueba t de comparación versus un target, el target corresponde al promedio de las mediciones obtenidas para el control positivo de *Candida albican*, una crema de clotrimazol.

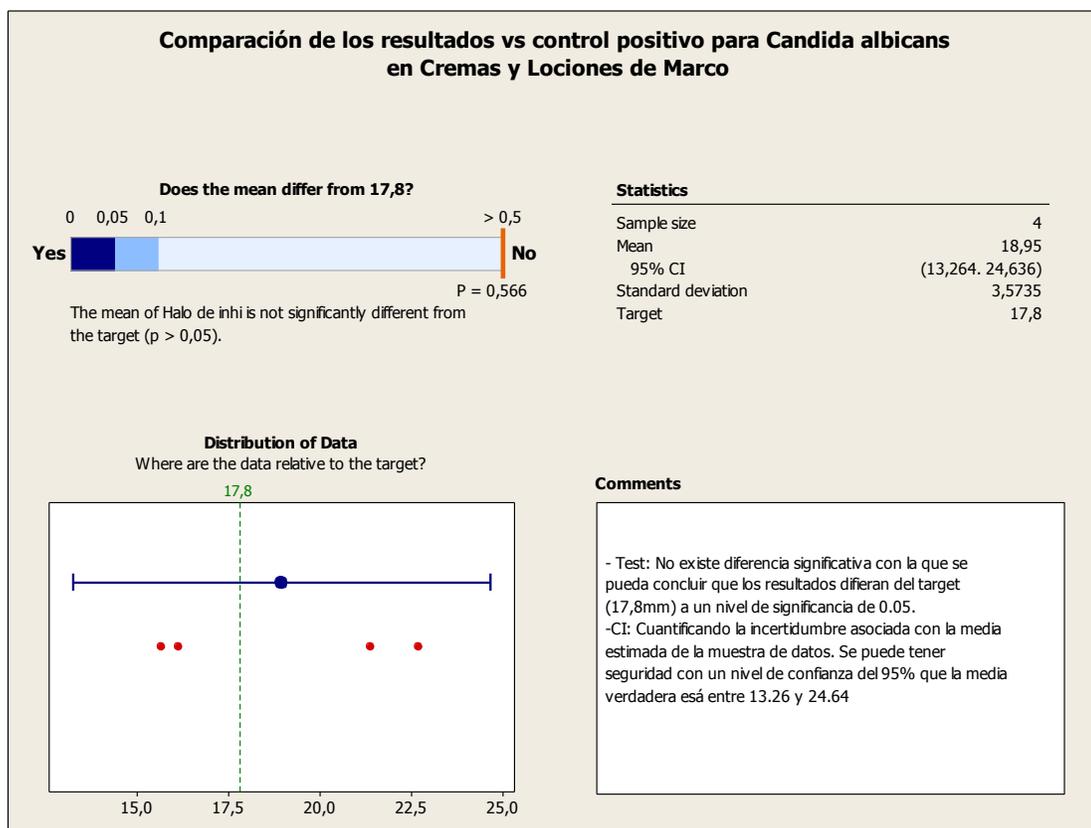


Figura N° 20 Comparación de formulaciones de cremas y lociones de Marco (*Ambrosia arborescense* Mill) versus clotrimazol

Elaboración: Las autoras

Mostrándose que el estadístico p (0.566) es mayor que el valor de significancia propuesto para el estudio, $\alpha=0.05$. Con lo cual, se demuestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las formulaciones de cremas y lociones de Marco en concentraciones del 1% y 3% frente a la referencia antifúngica comercial que corresponde a clotrimazol.

Para el caso de las formulaciones de lociones que contienen Matico, no es llevada a cabo esta comparación, debido a que contiene una elevada concentración del aceite esencial (10% y 15%) para generar respuesta por lo que no se justifica la comparación frente a una crema comercial de clotrimazol.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La presente investigación permite comprobar la hipótesis alternativa, en la cual se establecía que al menos una de las formulaciones cosméticas presentaría actividad antifúngica, análisis que fue llevado a cabo con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ utilizando el Test de Kruskal-Wallis. Evidenciándose que las formulaciones de cremas y lociones que contienen 1% y 3% de extracto blando de Marco tienen actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Microsporum canis* con crema al 3%. Sin embargo, pese a que fueron utilizadas como concentraciones de partida las analizadas por Ayala y Vásquez en 2014 no se logra evidenciar la actividad *in vitro* de estas cuando están presentes en formulación.
- Se esperaba que la presencia de quitosano además de aportar estabilidad en las formulaciones, repotencie la actividad antifúngica de los activos en formulación, sin embargo con los resultados obtenidos no se puede evidenciar esta acción, ya que para obtener respuesta antifúngica, fue necesario incrementar la concentración de los activos.

- Para el caso de las formulaciones que contienen aceite esencial de Matico, también es demostrada la hipótesis alternativa, en lociones con 10% y 15% del activo, sin embargo no es considerada como una propuesta viable de formulación debido al alto contenido de principio activo, el cual encarecería costes de producción que no le harían competitivo frente a los antimicóticos comerciales como clotrimazol; además el tener altas concentraciones de aceites esenciales en productos podría repercutir en problemas de sensibilización en usuarios.
- La utilización del diseño de experimentos durante la formulación de formas cosméticas o/w estables, permitió definir los factores críticos que afectan la estabilidad de estas fórmulas, basándose principalmente en la razón del volumen de coalescencia versus el volumen total y en variaciones de pH durante un estudio de estabilidad preliminar.
- El análisis estadístico con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, realizado para evaluar los principales factores que influyen en la estabilidad de las formulaciones tipo crema cuyo principio activo es el extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) determina que la presencia de quitosano en fórmulas es un factor que aporta estabilidad. Pese a que en el análisis estadístico, no se muestran como efectos principales el contenido de la fase lipofílica y el contenido de emulsificante, no son descartados como factores debido a que su estadístico (p) es muy cercano al nivel de significancia propuesto.
- Los resultados obtenidos del diseño experimental para evaluación de la estabilidad de las formulaciones en crema de extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill), muestran que se tienen fórmulas más estables cuando contienen las parejas de emulsificantes Steareth2+Steareth21 y Steareth2+Tween 80.
- Las formulaciones en crema de extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) no muestran estabilidad cuando son formuladas con las parejas de emulsificantes Steareth2+Alcohol cetílico y Steareth2+Alcohol estearílico.
- El análisis estadístico con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, realizado para evaluar los principales factores que influyen en la estabilidad de las formulaciones tipo crema cuyo principio activo es el aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), determina que la presencia de quitosano en fórmulas es un factor que aporta

estabilidad. El resto de factores analizados: Tipo de emulsificantes, %Fase lipofílica, %Emulsificante, %AE Matico no son considerados estadísticamente significativos.

- Al comparar los diseños experimentales en crema de formulaciones que contienen y aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), en las formulaciones tipo crema que contienen extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), se aprecia que la matriz experimental muestra mayor estabilidad de las formulaciones de Matico que las de Marco, esto puede evidenciarse en que para cada activo fueron diseñadas 28 formulaciones, presentando estabilidad el 36% de formulaciones de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente al 54% de formulaciones de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam).
- Tanto para las formulaciones en crema, loción y gel se demuestra estadísticamente que la concentración del activo en ambos casos, no es un factor determinante en la inestabilidad de las formulaciones, en los intervalos de 500 a 30000ppm para extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y 3% a 15% de Aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam), siendo esto verificado con pruebas de estabilidad.
- En general, para cada activo fueron diseñadas 40 formulaciones entre cremas, geles y lociones de las cuales presentaron estabilidad el 55% para extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y 68% para aceite esencial Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam).
- Al comparar estadísticamente los resultados generados de las lociones y cremas de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) frente al target “Crema comercial de clotrimazol” en *Candida albicans* bajo las condiciones experimentales de este estudio, se demuestra que no existe diferencia significativa entre las respuestas de ambos.

5.2 RECOMENDACIONES

- Durante el desarrollo experimental de esta investigación se pudo observar que las cremas que contenían estos activos, pese a que en su formulación no contenían preservantes, no mostraban ningún deterioro apreciable organolépticamente habiendo estado almacenadas por un periodo de 6 meses, por lo que se sugiere que quizás

puedan ser utilizados estos activos como preservantes naturales, podrían realizarse estudios de desafío tipo Challenge Test.

- Se recomienda realizar estudios de sinergia entre ambos activos en formulaciones en crema, con la posibilidad de que la presencia de ambos pueda repotenciar el efecto antifúngico siempre y cuando estos estén en proporciones adecuadas, ensayar con concentraciones del extracto blando de Marco y aceite esencial de matico hasta máximo 5%. Por lo que se recomienda hacer un diseño experimental que abarque análisis de superficies de respuesta para poder optimizar las concentraciones necesarias.
- Se recomienda analizar el efecto del grado de desacetilación sobre la respuesta antifúngica que presenta el quitosano y su sinergia frente a activos de propiedades antifúngicas.
- Se podrían diseñar formulaciones en gel utilizando quitosano de alto grado de desacetilación (mayor al 90%) que contenga extracto blando de Marco y/o aceite esencial de Matico, de tal manera que al ser aplicados dérmicamente formen un film (propiedad característica del quitosano) y se pueda evaluar la liberación controlada de los activos sobre dermatomycosis. Similar a Katarzyna en su trabajo de investigación del 2007, en el cual elabora geles de ácido láctico en quitosano para el tratamiento de candidiasis vaginal (KATARZYNA, 2007)
- Durante el periodo de incubación de las placas de prueba, se evidencia que el control positivo (clotrimazol) genera halos de inhibición en un periodo de 3-5 días, mientras que las formulaciones objeto de este estudio tardan más de 7 días, por lo que es muy probable que se deba hacer un estudio de la frecuencia con la que debe ser aplicada determinada dosis de la crema para llegar a tener el mismo tiempo de acción que las cremas antifúngicas existentes en el mercado.
- Los antifúngicos sintéticos existentes en el mercado como ya se ha mencionado pueden ocasionar daños en la piel, por lo que se sugiere hacer un estudio sinérgico entre varios antifúngicos sintéticos junto con extracto blando de Marco y/o aceite esencial de Matico, para de este modo bajar la concentración de uso de estos antifúngicos,

repotenciando a su vez los principios activos naturales, con el objeto de reducir problemas de daño en la piel.

- Realizar un análisis de mercado, evaluando el costo que tendría producir formulaciones cosméticas como las de este estudio versus las cremas antifúngicas existentes ya en el mercado y la aceptación que tendrían estas por parte del usuario.
- Los resultados favorables para *Candida albicans*, sugieren que podrían ser utilizados para la formulación de jabones de uso íntimo, por lo que se recomendaría probar las concentraciones favorables de este estudio en fórmulas cosméticas de este tipo, las cuales puedan tener una capacidad coadyuvante en el tratamiento habitual de estas patologías.

BIBLIOGRAFÍA

ACOFARMA. (2008). *Ácido esteárico*. Recuperado el 03 de Enero de 2014, de http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4322-b7cd165fb833fdb4a7b2544e0567ffbd83a2d6d7/main/files/cido_este_rico.pdf

ACOFARMA. (2007). *Ácido láctico*. Recuperado el 3 de Enero de 2014, de http://www.acofarma.com/jdownloads/Fichas_Tecnicas/a061.htm

ACOFARMA. (2010). *Dimeticona*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2014, de http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4054-0cf92a31f4fc45415ca0d69a1686aa3aea1ce3f9/main/files/Silicona_7047_V_350.pdf

ACOSTA, & SOLIS, M. (1992). *Vademecum de Plantas Medicinales del Ecuador*. Quito, Ecuador: Abya-Yala.

Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae 2010 *Revista Iberoamericana de Micología* 101-103

AESTHETIC MEDICAL GROUP. (2009). Recuperado el 05 de Noviembre de 2014, de Anatomía y Fisiología de la piel: <http://www.stetikmed.cl/desarrollo/articulos-PDF/Steikmed-Anatomia-y-fisiologia-de-la-piel.pdf>

ALBUQUERQUE, C. (2010). Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of candida spp. *Medical Mycology* , 1018-1023.

ALLEVATO M, R. N. (2007). *Antifúngicos* . Buenos Aires, Argentina.

ALVAREZ, M., E., B., & M., D. (1990). *Manual de Técnicas de Microbiología Clínica*. Madrid, España.

ANTON, R., & SALAGER, J. (1986). Emulsion instability in three-phase behavior region of surfactant-alcohol-oil-brine systems. *Journal of Colloid Interface Sci* , 54-59.

ANVISA. (2005). *Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos*. Brasil: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria.

ARISTEGUI, B. (Mayo de 2013). Hongos alergénicos. *Trichophyton rubrum* .

AYALA, S., & VÁSQUEZ, T. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica in vitro del Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia*, glutinosa Lam) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.

BALDRICH, E. S. (26 de Octubre de 2012). *Los conservantes mas utilizados en cosmética*. Obtenido de Conservantes en cosmética dermatológica: <http://www.cosmeticamedida.com/html/blog.php?id=104>

- BARAN, R. (2011). *Clinica Dermatologica*. USA.
- BELEÑO, C. (21 de Febrero de 2013). ENFERMEDADES POR HONGOS. Cartagena, Colombia.
- BENEKE, R. (1980). *Medical mycology Manual, 4ta ed.* Minneapolis: Burgers Publishing Co.
- BHUPENDRA, G., & PRAJAPATI. (2010). Crosslinked chitosan and gel for local drug delivery of clotrimazole. *Journal of Science and Technology* , 43-52.
- CAÑEDO, V., & AMES, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa CIP.
- CASTRO, K. (Noviembre de 2011). *Cándida Albicans*. Obtenido de hongoseneo.blogspot.com:
http://www.educaplay.com/es/recursoseducativos/735936/candida_albicans.htm
- CENIVAM. (2008). Aplicaciones de los aceites esenciales y compuestos naturales en los productos cosmecéuticos para el cuidado de la piel. Bogotá, Colombia: Colciencias.
- COSING-COSMETICS. (2009). *Ingredient: PARAFFINUM LIQUIDUM*. Recuperado el 22 de Diciembre de 2014, de <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details&id=35850>
- COSMETICS INFO. (2008). Recuperado el 4 de Enero de 2014, de <http://cosmeticsinfo.org/ingredient/carbomer-0>
- COSMETICS INFO. (2013). *Triethanolamine*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2014, de <http://cosmeticsinfo.org/ingredient/triethanolamine>
- CRODA. (5 de Noviembre de 2014). *Croda Personal Care*. Obtenido de <http://www.crodapersonalcare.com/home.aspx?view=list&d=content&s=157&r=463&p=3052&inciname=Lanolin>
- CRODA. (Agosto de 2010). Span and Tween. Inglaterra: Home care.
- CRUZ, P. (2009). Elaboración y Control de Calidad de Gel antimicótico de MANZANILLA (Matricaria Chamomilla), MATICO (Aristiguetia glutinosa), MARCO (Ambrosia Arborescens) para Neo- Farmaco. Riobamba: Tesis ESPOCH.
- DÁVILA, C. (Junio de 2010). Optimización del proceso de adsorción de plomo para el tratamiento de aguas sobre quitosano. Quito, Ecuador: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador.

DAVIS, K. (03 de 01 de 2015). *Ehow en español*. Obtenido de Alcohol cetílico y cuidado de la piel: http://www.ehowenespanol.com/alcohol-cetilico-cuidado-piel-sobre_164635/#

DE LA TORRE, L., & NAVARRETE, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito: Herbario Nacional QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE.

DEL POZO, A., JUVÉ, J., & VISCASILLAS, A. (Octubre de 2007). Emulsiones en dermofarmacia: conceptos generales y elementos para su formulación. Barcelona, España: Aula de la Farmacia, Universidad de Barcelona.

DOW CHEMICAL COMPANY. (2012). *Propilenglicol*. Recuperado el 3 de Enero de 2015, de http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_003b/0901b8038003bfb7.pdf?filepath=propyleneglycol/pdfs/noreg/117-01143.pdf&fromPage=GetDoc

FERNÁNDEZ, M. (2008). *Sección V: Emulsiones*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2014, de http://personal.us.es/mfarevalo/recursos/tec_far/emulsiones.pdf

GENOMA SUR. (2013). *GENOMA SUR*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2014, de Sistema Tegmentario: http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_07.htm

GODOY, M., SALINAS, A., & VELASCO, M. (Marzi de 1994). *Determinacion del balance hidrofílico lipofílico (HBL) requerido de grasas y aceites de origen vegetal y animal, paa su utilizacion en las formulaciones farmaceuticas y cosmeticas* . San salvador, El Salvador, Centroamerica.

GONZÁLEZ, M. (2005). Recuperado el 19 de Diciembre de 2014, de UCLA: http://bibmed.ucla.edu/ve/edocs_bmucla/MaterialDidactico/microbiologia/software%20educativo/generalidades.htm

GRUPTA, M. (2006). *Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador and Perú* . Panamá: Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys rUnited Nations Industrial Development Orgnization.

HARTMANN. (1999). Recuperado el 26 de Diciembre de 2014, de Las heridas y su tratamieto: <http://lapielusmp.blogspot.com/>

HERNANDEZ, R. y. (2011). *Plantas Medicinales*. México: Árbol.

Hidalgo, C., Fernández, M., Nieto, O. M., & Paneque, A. A. (2009). Estudios de quitosanos cubanos derivados de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros* , 11-27.

Hidalgo, C., Suárez, Y., & Fernández, M. (2008). Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación. *Ars Pharma*.

IBARRA, M., & PAREDES, E. (Julio de 2013). Eficacia antibacteriana in vitro de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Paico (*Chenopodium ambrosioides* L.) en una formulación cosmética. Quito, Ecuador: Tesis carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana.

KATARZYNA, M. (2007). Studies on Gynecological hydrophilic lactic acid preparations. Part 8: Use of chitosan as lactic acid carrier in intravaginal tablets. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research* , 69-72.

KLINKESORNA, U. (2013). The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization. *Food reviews international* , 371-393.

LABORATORIOS SANITAS. (Abril de 2014). *Clotrimazol + Betametasona*. Obtenido de Farmacisahumasa Web site: <http://www.farmaciasahumada.cl>.

MARTINEZ, J. (14 de Abril de 2012). Cosmetología. *Los Cosméticos: Características Generales* .

MEDLINEPLUS. (10 de Junio de 2012). *Candidiasis cutánea*. Obtenido de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000880.htm>

MICROBIOLOGICS. (2011). *Biocheck AES Microbiologics Cepas de referencia cuantificadas o no*. Recuperado el 18 de Julio de 2014, de http://www.dicsa.es/upload/archivos/cepas_referencia.pdf

MINITAB Inc., "Minitab registrado", versión 15.120.0, Microsoft Windows XP,2006

NARANJO, P. (2010). La Etnomedicina en el Ecuador. *Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación* . Quito , Ecuador: Abya-Yala.

NAVARRETE, F. (2008). Histología de la piel. *Rev. Fac. Medicina Mex 2008* .

NEBRASKA MEDICINE. (2011). Recuperado el 05 de Noviembre de 2014, de Anatomía de la Piel: <http://www.nebraskamed.com/health-library/234174/anatom%C3%ADa-de-la-piel>

OLMO, A. (1995). El libro blanco de la belleza. Madrid, España: Alianza Editorial.

PALENCIA, L. (Abril de 2008). La piel. *Estandarización de pH en la manufactura de formulaciones de emulsiones cosméticas con Hidróxido de Sodio* . Guatemala, Guatemala.

Parada, L. G., Crespín, G. D., Miranda, R., & Katime, I. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros* .

PARK, Y., KIM, M., & PARK, S. (2008). Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* , 29-34.

PARUTA, E. (Junio de 2008). Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister Scientiae en Ingeniería Química. *Emulsiones geles. Influencia de la formulación y fracción de fase dispersada sobre sus propiedades reológicas y estabilidad*. Mérida,, Venezuela.

PEDRIQUE, M. (Febrero de 2002). *Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos*. Recuperado el 2 de Enero de 2015, de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf

PEÑA, A., SÁNCHEZ, N., & CALAHORRA, M. (2013). *BioMed Research International*. Recuperado el 03 de Marzo de 2015, de Effects of chitosan on Candida albicans: Conditions for its antifungal activity: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/527549/>

PONCE, L. (14 de Agosto de 2014). Diseño, Formulación de emulsiones y formas farmacéuticas Líquidas. Santiago de Cali, Colombia.

PROECUADOR. (2012). *Farmacéuticos y Cosméticos*. Recuperado el 2014 de Junio de 08, de <http://www.proecuador.gob.ec/exportadores/sectores/farmaceuticos-y-cosmeticos/>

QUIROZ, M. (2012). Manual de procedimiento de laboratorio docente de microbiología clínica en base a la normativa ISO 9001:2008. 107. Quito, Ecuador: Tesis de Bioquímico Clínico Universidad Central del Ecuador.

RAMIREZ, L., & CASTAÑO, D. (Agosto de 2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Colombia: (U. T. Pereira, Ed.) Scientia et Technica Año XV, 42.

REYES, P., & DI SCIPIO, S. (2012). Caracterización Físico-Química de emulsiones de aceite de maíz en agua. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.* , 56-59.

ROJAS, J., & GARCÍA, A. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Redalyc* , 28-32.

ROUSSOS, S., AQUIAHUATLI, M., BRIZUELA, M., OLMOS, RODRÍGUEZ, & Viniegra. (1989). Producción, conservación y viabilidad de inóculo de hongos filamentosos para las fermentaciones sólidas. *Micol. Neotrop.*

SALAGER, J. (1999). Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Mérida, Venezuela: Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos Universidad de los Andes.

SHIGEIRO, H., & KEIJI, i. H. (1991). Cosmetic and Pharmaceutical Uses of Chitin and Chitosan. *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers* , 95-104.

SIGMA ALDRICH. (2010). Recuperado el 3 de Enero de 2015, de [Http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p8074pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p8074pis.pdf)

SIVGE, G. (2013). New Formulation strategies in topical antifungal therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Science and Applications.* , 56-55.

THE HERBARIE. (2004). *Required HLB for oil/lipids*. Recuperado el 25 de Julio de 2014, de http://www.theherbarie.com/files/resource-center/formulating/Required_HLB_for_Oils_and_Lipids.pdf

THE PERSONAL FORMULATOR. (03 de 01 de 2015). *The Personal Formulator*. Obtenido de http://personalformulator.com/wvss/product_info.php?products_id=1097

UNIDEMA. (9 de Marzo de 2004). *The HLB system*. Recuperado el 27 de Diciembre de 2014, de http://www.lotioncrafter.com/pdf/The_HLB_System.pdf

UNIVERSITY OF MARYLAND MEDICAL CENTER. (2013). Recuperado el 05 de Noviembre de 2014, de La piel: <http://umm.edu/health/medical/spanishency/images/la-piel>

VADEMECUM. (23 de Marzo de 2009). *CLOTRIMAZOL*. Recuperado el 05 de 11 de 2014, de www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c098.htm

VALENCIA, R., PITMAN, N., LEÓN, S., & JORGENSEN, P. (2000). Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Quito, Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

VARELA, J., SERNA, E., TORRES, S., YALUFF, G., & OTROS. (2014). In vivo Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Hydro-Ethanolic extract and Isolated Active Principles from *Aristeguietia glutinosa* Lam and Mechanism of Action Studies. *Molecules* , 8488-8502.

VEGA, F., & MIRANDA, J. (Septiembre de 2009). *Emulsiones Farmacéuticas*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2014, de Facultad de Química, UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Emulsiones_5452.pdf

VERA, M. (2008). Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: *Ambrosia arborescens*. Sangolquí: Departamento en Ciencias de la Vida ESPE.

VILLARES. (2012). Identificación de hongos asociados a infecciones dérmicas en pacientes diabéticos tipo II, que acuden al Hospital Provincial Docente Ambato.

WILKINSON, J. (2008). *Cosmetología de Harry*. España: Ediciones Díaz de Santos.

ANEXOS

Anexo 1 Características de extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) obtenidos por Ayala-Vásquez

		Extracto blando de Marco (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill)	Aceite esencial de Matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam)
Datos geomorfológicos	Ubicación	Laguna de Yahuarcocha	Loma Alto de Reyes
	Coordenadas	0°22'0"N 78°7'0"W	0°21'46"N 78°07'48"O
	m.s.n.m	2190	2405
	Temperatura	15°C	17°C
	Humedad	72%HR	68%HR
% Rendimiento		3.94	0.97
Aspecto		Líquido viscoso, adherente	Líquido fluido
Color		Verde petróleo	Amarillo claro
Olor		acre, penetrante	Aromático
Densidad relativa (g/mL)		1.01	0.86
%Sólidos totales		2.77	No aplica
pH		6.6	5.43
Índice de refracción		No aplica	1.483

Fuente: Ayala-Vásquez 2014

Anexo 2 Características del quitosano obtenido por Dávila-Pazos

%Rendimiento obtención quitina <ul style="list-style-type: none">• Peso caparazones de camarón= 3Kg	7.30
%Rendimiento obtención quitosano <ul style="list-style-type: none">• Peso de quitina= 219g	70.08
%Grado de desacetilación <ul style="list-style-type: none">• CNaOH= 0.1025eq/L• Mquitosano=0.4318• Pto. Inflexión mayor= 45,0• Pto. Inflexión menor=25,0	76.4

Fuente: Las autoras

Anexo 3 Certificado de Herbario Nacional de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) de la especie utilizada por Ayala-Vásquez para obtener el activo utilizado en este estudio

Quito, 22 de Julio del 2014

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponde a:

***Ambrosia arborescens* Mill.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák et Takht.
- Superorden: Asterales Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Benth. & J. Presl
- Género: *Ambrosia* L.
- Especie: *arborescens* Mill.
- Nombre común: Marco



Alvaro J. Pérez Castañeda

Curador de Angiospermas Herbario QCA



Anexo 4 Certificado de Herbario Nacional de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam) de la especie utilizada por Ayala-Vásquez para obtener el activo utilizado en este estudio

Quito, 22 de Julio del 2014.

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponde a:

***Aristeguietia glutinosa* (Lam.) R.M. King & H. Rob.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Nacall ex Takht.
- Superorden: Asterales Takht.
- Orden: Asterales Link.
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Aristeguietia* R.M. King & H. Rob.
- Especie: *glutinosa* (Lam.) R.M. King & H. Rob.
- Nombre común: Matico


Alvaro J. Pérez Castañeda

Curador de Angiospermas Herbario QCA



Anexo 5 Imágenes de la formulación de algunas cremas de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam)



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras

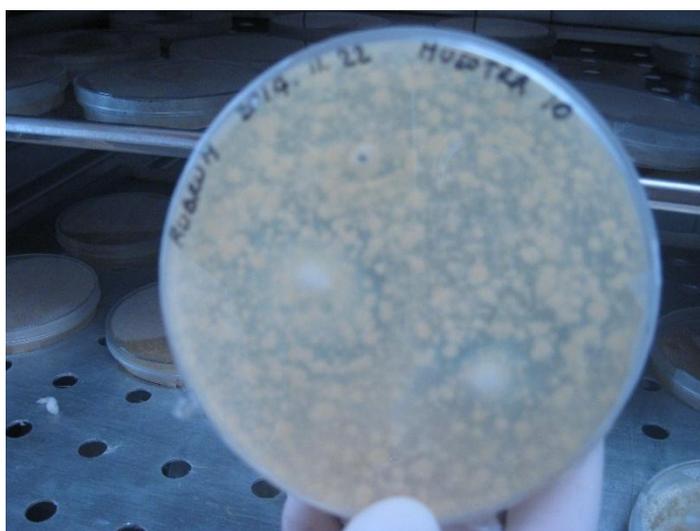


Fuente: Las autoras

Anexo 6 Imágenes de algunas placas en las que no se muestra inhibición



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras

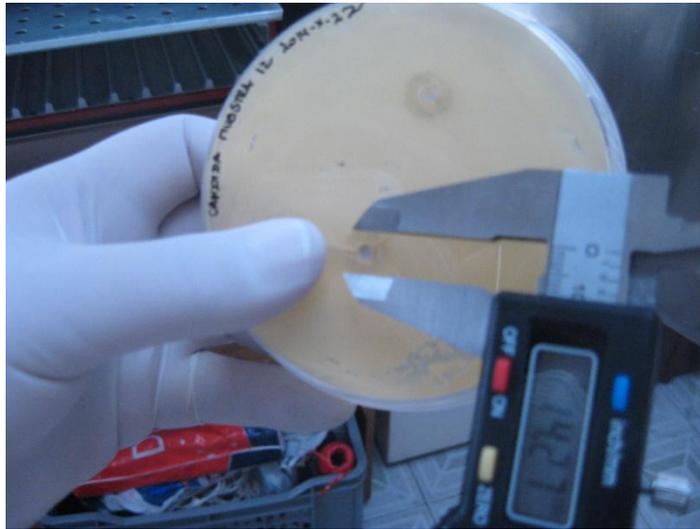
Anexo 7 Imágenes de placas Petri en las que se muestra inhibición de *Candida albicans* y *Microsporum canis*



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras



Fuente: Las autoras