



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BÍOQUIMICA Y FARMACIA

“Diseño y desarrollo de una crema repelente a partir del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens* (Palo santo)”

Trabajo de fin de carrera.

AUTOR:

Torres Armijos, Cynthia Katherine

DIRECTOR:

Ojeda Riascos, Edgar Santiago, BQF

LOJA - ECUADOR

2012

CERTIFICACIÓN

BQF.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

C E R T I F I C A:

Que el presente trabajo, denominado: "Diseño y desarrollo de una crema repelente a partir del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens* (Palo santo)" realizado por el profesional en formación: Torres Armijos Cynthia Katherine; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, Septiembre del 2012

f)

C.I. 1103660328

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Torres Armijos Cynthia Katherine declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Torres Armijos Cynthia Katherine

C. I. 0704408236

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en especial a la Titulación de Bioquímica y Farmacia, por abrir sus puertas brindándome los medios necesarios para así cumplir mis objetivos tanto personales como académicos.

Al Bioquímico Farmacéutico Santiago Ojeda por su asesoría durante la elaboración del presente trabajo. Por su motivación, amistad, sus conocimientos y experiencia invaluable durante mi formación profesional.

A los diferentes áreas que conforman el Departamento de Química, al Instituto de Ecología y Laboratorio de Química, por su asesoría y colaboración.

Finalmente a todas las personas, que de una u otra manera contribuyeron para alcanzar la culminación de mi carrera profesional.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, por ser siempre mi compañía y darme la fortaleza necesaria para no decaer en ningún momento de mi carrera universitaria.

A mi Padre por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida universitaria y estar siempre cuando lo necesito.

A mi madre por enseñarme los valores necesarios para ser una persona capaz de conseguir mis sueños superando las adversidades.

A mis sobrinos Jonathan, Kevin y Allyson por la razón para no desistir y ser fiel a mis sueños y querer siempre ser más.

A mis demás familiares, hermanos, amigos y compañeros por su apoyo incondicional para conseguir mí principal objetivo.

Katherine T.

CONTENIDO

Portada y contraportada.....	I
Certificación de revisión.....	II
Cesión de derechos	III
Agradecimientos.....	IV
Dedicatorias.....	V
Contenido.....	VI
Resumen	XI
Artículo.....	XIII

I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES.....	2
---	----------

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. Introducción.....	5
2.2. Antecedentes.....	8
2.2.1. Repelentes.....	8
2.2.2. Aceites Esenciales.....	8
2.2.3. Aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> (Palo santo)	9
2.2.3.1. Clasificación Taxonómica	9
2.2.3.2. Sinónimos	9
2.2.3.3. Descripción Botánica.....	10
2.2.3.4. Hábitat.....	10
2.2.3.5. Parte utilizada.....	10
2.2.3.6. Composición química.....	11
2.2.3.7. Propiedades y usos.....	11
2.2.4. Formas Farmacéuticas Semisólidas	12
2.2.4.1. Cremas.....	12
2.2.4.2. Clasificación.....	12
2.2.4.3. Componentes principales.....	13
2.2.4.4. Manufactura de cremas.....	15
2.2.4.5. Acondicionamiento.....	15
2.2.4.6. Especificaciones para cremas	16
2.2.5. Estudios de Estabilidad.....	17
2.2.5.1. Tipos de Estabilidad.....	17

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del aceite esencial (<i>B. graveolens</i>)	20
3.1.1. Área de recolección.....	20
3.1.2. Extracción del aceite esencial.....	21
3.2. Estudios de preformulación.....	21
3.2.1. Valoración del principio activo	21
3.2.2. Evaluación de las propiedades físico-químicas del principio activo.....	23

I. Solubilidad	23
II. Densidad relativa	24
III. Índice de refracción	24
3.2.3. Estudio de compatibilidad aceite esencial -excipientes.....	24
3.2.3.1. Diseño factorial de Plackett y Burman.....	27
3.3. Estudios de Formulación	27
3.3.1. Establecimiento de la fórmula	27
3.3.2. Selección de emulgentes.....	27
3.3.3. Formulación	27
3.3.4. Proceso de fabricación.....	28
3.4. Estudio de Estabilidad	29
3.4.1. Predicción de estabilidad.....	30
3.4.1.1 Método de Arrhenius.....	30
3.5. Bioensayo de la actividad repelente.....	31
3.6. Estudio de Toxicidad Aguda por vía dérmica de la crema repelente a partir del aceite esencial de <i>B. graveolens</i>	31

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Estudios de preformulación	35
4.1.1. Valoración del principio activo (<i>B. graveolens</i>)	35
4.2.2. Evaluación de las propiedades físico- químicas del principio activo.....	37
4.2.3. Estudio de compatibilidad del aceite esencial -excipientes.....	37
4.2.3.1. Estudio de compatibilidad Plackett y Burman.....	37
4.2. Estudios de Formulación.....	40
4.3. Estudios de Estabilidad	41
4.3.1. Parámetros organolépticos	41
4.3.2. Parámetros físico-químicos	42
4.3.3. Parámetros microbiológicos.....	44
4.3.4. Predicción de la estabilidad	45
4.3.4.1. Método de Arrhenius.....	45
4.4. Bioensayo de la actividad repelente.....	46
4.5. Estudio de Toxicidad Aguda por vía dérmica de la crema repelente a partir del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i>	47

V. CONCLUSIONES	49
------------------------------	----

VI. RECOMENDACIONES	52
----------------------------------	----

VII. ANEXOS	54
--------------------------	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Solubilidades en términos descriptivos.....	23
Tabla 2. Factores utilizados para el diseño de Plackett y Burman.....	25
Tabla 3. Distribución y acondicionamiento de las mezclas.....	26
Tabla 4. Formulación del producto elaborado.....	27
Tabla 5. Métodos empleados para el estudio de estabilidad.....	30
Tabla 6. Grupos tratados (machos) en el estudio de Toxicidad aguda dérmica.....	32
Tabla 7. Grupos tratados (hembras) en el estudio de Toxicidad aguda dérmica.....	32
Tabla 8. Composición química del aceite esencial de <i>B. graveolens</i>	36
Tabla 9. Características Físico-Químicas del aceite esencial.....	37
Tabla 10. Matriz de ensayos. Determinación de la respuesta mediante GC-MS.....	38
Tabla 11. Significancia de los efectos en función de su respuesta.....	39
Tabla 12. Tabla de STUDENT.....	39
Tabla 13. Formula final de la crema repelente.....	40
Tabla 14. Resultados del análisis organolépticos de la crema.....	41
Tabla 15. Resultados del análisis físico-químico de la crema.....	42
Tabla 16. Prueba de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Densidad vs. Tiempo.....	42
Tabla 17. Prueba de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Ph vs. Tiempo.....	43
Tabla 18. Prueba de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Extensibilidad vs. Tiempo.....	43
Tabla 19. Pruebas de estabilidad microbiológica de la crema repelente.....	45
Tabla 20. Porcentaje de repelencia de la crema durante los 3 meses de estudio usando el test de papel filtro.....	46
Tabla 21. Observaciones Macroscópicas (machos).....	47
Tabla 22. Observaciones Macroscópicas (hembras).....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parámetros desarrollados en la investigación.....	3
Figura 2. Relación entre la tensión superficial y el logaritmo de concentración	14
Figura 3. Mapa del área de recolección	20
Figura 5. Condiciones de operación del GC-MS en la columna DB-5MS.....	22
Figura 6. Diagrama de fabricación de crema de <i>B. graveolens</i>	28
Figura 7. Cromatograma del aceite esencial de <i>B. graveolens</i>	35

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. <i>Bursera graveolens</i> (Palo santo).....	9
Fotografía 2. Frutos de <i>B. graveolens</i> (Palo santo).....	10
Fotografía 3. Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N	21
Fotografía 4. Viales para el diseño Plackett y Burman	58
Fotografía 5. Crema repelente sometida a Estabilidad Acelerada a 30 °C.....	61
Fotografía 6. Crema repelente sometida a Estabilidad Acelerada a 40 °C.....	61
Fotografía 7. Trampa de Luz	62
Fotografía 8. Aspirador de mosquitos	62
Fotografía 9. Bioensayo de Repelencia crema mes 0 (A) y crema mes 3 (B)	62
Fotografía 10. Aerobios mesófilos	63
Fotografía 11. Hongos, mohos y levaduras.....	63
Fotografía 12. <i>Escherichia coli</i>	63
Fotografía 13. <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Fotografía 14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

RESUMEN

Los repelentes a base de plantas se han usado por generaciones en medicina tradicional como protección personal contra las picaduras de algunas especies de insectos. En el presente estudio, el aceite esencial de *Bursera graveolens* (Palo santo) se escogió como ingrediente activo para el diseño de una crema repelente.

A través del ensayo de preformulación se valoró al principio activo y se seleccionó la fórmula final. El producto se sometió a estabilidad acelerada a tres temperaturas diferentes: ambiente, 30 °C y 40 °C; Humedad relativa: 75% ± 5%, con el propósito de evaluar sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas. La bioeficacia de la crema se determinó utilizando el test de papel filtro, mostrando alto efecto repelente, con un porcentaje de repelencia (PR) de 73,82% (clase IV), en el ensayo de toxicidad aguda dérmica de la crema repelente no se observó reacciones en la piel en los animales de experimentación *Wistar*

El efecto repelente es atribuido a los compuestos químicos bioactivos presentes en el aceite esencial de *B. graveolens*, constituyendo una alternativa repelente natural a los repelentes sintéticos con DEET.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DESIGN AND DEVELOPMENT OF A REPELLENT CREAM FROM ESSENTIAL OIL OF *Bursera graveolens* (PALO SANTO)

Katherine Torres¹, Santiago Ojeda², Silvia González²

¹ Biochemistry and Pharmacy, Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja - Ecuador.
e-mail: cktorres@utpl.edu.ec

² Chemistry Department, Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja - Ecuador.
e-mail: esojeda@utpl.edu.ec

Abstract

Plant-based repellents have been used for generations in traditional practice as a personal protection measure against bites of some insect species. In this study, essential oil of *Bursera graveolens* was chosen as active ingredient in repellent cream design.

Through the assay of preformulation was evaluated the essential oil and selected the final formula. The product was subjected to accelerated stability at different temperatures room, 30 °C and 40 °C with the purpose of evaluated physical, chemical, and microbiological characteristics. The bioefficacy of repellent cream was determined using filter-paper test, showed strongest repellency effect on mosquitos, with a PR of 73,82% (class IV). Furthermore was not observed any skin reaction on rats *Wistar* in the acute dermal toxicity assay of repellent cream.

The repellent effect was attributed to bioactive chemical compounds from essential oil. It could be used as an alternative to synthetics repellents with DEET.

Key words: Essential oil of *B. graveolens* (Palo santo), repellent cream, monoterpenes, DEET .

INTRODUCTION

Mosquito borne diseases such as malaria, dengue, are considered to be major health problems ^[1]. The search for effective vaccines is still in progress ^[2]. Mosquito control and personal protection from mosquito bites are currently the most important measures to control these diseases. ^[3]

The use of repellents is an obvious practical and economical mean of preventing the transmission of these diseases to humans. The most common mosquito repellent formulations available on the market contain DEET (N, N-diethyl-3-methylbenzamide), which has shown excellent repellency against mosquitoes and other biting insect ^[4]. However, side

effects after the application vary from mild to severe. ^[5]

To avoid these adverse effects, research alternatives on a variety of botanical substances have been evaluated for their repellency against mosquitoes. ^[6]

In this context, essential oils have received attention as potentially useful bioactive compounds against insects showing a broad spectrum of activity against insect. ^[7-8]

Among the plants of the Ecuadorian flora has been found *Bursera graveolens* commonly called "Palo santo" used in traditional medicine due to its healing properties. As regards the wood, when dry and burned gives off a fragrant smoke that repels mosquitoes. ^[9, 10]

B. graveolens has been the object of phytochemical studies thus in the literature are identified compounds responsible the aroma, characteristic spicy, sweet and balsamic odor^[11]. In the determination of the components of the fruit essential oil from three sites in the province of Loja, were reported no significant differences between the chemical components of essential oil wood and fruits, which identifies components rich in monoterpenes and sesquiterpenes^[10], substances produced by plants as a defense mechanism that could interfere with the basic functions of insect behavior^[12]. It constitutes a potential alternative as natural biodegradable repellent.

MATERIALS AND METHODS

The green fruits of *B. graveolens* used in the present study was procured from

The essential oil was obtained of 10 000 g by hydro-distillation for 2 hours using Clevenger-type apparatus.

Preformulation studies

Valuation of essential oil

The analysis of essential oil was performed using gas chromatograph (Agilent 6890 Series) coupled to mass spectrometer (Agilent 5973 inert series) equipped with a nonpolar column DB5-MS (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm) like separation system. The dilution of oil was made using 10 µL of the essential oil concentrated, diluted in 990 µL dichloromethane.

Physical-Chemical Characteristics of Essential Oil

The solubility of the essential oil was performed using the semiquantitative

method with probable solvent: propyleneglycol, alcohol 70% and glycerin. The solubility was indicated in descriptive terms given by USP-NF 32.

The essential oil constituents were identified on the basis of their mass spectra compared with the spectra of the data base Wiley 7n.1 of the team together with kovats index (KI).

The essential oil density was determined according to the standard ANFOR NF T 75-111, while the determination of refraction index using a refractometer.

Study of compatibility between the essential oil-excipients

For screening purposes, was utilized Plackett – Burman stastical design which used 11 factors at two different levels indicated by the signs (+) and (-), in this case the factors are excipients, three factors are dummy variables included to perform the statistical treatment and 12 mixtures originating from the experimental matrix. The mixtures were obtained combining essential oil with successive portions common excipients for creams: rheological agents, emulsifying, stiffening and antioxidants. 2 g of mixtures were filled in glass vials and then incubated at ambient temperature, 30 °C, 40 °C in thermostatically controlled oven. Table 1 shows the composition of the mixtures.

Table 1. Factors of mixtures

Factors	(+)	(-)
A	Cetostearyl alcohol	Cetyl alcohol
B	Petrolatum solid	Paraffin solid
C	Paraffin liquid	Petrolatum liquid
D	Stearic acid	Wax White
E	Silicone oil	-
F	BHT	α-Tocopherol
G	Tween 40	Tween 80
H	Span 60 (3,3g)	Span 60 (3,5g)

After 8 weeks storage, each mixture was analyzed by (GC-MS), in order to determine the content of active ingredient and detect and quantify impurities or degradation products in the pharmaceutical form.

The data obtained were analyzed using a table that relates the effect for each factor, depending on potency or percentage of identification of the essential oil.

Formulation studies

The excipients were chosen in function of Plackett- Burman design

The essential oil cream was o/w (oil /water) prepared with nonionic surfactants TWEEN and SPAN, their combination produced a dense interfacial film, also was characterized the optimal HLB area of surfactants to obtain the required HLB (BHLr).

The concentrations and applications of the excipients were observed in the *Handbook of pharmaceutical excipients*.^[13]

Stability study

The cream was subjected to stress or accelerated stability for 3 months according to the National Institute of Hygiene and Tropical Medicine "Leopoldo Izquieta Perez" (INH) at 3 different temperatures: 30 °C ± 2 °C, 40 °C ± 2 °C and ambient temperature the city of Loja (21°C) and Relative humidity: 75% ± 5%. Generally the prediction shelf-life of product is using Arrhenius method.

The samples were evaluated at different time intervals 0, 1, 2, and 3 months in order to examine organoleptic, physical-chemical and microbiological parameter. The methods and techniques for stability tests are summarized in Table 2.

Table 2. Techniques and method used on the stability study

PARAMETER	MÉTOD
ORGANOLEPTIC	Appearance, consistency, odor and color
PHYSICO-CHEMICAL	pH, Density, Extensibility, Concentration (GC-MS)
MICROBIOLOGICAL	<i>Mesophilic aerobic</i> (USP 32) <i>Fungi, molds and yeasts</i> (USP 32) <i>Escherichia coli</i> (USP 32) <i>Staphylococcus aureus</i> (USP 32) <i>Speudomona aeruginosa</i> (USP 32)

Repellent Activity Bioassays

Repellency tests were conducted following the method proposed by Talukder & Howse^[14]. Filter-paper circles of 9 cm in diameter were cut in half. The samples essential oil creams were applied on one half. The treated and the untreated half-circles were placed contiguously on the Petri dishes and 10 adult mosquitoes known as *zancudos* were released on each dish. Mosquitos present in each half circle were counted at hourly intervals for 4 h after treatment. Data were converted to express percentage repulsion (PR) using the following formula: $PR (\%) = (N_c - 50) \times 2$, where N_c is the percentage of *zancudos* present in the control half.

Mean values were classified depending on the following scale:

Class	Repellency rate (%)
0	>0.01 a < 0.1
I	0,1 a 20
II	20,1 a 40
III	40,1 a 60
IV	60,1 a 80
V	80,1 a 100

Acute Dermal Toxicity Assay

Through the acute dermal toxicity assay was possible determined the effects produced in the experimental animal exposed by the dermal via (dose unique) the palo santo cream.

Experimental Design: Acute Toxicity to dermal product was determined by methods described in the protocol of the OECD TG 402 (Organization for Economic Trade and Development, 2001).

For testing, used female and male rats (*Wistar*) weigh mean \pm 20%, from the Laboratory so the quarantine process was considered not applicable.

Treatments: The test included two groups treated for female and male animals. Table 3

Bioassay

One day before the start of the assay, animals skin area was prepared for experimentation in each of the animals. Semi-occlusive patch was applied with the amount previously calculated according to the weight. After dosage clinically animals, were studied with the possible outcomes of death or absence of clinical signs until slaughter 14 days after administration of the product.

These studies were carried out in the laboratory PROGECA School of Chemical Sciences, University of Guayaquil

RESULTS AND DISCUSSION

Preformulation studies

The essential oil of *B. graveolens* is a viscous liquid at room temperature and under refrigeration, colorless and balsamic odor (characteristic).

The essential oil was mainly composed by monoterpenes and sesquiterpenes. The table 4 reported results of the compounds that constitute the greater proportion from the quantitative point of view in the oil corresponding to 98.02%. The identified constituents and their composition (percentage), are listed in order of elution, from the DB5-MS column.

These results are supported with the investigation of Salas *et al.* 2006^[10] who reported the presence of the eight compounds in the essential oil of green fruit.

Observing in essential oil quantitative analysis the predominant components was limonene (52.82%). This compound has been approved by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) for usage as a natural pesticide and insect however research carried out showed that limonene has a significant repellency at high levels, it repellent significantly fewer insect that did equivalent concentration of pyrethrins.^[15-16]

Table 3. Groups of animals subjected to the study of acute dermal toxicity

GROUPS	No. ANIMALS	Concentration (mg p.a. /kg body weight)
A Control (Saline solution ClNa 0,9%)	3	2000
B (essential oil cream)	6	2000

Table 4. Chemical composition of essential oil of *B. graveolens*

Peaks	COMPOUNDS	Retention indexes		% Relative amount
		RI ^a	RI ^{ref}	DB5- MS
1	α -Thujene	866	905	0,26
2	α -pinene	871	907	0,99
3	Sabinene	923	966	0,29
4	p-cymene	1006	1002	1,51
5	α -phellandrene	1022	1024	35,55
6	Limonene	1029	1029	52,82
7	Menthofuran	1158	1164	5,32
8	Germacrene- D	1469	1451	1,28
Total %				98,02

RI: retention index in the nonpolar column (DB5-MS)

a= compounds ordered according to the elution order in the column DB5-MS

ref= references

The mechanisms of toxicity of essential oils have not been identified however Neuro *et al.* 2010 ^[17], stated that the repellent activity has been linked to the presence of monoterpenes and sesquiterpenes, in some cases, these chemicals can work synergistically, improving their effectiveness.

Physical-Chemical Characteristics

The following table (5) shows the results of physicochemical analysis.

Table 5. Physical-Chemical Characteristics

ANALISYS	RESULT
Solubility	Propylenglicol: Insoluble Glycerin: Freely soluble Alcohol 70%: Slightly soluble
Relativ density	0,844g /cm ³
Refraction index	1,473

The vehicle for including the active ingredient in semi-solid dosage form. For the relative density and the refractive index were considered the parameters established for essential oil the Essential oil area. Data obtained (Table 5) showed that the essential oil has been presented good conditions for carrying out the subsequent process.

Study of compatibility between the essential oil-excipients

The study was performed by GC-MS the results are shown in table 6.

Comparing the values of "t" to the table of Student for 3 degrees of freedom, the factor D consisting of the excipients: stearic acid (+) and white wax (-) is greater than t tabulated 5,84, resulted significant at a probability of 99%. The responses for factor D, white wax in contrast with high values of the mixtures with stearic acid resulted incompatible for the pharmaceutical form.

Table 6. Significance of effects depending on their response

Mixture	Resp.	Fac.	Effec.	E ² d	"t"	Significance			
						90%	97,50%	99,00%	99.9%
						p= 0,05	p= 0,025	p= 0,01	p= 0,005
1	75	1				*	*	*	*
2	82	A	1,33		0,296951947	*	*	*	*
3	80	B	0,67		0,149592334	*	*	*	*
4	57	C	2,3		0,513525923	*	*	*	*
5	64	D	26,7		5,961366147	**	**	**	*
6	55	E	4		0,893088561	*	*	*	*
7	80	F	2,3		0,513525923	*	*	*	*
8	50	G	2,7		0,602834779	*	*	*	*
9	92	H	4		0,893088561	*	*	*	*
10	90	J	2	4	0,446544281	*	*	*	*
11	53	K	7,3	53,29	1,629886625	*	*	*	*
12	60	L	1,7	2,89	0,379562639	*	*	*	*

(*) Not significant, (**) Significant.

The chromatograms of the mixtures with white wax, showed a diminution in the quantitative composition of the essential oil of *B. graveolens*; in comparison with the other mixtures. The white wax structure shows high susceptibility to rancidity process that is evidenced by the significant change of appearance. ^[18]

Formulation

The mixture 9 was selected for formulating the cream (Table 6). This mixture reported a better response and no interaction between the components and was integrated by cetyl alcohol , petrolatum solid, petrolatum liquid, stearic acid, silicone oil, α -tocopherol, tween 40, span 60, methylparaben, propylparaben propylenglicol, glycerin and purified water.

The formula was manufactured following standards specified for the product.

Stability study

In all conditions tested during the three months the essential oil cream remained homogeneous, creamy texture, and preserving the balsamic odor. During the period of stability only in in samples stored 40 °C, there was a slight color change to the third month of study, but remains white.

Table 7 shows the values for density, pH, extensibility, and concentration of essential oil (%) obtained during the third month.

The density, pH, extensibility parameters were statistically analyzed by ANOVA, obtaining no significant differences (with a limit of 95%) among the evaluated parameters and temperature during three months of evaluation.

Table 7. Results physico-chemical analysis

ANALYSIS	CONDITIONS	MONTHS			
		0	1	2	3
Density g/cm³	Room	0,7746	0,83098	0,8258	0,7979
	30 °C	0,7746	0,8907	0,8597	0,8545
	40 °C	0,7746	0,8638	0,8597	0,85028
pH	Room	5,6	5,8	5,8	5,9
	30 °C	5,6	5,9	5,9	6
	40 °C	5,6	5,8	6	6
Extensibility mm²	Room	1396,3	1689,5	1944,2	2061,2
	30 °C	1396,3	1233,7	2078,4	1689,5
	40 °C	1396,3	1396,3	1689,5	1846,6
Concentration (%)	Room	98,02	91,03	78,12	72,29
	30 °C	98,02	90,08	73,88	70,64
	40 °C	98,02	91,72	82,63	70,04

In addition, the stability study reported, no significant changes in relation to microbiological contaminants performed on samples during three months, indicating any contamination on the product.

The concentration of essential oil on product evaluated in three months to the different study conditions by GC-MS. (Table 7). Comparing the values in the table for samples at time zero and the data obtained during the 3-month evaluation, there is considerable decrease from the first month of active ingredient.

The product was filled in collapsible plastic material, for use in majority topical forms however this material presented permeability to volatile products consequently, Suñe *et al.* 2000 ^[19], claimed that the volatilization essential oil components occurred thereby influencing the stability of the product.

This was confirmed by comparison the type of container used in the Plackett and Burman design the concentration of essential oils remained for 2 months showing that the only factor responsible for the decreased of the concentration of essential oil was the container material used for essential oil cream.

The prediction method is the most frequently used method of Arrhenius, but it has several limitations as the shelf-life is generally more stringent t90 % (time required for the degradation of the active ingredient 10%). ^[20]

Repellent Activity Bioassay

Table 8 includes repellency percentages and types of samples of creams during the evaluation period.

The results of the repellency bioassays suggested that *B. graveolens* cream presented high repellent effect against mosquitoes with Class IV.

Table 8. Percentage repellency of essential oil cream during the 3-months

No. Sample	Time	Repellency (%) ¹ at:				Mean Repellency (%) ¹	Class Repellency
		1h	2h	3h	4h ²		
1	Month 0	75,93	70,05	70,05	66,93	70,74	IV
2	Month 1	73,74	71,8	70,05	66,93	70,63	IV
3	Month 2	78,52	73,74	68,43	70,05	72,69	IV
4	Month 3	81,89	78,52	68,43	68,43	74,32	IV

1 Percentage of repellency PR (%)

2 hours after treatment

The efficiency essential oil cream showed high activity against mosquito repellent until 4 hours after application of the bioassay in contrast with commercial repellent reported in the literature by Rey *et al.* 2004 ^[21], whose active ingredient is DEET (6.65%) with an average time of complete protection of 2 hours, the natural repellent with half of the concentration may repel the more time that the commercial repellent.

Acute toxicity dermal

The variables considered in the study resulted in the following

Change in weight: The treated groups showed not significant difference with probability ($p < 0.5$).

Mortality: There was not presence of dead animals (0% mortality).

Toxicological signs: In the observations made during the study period showed any alteration at the level of fur or skin and any signs.

Macroscopic Pathology: At the end of the bioassay all animals were sacrificed and underwent gross necropsy, none showed alterations in organs and tissues. Table 9

Table 9. Macroscopic Observations

Systems	A	B
Respiratory	0	0
Digestive	0	0
Nervious System	0	0

(0) No Abnormality

(P) Presence of Abnormality

The results showed that ACUTE DERMAL DOSE of 400 mg/200g of body weight in rats, under the test conditions (OECD TG 402), demonstrating absence of toxicity of repellent cream of *B. graveolens* in experimental animals.

CONCLUSIONS

The bioactive compounds present in essential oil of the fruits of *B. graveolens* are consider repulsive substances on flying insects and not toxic to mammals, concept reinforced by ethno-medicinal use for the plant. Repellent cream showed a significant degree of repellency although the essential oil concentration decreased, must be an effective repellent in the control of mosquito and possible alternative to synthetic repellents.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are grateful to all persons who took part in this study. We thank various staff and sections of the Chemistry Department, Universidad Técnica Particular de Loja.

REFERENCES

- [1]. Das, M.; Ansari, M. A.; Evaluation of repellent action of *Cymbopogon martini*, *Stapfvar sofia* oil against *Anopheles sundaicus* in tribal villages of Car Nicobar Island, Andaman & Nicobar Islands, India. *J. Vect Borne Dis.* 2004, 40, 100–104.
- [2]. Rajkumar, S.; Jebanesan, A. Repellency of volatile oils from *moschosma polystachyum* and *solanum xanthocarpum* against filarial vector *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine.* 2005, 22, 139–142.
- [3]. Tawatsin, A.; Wratten, S.; Scott, R.; Thavara U. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology.* 2001, 26, 76- 82.
- [4]. Tiwarya, M.; Naika, N.; Kumar, D.; Mittal, K.; Yadav, S. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. *J Vect Borne*, 2007, 44, 198–204.
- [5]. Tjahjani, S. Efficacy of Several Essential Oils as *Culex* and *Aedes* Repellents. *Trop Med Parasitol.* 2008, 3:33-7.
- [6]. Ferreira, M.; Moore, S. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 2011, 10 (Suppl 1):S11.
- [7]. Roveré, A.; Fiuza, L.; Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, *Curculionidae*). *Revista Brasileira de Entomologia.* 2011, 55. 116–120.
- [8]. Nieves, E.; Fernández J.; Lias J.; Rondón M.; Briceño B. Actividad repelente de aceites esenciales contra las picaduras de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol.). 2010, 58, 1549-1560.
- [9]. Sánchez, Y.; Pino, O., Correa, T.; Naranjo, E.; Iglesia, A. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* KUNTH (CAISIMÓN DE ANÍS). *Rev. Protección Veg.* 2009, 24, 39-46.
- [10]. Salas, M. E.; Zaragocin R. L.; Zaragoza T. Extracción, caracterización físico química y determinación de componentes del aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja. El Empalme, La Ceiba y Yaraco. UTP. 2006.
- [11]. Manzano, P.; Santana I.; Miranda M.; Gutiérrez Y.; García G.; Orellana T.; Orellana A. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (Palo santo) de Ecuador. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales.* 2009, 14,45-53.
- [12]. Leyva, A.; Martínez R.; Stashenko E. E. Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de (*Burseraceae*) de Colombia *Scientia et Technica* Año XIII, No 33. UTP. 2007, 20, 201-202
- [13]. Handbook of pharmaceutical excipients; Rowe, R., Sheskey, P., Owen, S. Eds: Pharmaceutical press; Fifth Edition: USA, 2006.
- [14]. Talukder, F.; Howse, P.E. Deterrent and insecticidal effects of extracts of pithraj, *Aphanamixis polystachya* (Meliaceae) against *Tribolium castaneum*. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19, 2463-2471.

[15]. Limonene. R.E.D. Facts. 1994. USA
EPA.website:<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/3083fact.pdf>.

[16]. Karr, L.; Coats, J.; Insecticidal properties of d-Limonene. *J.PesticideSci.*1988.13.pp 287-290.

[17].Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E.
Repellent activity of essential oils: a review.2010.PubMed. Sitio web
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729299>

[18]. Torres, K.; Gajardo, S.; Vílchez, J.; López, J.; Rojas, M. Formulación y evaluación de la estabilidad de una serie de vehículos, para el desarrollo de un biopesticida a base de aceite esencial de *Acantholippia deserticola*. *BIOFARBO*, 2010, 18, 20 – 30.

[19].Suñe, J.M. Material de Acondicionamiento de Uso Farmacéutico. *En Tratado de farmacia galénica*; Faulí, T.C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000, Vol.1, pp 227-239.

[20]. Salazar, R.; Amela, J.; Rivero, X. Planificación y Programación de los Estudios de Estabilidad. En *Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*. Eds., Glatt Labortecnic: Barcelona, 2001; Vol. 1.pp 437-459.

CÁPITULO I

FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1. PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 FIN

- La investigación propuesta tiene como objetivo aportar a la industria farmacéutica, con el diseño de un producto innovador de origen natural a partir aceite esencial de la especie *Bursera graveolens* (Palo santo), cuya función será repeler a insectos voladores sin producir reacciones perjudiciales a la salud de los consumidores y mucho menos al ambiente.

1.2 PROPÓSITO

- Diseñar y desarrollar un producto que posea actividad repelente y no cause reacciones tóxicas sobre la piel. La crema será fabricada bajo normas de calidad cumpliendo las GMP() además contará con estudios farmacológicos y toxicológicos con el fin de garantizar un fitomedicamento estable, seguro y eficaz.

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

1. Valorar la composición química del aceite esencial mediante GC-MS, con el objetivo de identificar los componentes responsables de la función repelente.
2. Realizar estudios de preformulación farmacéutica del principio activo (aceite esencial de *B. graveolens*, para determinar las propiedades del principio activo e incompatibilidades con sus posibles excipientes.
3. Seleccionar la fórmula idónea por medio del diseño factorial para la elaboración de la crema repelente, cumpliendo con los controles especificados según su forma farmacéutica.
4. Someter al producto elaborado a estudio de estabilidad acelerada y así estimar su vida útil.
5. Evaluar el grado de repelencia del producto contra los mosquitos a prueba para así confirmar su efectividad.
6. Descartar por medio del estudio de toxicidad aguda dérmica, posibles efectos dérmicos por parte del consumidor frente a la concentración del principio activo dentro de la forma farmacéutica.

1.4. Diseño Experimental

En la presente investigación se realizó el diseño estadístico Plackett y Burman para obtener los excipientes (factores) más adecuados para la fórmula final de la crema repelente desde el punto de vista de sus compatibilidades físico-químicas. Los datos obtenidos del análisis en GC-MS, se analizaron en una tabla que relaciona el efecto para cada factor en función de la potencia o porcentaje de identificación de aceite esencial, se calculó la varianza experimental y la *t* experimental para determinar la significancia estadística.

Mezcla	Potencia	Factores	Efecto	E ² d	"t"	Significancia			
						95%	97,50%	99,00%	99.9%
1	P ₁	1	E ₁						
2	P ₂	A	E ₂						
3	P ₃	B	E ₃						
4	P ₄	C	E ₄						
5	P ₅	D	E ₅						
6	P ₆	E	E ₆						
7	P ₇	F	E ₇						
8	P ₈	G	E ₈						
9	P ₉	H	E ₉						
10	P ₁₀	J	E ₁₀						
11	P ₁₁	K	E ₁₁						
12	P ₁₂	L	E ₁₂						

Figura 1.1. Diseño estadístico de Plackett y Burman
Elaboración: La autora

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN

Los mosquitos constituyen un grupo de gran importancia, debido a que muchas de sus especies, además de causar diversas molestias, son vectores de agentes patógenos de enfermedades de alta morbi-mortalidad como la malaria (o paludismo) por el *Anopheles* o el dengue por el *Aedes aegypti*. Las estadísticas epidemiológicas indican que los mosquitos actúan como vectores de infecciones a más de 700 millones de personas por año, y concretamente la malaria provoca una mortalidad de 3 millones de personas anualmente.¹

Aunque las enfermedades transmitidas por mosquitos representan un enorme problema en climas tropical y sub tropical, ninguna parte del mundo está inmune a este riesgo, convirtiéndose en un tema relevante en salud pública, ya que por el momento no se dispone de una vacuna efectiva y solo puede ser prevenida evitando la picadura del mosquito.^{2,3}

Los repelentes funcionan evitando que los humanos no sean atractivos a los mosquitos, obstruyendo los receptores olfatorios (OR) de atracción del insecto por lo cual los mosquitos no se acercan a las áreas del cuerpo cubiertas por repelente.⁴ En la actualidad el DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) es el ingrediente activo más común en los repelentes sintéticos, presenta excelente repelencia contra varios artrópodos sin embargo en algunos casos el DEET presenta alto grado de absorción cutánea, causando dermatitis por contacto y exacerbación de enfermedades cutáneas preexistentes además las reacciones de toxicidad humana después de las aplicaciones varían desde leves a severos niveles.^{5,6}

Estos antecedentes han estimulado la búsqueda de nuevas alternativas, dirigiéndose la atención a componentes derivados de las plantas, idea que se refuerza con los antecedentes etno-farmacológicos que se tiene para ciertas especies.

¹ Coto, H. Preguntas y respuestas sobre repelentes de mosquitos. *Rev. Plagas Ambiente y Salud*. **2010**, 6-11.

² Mark, S.; Radin, M.; Day J. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med*. **2002**, *347*, 13-18

³ Caffaratti, M.; Mazzieri, M.R. Repelentes Para prevenir el Dengue. Facultad de Ciencias Químicas, UNC. 2009.

⁴ Rey, J. R.; Rutledge R. Repelentes contra mosquitos. Florida. Medical Entomology Laboratory. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville. 2004.

⁵ Tawatsin, A.; Wratten, S.; Scott, R.; Thavara U. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology*. **2001**, *26*, 76- 82.

⁶ Rajkumar, S.; Jebanesan, A. Repellency of volatile oils from *moschosma polystachyum* and *solanum xanthocarpum* against filarial vector *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine*. **2005**, *22*, 139-142.

Las plantas debido a su historia coevolucionaria con plagas, son un valioso arsenal de sustancias naturales, producidos para la defensa contra esos organismos. Muchas plantas son ricas en metabolitos secundarios con actividades insecticidas y repelentes, constituyendo una fuente alternativa para las síntesis de un gran número de fitofármacos, con mayor enfoque sobre extractos de plantas o sustancias fitoquímicas como agentes potenciales en el control de mosquitos. En este contexto, los aceites esenciales (AE) han recibido mucha atención como compuestos volátiles bioactivos algunos de ellos con funciones repulsivas de efecto instantáneo sobre insectos voladores y no tóxicas para los mamíferos.^{7, 8}

Siendo Ecuador un país megadiverso por su amplia gama de ecosistemas, en donde se concentran el 75% de la variedad en especies de plantas se convierte en una fuente de investigación de interés permanente, especialmente para el desarrollo de nuevas materias primas en el mercado farmacéutico.⁹

Dentro de las plantas de la flora ecuatoriana encontramos a la especie *B. graveolens*; planta nativa de la región Tumbesina, es conocido en nuestro medio el uso en medicina tradicional por poseer propiedades identificadas en cuanto a su madera se refiere, cuando está seca y se quema emana un humo oloroso que repele mosquitos.¹⁰ La especie *B. graveolens* ha sido objeto de estudios fitoquímicos; así en la literatura se encuentran identificados en el aceite esencial, los componentes responsables del aroma, la característica picante, dulce y el olor balsámico.¹¹ Según la investigación realizada por Salas M.¹⁰, sobre la determinación de los componentes del aceite esencial de frutos de palo santo de tres lugares de la provincia de Loja, se reportan diferencias no significativas de los componentes químicos entre el aceite esencial de madera y frutos en donde se identifican componentes ricos en monoterpenos y sesquiterpenos por citar algunos: *α-pineno*, *α-phelandreno*, *limoneno*, *p-cymene*, *germacrene D*.

⁷ Tiwarya, M.; Naika, N.; Kumar, D.; Mittal, K.; Yadav, S. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (*Rutaceae*) against three mosquito vectors. *J Vect Borne*, **2007**, *44*, 198–204.

⁸ Roveré, A.; Neiva, K.; Fiuza, L.; Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. **2011**, *55*, 116–120.

⁹ Estrella, J. Manosalvas, J.; Rivadeneira M. Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador. Fundación Ecuatoriana de Estudios Ecológicos (Eco Ciencia), INIAP, MAE. Eds: Abya-Yala. Ecuador. 2005 pp. 116.

¹⁰ Salas, M. E.; Zaragocin R. L.; Zaragoza T. Extracción, caracterización físico química y determinación de componentes del aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja. El Empalme, La Ceiba y Yaraco. UTP. 2006.

¹¹ Leyva, A.; Martínez R.; Stashenko E. E. Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de (*Burseraceae*) de Colombia Scientia et Technica Año XIII, No 33. UTP. **2007**, *20*, 201-202.

A partir de estas investigaciones y con los antecedentes de su uso en forma empírica , se infiere que los componentes presentes en el aceite esencial de palo santo pueden producir actividad repelente, en consecuencia se propuso la elaboración de una crema, de tal manera que permita la incorporación del principio activo bajo la forma de aceite esencial y que además conserve las características propias de esta forma farmacéutica, lo que se determina mediante controles de calidad del producto terminado. Además se efectúan pruebas farmacológicas y toxicológicas, para de esta forma evitar o disminuir en lo más posible el riesgo que su administración puede provocar.

Del mismo modo, se espera contribuir al estudio farmacológico de la flora aromática de la zona sur del Ecuador llevada a cabo en el Departamento de Química para sustentar el potencial etnomedicinal de la región.

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1. REPELENTES

Al hombre siempre le resultaron molestas las picaduras de insectos en general, y mosquitos en especial. Al tomar conocimiento de enfermedades graves transmitidas por mosquitos, la protección se convirtió en un tema de interés, es aquí donde se ve la necesidad de protegerse contra esta plaga y surgen repelentes sintéticos y de origen natural.¹²

2.2.1.1. REPELENTES NATURALES

Los repelentes naturales o botánicos son sustancias que se extraen de las plantas. Las plantas generan potenciales sustancias que funcionan como mecanismo de defensa contra el ataque de insectos y pueden ser detectadas por el insecto provocando un estado de confusión, siendo esta razón por la cual los mosquitos no atacan a las plantas. Estos principios activos generalmente se encuentran en los aceites esenciales.¹³

La toxicidad de los repelentes naturales en humanos y otros mamíferos es mínima, generalmente son menos tóxicos que los repelentes tradicionales (DEET). Además son productos fácilmente degradables no presentando efectos nocivos para el medio ambiente.¹⁴

2.2.2. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son los constituyentes odoríferos ó, esencias de una planta, son productos volátiles constituidos por compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides. Desde el punto de vista comercial, los aceites esenciales se utilizan en 4 formas primarias: en productos farmacéuticos, potenciadores del sabor en muchos productos alimenticios, perfumería, y como repelentes e insecticidas.¹⁵

¹² O'farrill, H. Las plagas del hogar y el jardín. 4 Ed. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez-Departamento de Protección de Cultivos.2004.

¹³ Carretero, M E; Terpenos III: triterpenos y esteroides. Panorama Actual del Medicamento; **2001**, 25,240.

¹⁴ Das, N.G.; Baruah, I.; Talukdar, P.K.; Das, S.C. Evaluation of botanicals as repellents against mosquitoes. *J Vect Borne*. **2003** .Dis (40): 49–53.64

¹⁵ Jaramillo, B.; Duarte, E.; Delgado, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.**2012**; 17,54-64

Se ha probado una variedad de aceites esenciales manifestando marcado carácter repelente contra algunas especies de mosquitos; existen reportes para citronela (*Melissa officinalis*), cedro (*Cedrus*), eucalipto (*Eucalyptus*), limón (*Citrus*), geranio (*Geranium*), y semillas de soya (*Glycine*).¹⁶

Con respecto a la concentración utilizada del aceite esencial como alternativa repelente, existen estudios de *C. citratus* para soluciones con aceite esencial al 1% y preparaciones en forma de crema al 3, 5 y 15%, en donde se ha reportado actividad repelente importante frente a varias especies de insectos, alcanzado valores del 72 a 90% de índice de repelencia. Los compuestos orgánicos relacionados con actividad repelente son los monoterpenos y sus análogos, con potencial interferencia tóxica en los procesos bioquímicos básicos en los insectos, siendo considerados como ingredientes activos en algunos repelentes botánicos debido a su eficacia, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general.¹⁷

2.2.3. *Bursera graveolens* (Palo santo)

2.2.3.1. Clasificación Taxonómica:

Reino: Vegetal
División: Magnoliophyta (plantas con flores)
Clase: Dicotiledonea
Orden: Sapindales
Familia: Burseraceae
Género: *Bursera*
Especie: *graveolens*

Nombre Científico: *Bursera graveolens* (Kunth)

Nombre común: Palo santo



Fotografía 2.1. *B. graveolens* (Palo santo)
Fuente: Manzano *et al.* 2009

2.2.3.2. Sinónimos

Elaphrium graveolens Kunth, *Spodias edmonstonei* Hook. F.

¹⁶ Evangeline, T.; Oparaochaa, Iraneus Iwub. Ahanakuc J.E. Preliminary study on mosquito repellent and mosquitoicidal activities of *Ocimum gratissimum* (L.) grown in eastern Nigeria. *J Vector Borne*.**2010**, 47, 45–50

¹⁷ Nieves, E.; Fernández J.; Lias J.; Rondón M.; Briceño B. Actividad repelente de aceites esenciales contra las picaduras de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol.). **2010**, 58, 1549-1560.

2.2.3.3. Descripción botánica:

Es un árbol caducifolio que llega hasta 15 m de altura y el diámetro de su tronco de 30 a 50 cm. Sus hojas son caducas, alternas.

El fruto es una drupa subglobulosa de hasta 1.2 cm de largo por 0.6 cm de ancho puntiagudo, de color rojo el pericardio, se abre en dos partes (bivalvo), estriado y de color verde claro por dentro. El periodo de fructificación está comprendido durante los meses de Febrero y Mayo.¹⁸

2.2.3.4. Hábitat

La especie *B. graveolens* se encuentra en bosques de clima tropical seco, distribuido desde México a Perú. En Ecuador se encuentra en altitudes de hasta 1500 m, en lugares como el Archipiélago de Galápagos, Guayas, Imbabura, Manabí y en la provincia de Loja.¹⁰

2.2.3.5. Parte utilizada

Tradicionalmente se ha utilizado el tronco para la obtención de aceite esencial, sin embargo la Planta de productos naturales (UTPL) ha tenido la iniciativa de utilizar el fruto como materia prima para extraer el aceite esencial obteniendo resultados favorables.¹⁹



Fotografía 2.2. Frutos de *B. graveolens* (Palo santo),
Fuente: La autora

¹⁸ Jardín botánico Reinaldo Espinoza. UNL. Árboles nativos de la provincia de Loja, Loja, 1992, p. 32-33

¹⁰ Salas, M. E.; Zaragocin R. L.; Zaragoza T. Extracción, caracterización físico química y determinación de componentes del aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja. El Empalme, La Ceiba y Yaraco. UTPL. 2006.

¹⁹ Valarezo, E; Morocho, V.; Ordoñez, Y. Aceites esenciales, Plantas aromáticas del sur del Ecuador, Planta de Productos Naturales. UTPL

2.2.3.6. Composición Química

En la determinación cualitativa realizado a las ramas de *B. graveolens*, resultaron positivos los metabolitos correspondientes a los grupos químicos siguientes: en el extracto etéreo, aceites y grasas, triterpenos y esteroides; en el extracto alcohólico: resinas, sustancias reductoras, fenoles y taninos; en el extracto acuoso la presencia de fenoles y taninos, flavonoides, sustancias reductoras, saponinas y aminoácidos.²⁰

Los componente activos más importantes en el aceite esencial de los frutos de *B. graveolens* desde el punto de vista cuantitativo, pertenecen a la familia de los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y a los cuales se les atribuye sus virtudes repelentes.¹⁰

2.2.3.7. Propiedades y usos

B. graveolens ha sido utilizado desde épocas remotas como remedio para curar dolores estomacales, sudoríficos y como linimento para reumatismos. Además se le atribuyen las bondades etnomédicas: para las fatigas y latidos acelerados del corazón, para mareos y jaquecas con sólo frotarse unas gotas de este aceite en las zonas afectadas. Los extractos en ron de hojas y cortezas son aplicados localmente para lavar heridas y en forma oral son usados contra el asma, cálculos en el riñón. La madera seca como sahumero y para espantar mosquitos.^{10, 20}

En investigaciones realizadas a las propiedades de *B. graveolens* fundamentalmente de los triterpenos, Lupeol y epi-lupeol y aceites esenciales presentes en los extractos metanólicos de esta especie. Estos incluyen la acción antiinflamatoria, antirreumática, antibacteriana y antineoplásica.²¹

²⁰ Manzano, P.; Morgner, I.; Morgner, J.; Orellana A. *Bursera graveolens* (Palo santo), como alternativa de agricultura sustentable en la península de santa Elena-provincia del guayas^o. ESPOL.2002.

¹⁰ Salas, M. E.; Zaragocin R. L.; Zaragoza T. Extracción, caracterización físico química y determinación de componentes del aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja. El Empalme, La Ceiba y Yaraco. UTPL. 2006.

²¹ Manzano, P. Potencial fitofármaco de *Bursera graveolens* sp (Palo santo), del bosque seco tropical, península de santa Elena. 2009. Sitio web <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4729/1/7252.pdf>

2.2.4. FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS

2.2.4.1. CREMAS

Son preparados polifásicos, constituidos por una fase lipófila y otra acuosa de consistencia blanda y flujo newtoniano o pseudoplástico por su alto contenido acuoso. Desde el punto de vista técnico, las cremas son emulsiones, formado por dos líquidos no miscibles, en el que uno de ellos está disperso en el otro en forma de glóbulos o gotas pequeñas.²²

Las emulsiones pueden ser oleo-acuosas(O/W) o acuo-oleosas (W/O). La fase dispersante externa se indica detrás de la barra, y la fase dispersa o interna antes de la barra.²³

2.2.4.2. CLASIFICACIÓN

- **Cremas Hidrófobas (Emulsiones W/O):** Se obtienen por adición de agua soluciones acuosas a las bases de absorción, en ellas, la fase acuosa queda emulsionada como fase interna.

Son cremas lubricantes y emolientes, de utilidad en procesos dermatológicos subagudos y crónicos, por la propia acción emoliente del vehículo; se las denomina *cremas grasas*. Generalmente su contenido de agua oscila entre 10 y 40%.

- **Cremas Hidrófilas (Emulsiones O/W):** Son bases emulgentes W/O adicionadas de componente auxiliares en las que se emulsionan diversas cantidades de agua o soluciones como fase externa.

Son preparados lavables, adherentes a la piel, y tienden a desvanecerse una vez aplicados debido a la evaporación de su contenido acuoso que puede ser muy elevado (hasta un 80 – 90 %), sin dejar huella apreciable. Su poder emoliente es bajo debido al bajo contenido graso.²⁴

²² Villareal, Carvajal M. A.; Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la Piel. Universidad de los Andes. 2004.

²³ Remesal, P. Cosmetología "Resuelve el enigma". Eds: CSI.F. España, 2007. Sitio web <http://es.scribd.com/doc/44278715/COSMETOLOGIA>

²⁴ Pozo, Carrascosa A.; Pomada, Lipogeles. *En Tratado de farmacia galénica*; Faulí, T. C., Eds. Copyright: Madrid, 2000; Vol.1, pp 630-632

2.2.4.3. COMPONENTES PRINCIPALES

Las cremas constan básicamente de tres componentes: fase acuosa, fase oleosa o grasa y emulgente o tensoactivo.

Fase acuosa

En la fase acuosa generalmente se emplea:

- **Vehículo principal:** Agua, debe ser desionizada y microbiológicamente pura.
- **Vehículo secundario:** Mejora la solubilidad de ciertos principios activos.
Disolventes: Glicerina- Propilenglicol.
- **Agentes conservantes:** Sustancias químicas con actividad antimicrobiana que evitan la contaminación con hongos, levaduras o bacterias. Los parabenos son los conservantes más utilizados como metilo, propilo, butilo, etc.
- **Reguladores de pH:** Son ácidos o bases que permiten ajustar el pH final a valores idóneos. Ácido cítrico, citrato de sodio, fosfatos.

Fase oleosa

La fase oleosa su principal función es la de proveer emoliencia, renovando la flexibilidad y suavidad de la piel. A continuación algunas sustancias que más se emplean:

- **Minerales:** Petrolatos, parafina.
- **Vegetal:** Aceite de algodón, oliva, maiz, almendras.
- **Animal:** aceite de bacalao.
- **Ácidos grasos:** ácido lanolineico, ácido esteárico.
- **Alcoholes grasos:** alcohol cetílico, alcohol estearílico.
- **Ésteres de cera:** cera de abeja.
- **Antioxidantes:** BHA, BHT, α -tocoferol o vitamina E, galatos.

Agente Tensoactivo

Las sustancias emulgentes son aquellas que facilitan la formación de la emulsión y la estabilizan, disminuyendo la tensión superficial (fuerzas de cohesión entre las moléculas de la superficie de un líquido) que existe entre las fases. Todos ellos tienen una característica común: su molécula tiene dos partes diferentes, una parte es soluble en agua y se llama hidrófila, y la otra parte es soluble en grasa y se llama lipófila y por ello tienen afinidad tanto por el agua como por el aceite, es decir es una molécula alifática.

▪ Acción de un Tensoactivo sobre la Tensión Superficial

Al aumentar la concentración del tensoactivo en agua, la tensión superficial disminuye **(AB)** debido a que las moléculas se adsorben en la superficie del agua, al añadir más tensoactivo **(punto B)** las moléculas están empaquetadas en la superficie en forma vertical, y si se añade más tensoactivo se agregan en estructuras llamadas **micelas**, la tensión superficial ya no disminuye y permanece constante **(BC)**. La concentración a la que comienza la formación de micelas se denomina **CONCENTRACION MICELAR CRITICA** (punto B).²⁵ Figura 2.

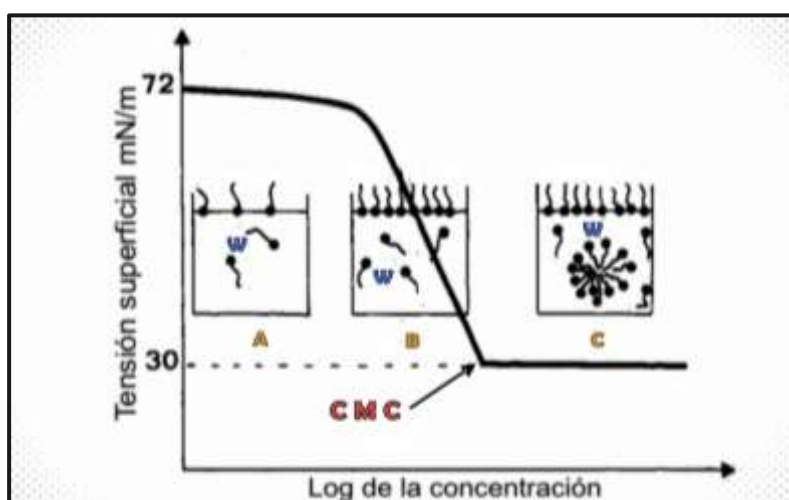


Figura 2. Relación entre la tensión superficial y el logaritmo de concentración.
Fuente: Bustamante, 2000

Los tensoactivos más empleados en cremas son los tensoactivos no iónicos y son el grupo más importante debido a su baja toxicidad lo que permite su utilización por vía tópica.²⁶ Entre los principales tipos de tensoactivos no iónicos, destacan los ésteres de sorbitan (SPAN), los polisorbatos (TWEEN).

Los aceites y ceras que constituyen la fase oleosa de las emulsiones tienen polaridad y por ello HLB específico para formar una emulsión O/W o W/O, conocido como "HLB requerido por la fase oleosa" (HLBr).²⁷

²⁵ Bustamante, P. Emulsiones. En Tratado de farmacia galénica; Faulí, T. C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000, Vol.1, 423-426

²⁶ Herráez, M.; López, Castellano A. Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos. Sistemas Dispersos Heterogéneos. Eds: Síntesis, España, 2001; Vol 2, pp 281-284

²⁷ Fernández, A. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W. Universidad de Granada 2006

2.2.4.4. MANUFACTURA DE CREMAS

A continuación se exponen los protocolos de manufactura más usuales de crema, los cuales se pueden hacer por métodos manuales y mecánicos.

- **Directo (interna sobre externa):** Las emulsiones W/O pueden prepararse incorporando la fase acuosa sobre la fase grasa fundida, bajo agitación hasta su enfriamiento. Debemos asegurarnos que la fase acuosa esté a la misma temperatura (60-70 °C) que la fase grasa. Los principios activos pueden incorporarse disueltos bien en la fase acuosa o en la fase grasa, según su afinidad, antes de proceder a la elaboración de la emulsión.
- **Indirecto o por inversión de fases:** Una vez la fase acuosa alcanza la temperatura de 70 °C y la fase grasa se encuentra en estado líquido, se incorpora lentamente bajo agitación, la fase externa sobre la fase interna. La mezcla se agita hasta enfriamiento, con el fin de que no se produzca separación de los componentes. Este método para preparar emulsiones O/W se denomina método de inversión de fases debido a que el sistema sufre una inversión en el signo de la emulsión, lo que permite obtener gotículas de menor diámetro y por tanto sistemas más estables.²³

2.2.4.5. ACONDICIONAMIENTO

El acondicionamiento de un medicamento se efectúa en dos niveles bien diferenciados:

- **Envase primario:** Contacto directo del medicamento. Los materiales más utilizados son envases de vidrio y plástico.
- **Envase secundario o estuche:** Acondicionamiento del medicamento envasado. Los materiales utilizados en papel y cartón.

Las formas semisólidas suelen venir envasadas en tubos de plástico o metal de capacidad variable, los tubos de plástico presentan un gran número de ventajas con respecto a otros recipientes: inodoros, irrompibles, gran inercia química, peso ligero, mayor versatilidad de adaptación a una línea de producción.²⁸

²³ Remesal, P. Cosmetología "Resuelve el enigma". Eds: CSI.F. España, 2007. Sitio web <http://es.scribd.com/doc/44278715/COSMETOLOGÍA>

²⁸ Suñe, J.M. Material de Acondicionamiento de Uso Farmacéutico. *En Tratado de farmacia galénica*; Faulí, T.C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000, Vol.1, pp 227-239

2.2.4.6. ESPECIFICACIONES PARA CREMAS

Para garantizar el buen estado y el desempeño del producto elaborado, se realiza controles de calidad que cumplan con las especificaciones establecidas para la formulación como la mantención de las características y composición del producto en forma constante desde un lote de producción a otro. Entre los controles realizados a los preparados se encuentran:

- **PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS**

Su determinación u observación proporciona una primera impresión de la calidad del producto. Deben presentar aspecto homogéneo, color y olor agradable o por lo menos aceptable y textura suave luego de la aplicación vía tópica.²⁹

- **PARAMETROS FISICO-QUÍMICOS**

pH: Las emulsiones aplicadas a la epidermis deben mantener el pH de la misma, estas son de pH ligeramente ácido. Cuando éste se encuentra fuera del rango, puede provocar alteraciones no favorables a la piel, es por ello, que el ajuste de pH a este intervalo es de suma importancia al momento de la formulación.²²

Densidad Relativa: La densidad relativa de una sustancia, también llamada gravedad específica, es la relación entre su densidad y la densidad del agua a una determinada temperatura.³⁰

Extensibilidad: Es la capacidad que tiene la crema para ser aplicada y distribuida uniformemente sobre la piel.³¹

Viscosidad: Para describir el comportamiento reológico de formas farmacéuticas semisólidas como cremas es necesario determinar la viscosidad, propiedad que caracteriza la resistencia de un fluido a desplazarse, generalmente se emplea el viscosímetro Brookfield.²⁹

²⁹ Signorelli, I.; Isla, M. Elaboración de una crema para uso tópico a base de *Urtica dioica* L. *Revista de la facultad de farmacia*. **2005**, 47,26-31.

²¹ Villareal, Carvajal M. A.; Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la Piel. Universidad de los Andes. 2004.

³⁰ Devia, P. Desarrollo De Nuevos Productos (DNP). Edición Dirección de Investigación y Docencia Universidad EAFIT Medellín, Colombia. 2007.

³¹ Méndez, E. E. Elaboración, Control de Calidad y Evaluación "In vivo" de la actividad antibacteriana de un gel obtenido del Extracto Alcaloidal de chocho. ESPOCH. 2008.

▪ PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS

El ensayo de límite microbiano se entiende tanto como un atributo de buenas prácticas de manufactura como de aseguramiento de calidad. Los criterios de aceptación para cremas tópicas deben contar con Recuento Total de Microorganismos Aerobios (RTMA), Recuento Total Combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras (RTCHL); ausencia de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.³³

2.2.5. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

La Estabilidad es la permanencia o duración de las cualidades terapéuticas de sus principios activos así como la conservación de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas.³⁴

En el estudio de estabilidad se efectúan pruebas a un medicamento para determinar el periodo de vida útil y las condiciones de almacenamiento en las cuales el producto terminado permanece dentro de los límites especificados, bajo la influencia de diversos factores como temperatura, humedad relativa y luz. Los ensayos seguidos se detallan en las Normativas tripartitas de la International Conference Harmonization (ICH).³⁵

2.2.5.1. Tipos de Estudios de Estabilidad

Los Estudios acelerados, se basa en el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción. Consiste en someter la muestra a condiciones extremas de almacenamiento ,temperatura superior a la temperatura ambiente, normalmente hasta 50 °C, por ejemplo 30 °C, 40 °C y 50 °C e incluso hasta 60 °C y a menudo en distintas condiciones de humedad relativa y en envases distintos, con los siguientes objetivos fundamentales:

_ Acelerar el proceso de degradación del principio activo y/o de la forma de dosificación, por lo cual en un proceso relativamente corto. Puede realizarse en periodos de 6 meses, en dependencia del producto, con análisis mensuales.

_ En algunos casos predecir en poco tiempo la velocidad de degradación a varias temperaturas y varias humedades relativas aplicando la Ley de Arrhenius.

³³ Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional. USP -NF3 2. 2009. Vol. 1. pp 970.

³⁴ Sellés, E. Estabilidad del Medicamento. *En Tratado de farmacia galénica*; Faulí, T .C., Eds.; Copyright: Madrid, Vol.1 pp 59-61

³⁵ Salazar, R.; Amela, J.; Rivero, X. Planificación y Programación de los Estudios de Estabilidad. *En Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*.Eds., Glatt Laborotecnic: Barcelona, 2001; vol. 1.pp 437-459.

Los Estudios a tiempo real o naturales, consisten en someter a la muestra a condiciones normales de temperatura y humedad relativa de almacenamiento, se determina en forma periódica la degradación de principio activo. Este método permite determinar de forma más exacta la vida útil de medicamento, sin embargo el gran inconveniente es el tiempo en que tarda el estudio.³⁵

³⁵ Salazar, R.; Amela, J.; Rivero, X. Planificación y Programación de los Estudios de Estabilidad. En *Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*. Eds., Glatt Labortecnic: Barcelona, 2001; vol. 1. pp 437-459.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

3.1.1. Área de recolección

El área de recolección de los frutos de *B. graveolens*, se encuentra al suroeste de la provincia de Loja, cantón Zapotillo, parroquia Limones, en la zona de influencia de las comunidades de Malvas, Chaquiro, Totumos y Paletillas de Malvas. La superficie total aproximada es 3.000 ha. y se encuentra ubicada entre las coordenadas UTM

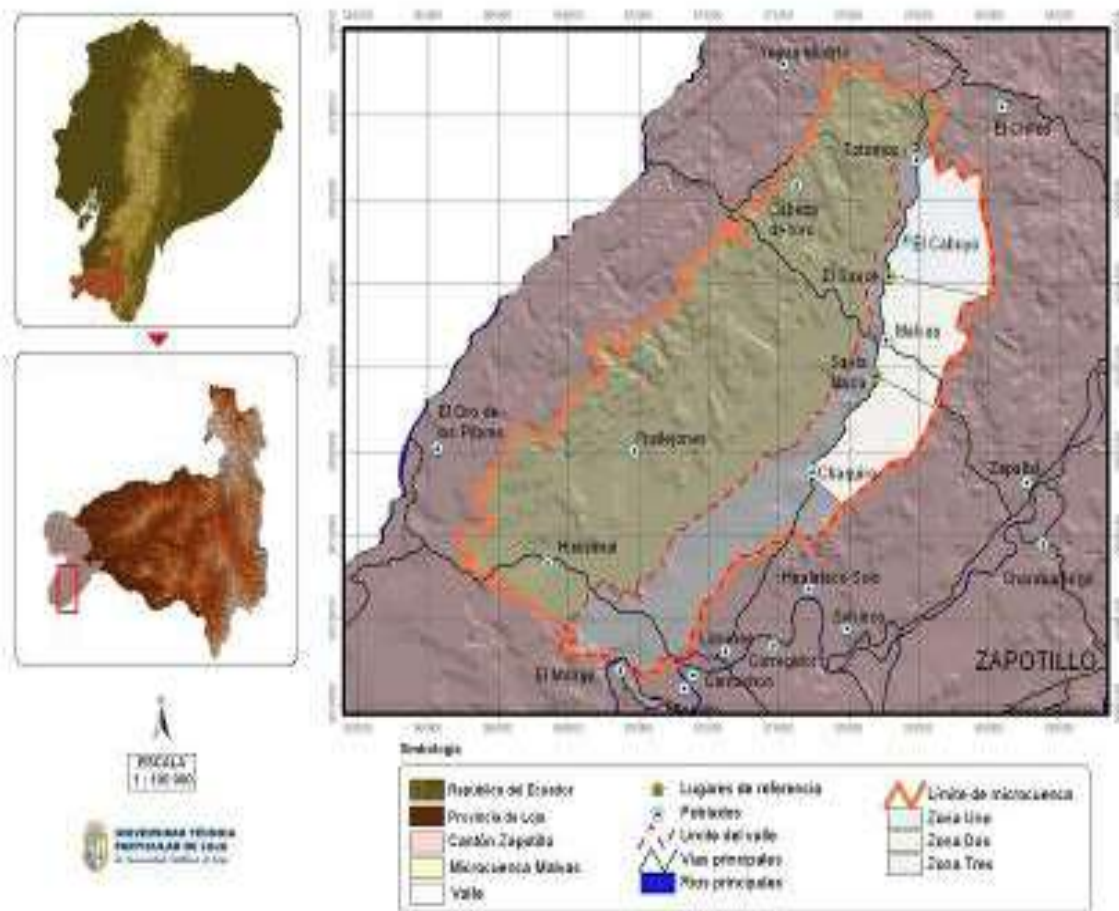


Figura 3.1. Mapa del área de recolección
Fuente: UTPL

3.1.2. Extracción del aceite esencial

El aceite esencial de los frutos de *B. graveolens* se obtuvo a partir de 10 000 g, mediante el método de arrastre de vapor de agua, utilizando un equipo de destilación tipo Clevenger durante 2 horas.

El equipo tienen en su parte interna una placa perforada donde se coloca la los frutos triturados a destilar, por debajo de esta placa se coloca agua que una vez que llegue al punto de ebullición el vapor circula por el material vegetal y va arrastrando los componentes volátiles que forman parte del aceite esencial de la planta. El vapor formado es condensado y la mezcla de aceite y agua es recolectada en un florentino, donde se separan por diferencia de densidades, de esta manera se obtiene el aceite esencial.

El aceite esencial posteriormente se sometió a control de calidad que corresponde con los estudios de preformulación del principio activo.

3.2. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN

3.2.1. VALORACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

La identificación de los compuestos del aceite esencial obtenida de *B. graveolens*, se realizó por GC-MS. El equipo utilizado para los respectivos análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1 cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, y acoplado a un detector de ionización de llama como se ve en la Fotografía 3.2.



Fotografía 3.2. Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N
Elaboración: La autora

La columna capilar en la cual se corre la muestra es DB-5MS (5%-Fenilmetilpolisiloxano) de 30 m de longitud, diámetro interno (DI) 0,25 mm, película 0,25 µm. La muestra se prepara a partir de una disolución de 990 µl de diclorometano grado HPLC y 10 µl de aceite en un vial. Adicionalmente se realiza la inyección de una muestra de hidrocarburos (C10 a C25), conocido comercialmente como TPH-6RPM de CHEM SERVICE bajo los mismos parámetros operacionales de inyección del aceite, éstos se utilizarán posteriormente para realizar el cálculo de los índices de Kóvats.

En la figura 3.3 se muestran las condiciones operacionales bajo las cuales se inyectaron las muestras de aceite esencial de *B. graveolens*.

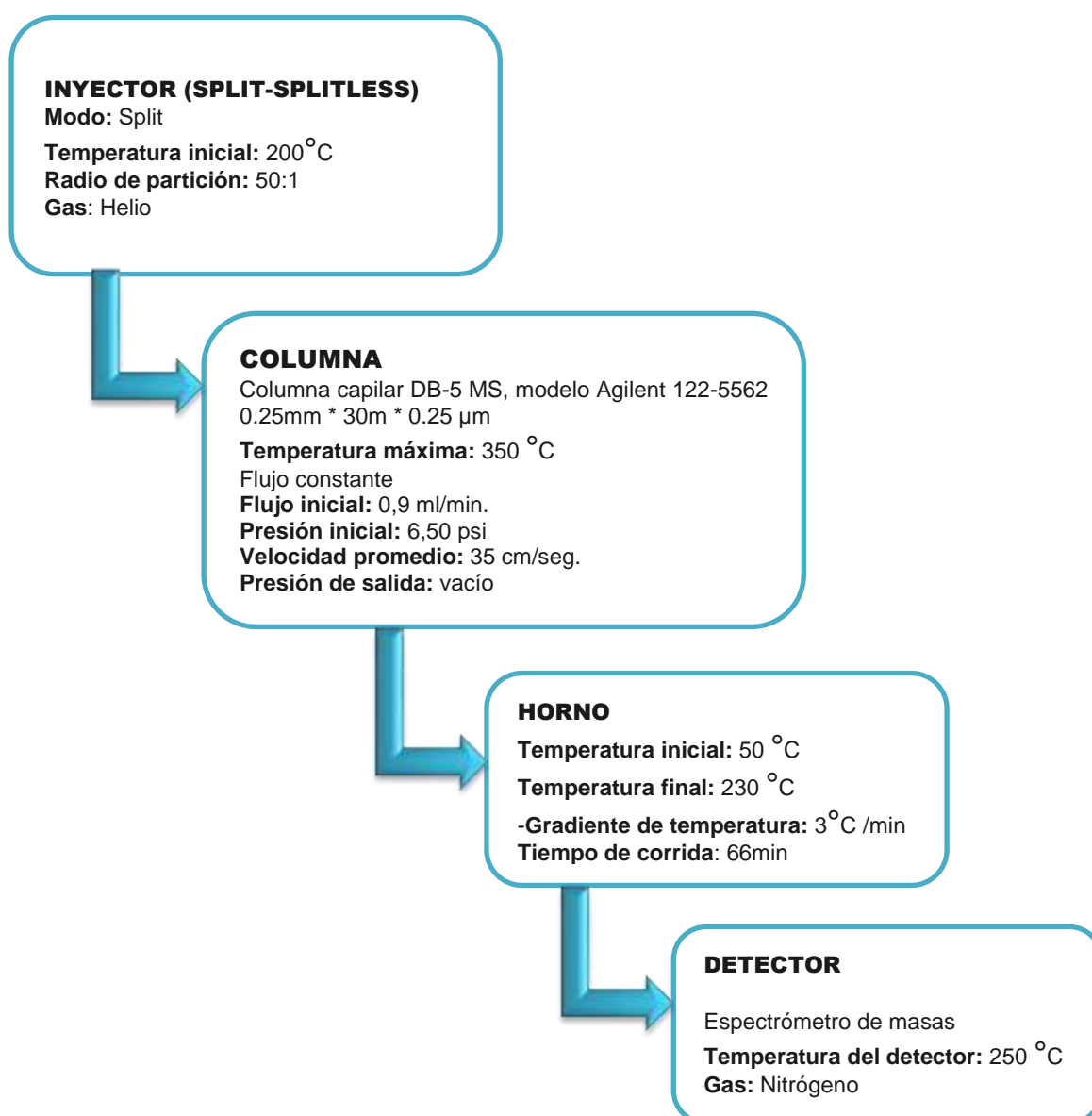


Figura 3.3. Condiciones de operación del GC-MS en la columna DB-5MS
Elaboración: La autora

Para la identificación de los compuestos químicos, se determina los índices de Kóvats de los picos detectados en la columna apolar DB-5MS, se analiza los espectros de masas de los mismos y se compara el espectro del pico con los propuestos en la librería WILEY 7n 1. Se realiza la comparación de los índices de Kóvats obtenidos experimentalmente en la columna con los reportados en la literatura.

3.2.2. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO

I. Solubilidad

La determinación de la solubilidad se realizó mediante el método semicuantitativo, que consiste en la adición de pequeñas cantidades del aceite a un volumen conocido y fijo del disolvente. Después de cada adición el sistema se agita vigorosamente y se observa si quedan partículas por disolver cuando esto sucede, el total del aceite añadido hasta este momento sirve para hacer una estimación de la solubilidad.³⁶

La Solubilidad del aceite de *B. graveolens* se probó con diferentes disolventes tales como: Propilenglicol, Glicerina y Alcohol. De acuerdo a la USP-NF32³³ las solubilidades se indica mediante términos descriptivos de la siguiente tabla:

Tabla 1. Solubilidades en Términos descriptivos

Término Descriptivo	Partes Disolvente Requeridas para 1 Parte de Soluta
Muy Soluble	Menos de 1
Fácilmente Soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Moderadamente Soluble	De 30 a 100
Poco Soluble	De 100 a 1000
Muy Poco Soluble	De 1000 a 10000
Prácticamente Insoluble o Insoluble	10000 o más

Fuente: USP-NF32. Tablas de referencia: descripción y solubilidad

³⁶ Amela, J.; Valero, E. Estudios de preformulación. En Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Eds., Glatt Laborotecnic: Barcelona, 2001; Vol. 1. pp 95-103.

³³ Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional. USP -NF3 2. 2009. Vol. 1. pp 970.

II. Densidad Relativa

Se realiza mediante la norma AFNOR NF T 75-111, en el análisis se utiliza un picnómetro de vidrio de 1ml, un termómetro y una balanza analítica.

Previa estandarización del picnómetro se pesa este vacío y seco, registrándose como **m**, luego llénese con agua destilada, pesar y registrar como **m1**, secar nuevamente el picnómetro durante 1 hora en la estufa; luego que se enfríe a 20 °C+1 llenar con la porción de ensayo pesarlo y registrarlo como **m2**. La densidad relativa a 20 °C se calcula a través de su fórmula:

$$d_{20} = (m2-m) / (m1-m)$$

III. Índice de Refracción

Se utiliza un refractómetro ABBE, según la norma AFNOR NF T 75 – 112, inicialmente se calibra el refractómetro midiendo el índice de refracción del agua, una vez que se ajusta se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma inferior, cerramos el termoprisma y realizamos la lectura.

3.2.3. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD ACEITE ESENCIAL - EXCIPIENTES

El estudio se basa en mezclar el principio activo con los excipientes más comunes para la crema y estudiar la degradación de las mezclas bajo condiciones aceleradas, la estabilidad física y química de las mezclas suministra información acerca de la compatibilidad entre cada uno de los excipientes y el aceite esencial.

El objetivo es poder afrontar posteriormente los estudios de estabilidad de nuestra formulación con las máximas garantías posibles.

Se suelen emplear diseños experimentales, los cuales permiten elaborar diferentes mezclas y evaluar los resultados obtenidos, dentro de los diseños para el análisis estadístico se incluye el diseño de Plackett y Burman.³⁶

³⁶ Amela, J.; Valero, E. Estudios de preformulación. En Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Eds., Glatt Laborotecnic: Barcelona, 2001; Vol. 1.pp 95-103.

3.2.3.1. Diseño Factorial de Plackett y Burman

Este tipo de diseño permite establecer el efecto entre la variable de estudio y la variable respuesta con un número mínimo de experimentos. En el diseño utilizado se emplea 11 factores a dos niveles diferentes señalados por los signos (+) y (-), y donde el número de experimentos fue 12. En nuestro caso los factores son excipientes, tres de los factores son variables dummy y no contienen excipientes a ninguno de los dos niveles. Se debe incluir para realizar el tratamiento estadístico.

El diseño de Plackett- Burman se realizó a partir de las siguientes etapas:

A. Descripción

▪ Composición de las mezclas:

La composición general de las mezclas fue la siguiente:

Principio activo- Aceite Esencial	3.0 g
Excipientes	37,3 g- 44,3 g

En la Tabla 2 se muestra los factores utilizados en la composición de las mezclas

Tabla 2. Factores utilizados para el diseño de Plackett y Burman

Factores	NIVELES	
	(+)	(-)
A	Alcohol Cetoesterilico	Alcohol Cetilico
B	Vaselina solida	Parafina solida
C	Parafina líquida	Vaselina líquida
D	Acido esteárico	Cera blanca
E	Aceite de silicona	-----
F	BHT	α- Tocoferol
G	Tween 40	Tween 80
H	Span 60 (3,3 g)	Span 60 (3,5g)

Elaboración: La autora

Para la construcción de la matriz experimental Plackett y Burman en la mayoría de los casos la primera línea de signos esta ya dada (+ + -; +++; - - - ;+ - -) y las restantes se obtienen mediante permutaciones cíclicas a partir de la primera fila, excepto la última, en la cual se introducen todos con signo menos (-).

A partir de la matriz se originan las mezclas (**Anexo I**), las mezclas contienen otros componentes que conforman la crema: conservantes, solubilizantes y agua c.s.p

B. Elaboración y Acondicionamiento de las mezclas

Se prepara las mezclas, combinando porciones sucesivas del principio activo con los excipientes. Una vez preparadas las mezclas se reparten en viales de vidrio tipo II, 2 g de mezcla por duplicado se tapan con elastómeros de caucho y se someten a temperatura ambiente (21 °C Aprox.), 30 °C y 40 °C durante 8 semanas tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución y acondicionamiento de las mezclas

Nº. de viales	Mezcla	Cantidad / vial	Condiciones
2	Todas	2 g	Ambiente
2	Todas	2 g	30 ° C
2	Todas	3 g	40 ° C

Fuente: Amela, J *et al.* 2001

C. Análisis de las mezclas

Transcurridas las 8 semanas, se extrajeron los viales de la estufa. Se procede a su observación y análisis a través de Cromatografía de gases acoplado a Espectrofotometría de masas (GC-MS) con el fin de determinar el contenido del principio activo y detectar y cuantificar posibles impurezas y productos de degradación dentro de la forma farmacéutica.

Tratamiento de las muestras

Las mezclas estudiadas son emulsiones que contienen una fase acuosa, una fase oleosa y surfactantes ó tensoactivos, por ello los analitos de interés se extrajeron utilizando un disolvente orgánico apolar (hexano).

En ese sentido, antes de su introducción en el sistema cromatográfico, las mezclas se trataron basándose en el proceso de *Extracción Líquido-Líquido*. (**Anexo II**)

D. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante una tabla que relaciona el efecto para cada factor en función de la potencia ó porcentaje de identificación del aceite esencial, se calculó la varianza experimental, desviación estándar experimental y finalmente la significancia estadística con un valor de $p= 0.05$ a $p= 0.005$

3.3. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN

3.3.1. Establecimiento de la fórmula

A partir de los estudios de preformulación se obtuvo la fórmula final de la crema repelente considerando lo siguiente:

- Se seleccionó los excipientes que no producen incompatibilidades con el principio activo según el diseño experimental Plackett y Burman.
- Las concentraciones de los excipientes se basaron en el *Handbook of pharmaceutical excipients* 6th Edition.
- Se determinó los componentes a cada fase acuosa u oleosa en función de su solubilidad.

3.3.2. Selección de emulgentes

- Los emulgentes utilizados son los tensoactivos no iónicos TWEEN 40 y SPAN 60.
- Se caracterizó la zona BHL óptima, realizando cálculos correspondientes para la obtención del BHL requerido (BHLr) teniendo en cuenta el tipo de emulsión que se requiere en nuestro caso O/W. **(Anexo III)**.
- Se utilizó la mezcla de emulsificantes al 4%, en esta concentración las micelas se distribuyen homogéneamente en el sistema.

3.3.3. Formulación

La fórmula de la crema repelente se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Fórmula cuali-cuantitativa del producto

FASE	COMPONENTES	FUNCIÓN	PESO (%)
A	Alcohol cetílico	Agente reológico	8
	Vaselina solida	Emoliente	4
	Vaselina liquida	Emoliente	3
	Acido esteárico	Agente viscosante	2
	Aceite de silicona	Agente antiestático	1,5
	α-Tocoferol	Antioxidante	0,1
	Span 60	Emulsificante	3,3
B	Metilparabeno	Conservantes	0,18
	Propilparabeno	Conservantes	0,02
	Propilnglicol	Cosolvente, Humentante	10
	Tween 40	Emulsificante	0,7
	Agua	Vehículo Primario	c.s.p.*100
C	Aceite esencial de <i>B. graveolens</i>	Principio activo	3
	Glicerina	Disolvente	3

*cantidad suficiente para
Elaboración: La autora

3.3.4. Proceso de Fabricación

La fabricación de la crema repelente a base del aceite esencial de *B. graveolens* se realiza según en el procedimiento normalizado de elaboración de Emulsiones **PN/L/FF/002/00** como se indica en la Figura 3.4.

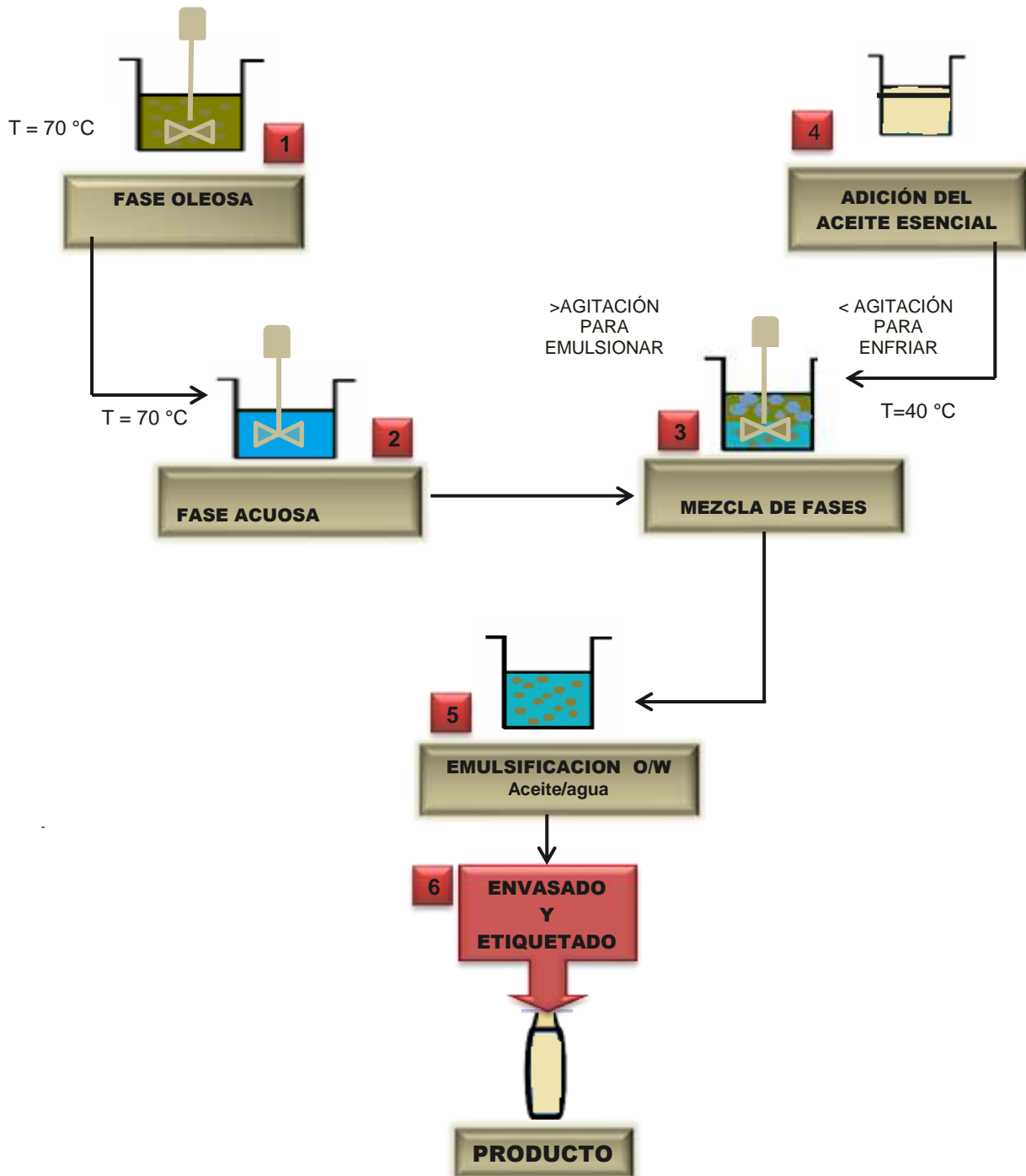


Figura 3.4. Diagrama de flujo de fabricación de crema de *B. graveolens*
Elaboración: La autora

- **Preparación de las Fases**

Fase Oleosa (1): En un vaso de precipitación de 1000 mL, se incorporó los componentes de la Fase A (Tabla 4), manteniendo el orden con el propósito de que se unan los excipientes, se calienta a baño maría a una temperatura de 70 °C.

Fase Acuosa (2): Se calienta a baño maría en donde se incorporan los ingredientes de la Fase B, a la misma temperatura que la fase oleosa, bajo agitación moderada para garantizar su homogeneidad.

Mezcla de Fases (3): Cuando la fase oleosa está fundida totalmente y componentes de la fase acuosa estén disueltos ambas fases a 70 °C aproximadamente luego:

- Realizar la combinación de fases (O/W), lentamente y con agitación
- Continuar con agitación hasta su **enfriamiento** por un tiempo de 10 min hasta conseguir una temperatura de 40 °C., en el que tomará consistencia la emulsión.
- Incorporar la **fase C (4)**

Emulsificación (5): La emulsión débil es expuesta a shock térmico (4 °C) con el fin de lograr una rápida y buena consistencia y evitar que se formen burbujas de aire y poder obtener una buena estabilidad de la crema.

Envase y Etiquetado (6): Se envasa la crema repelente en envases plástico colapsible con capacidad de 130 g elaborado en polietileno de alta densidad (HDPE), que cumplan con los parámetros de calidad.

3.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

El producto fue sometido a estrés o estabilidad acelerada, durante 3 meses según el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INH) a 3 temperaturas diferentes: 30 °C ± 2 °C., 40 °C ± 2 °C y a temperatura ambiente de la ciudad de Loja y Humedad Relativa: 75% ± 5%. (**Anexo IV**)

Se preparó un solo lote a escala piloto (peso lote) de 30 unidades, las muestras se seleccionaron al azar para evaluar las propiedades organolépticas, físico-químicas y microbiológicas a temperatura y humedad relativa citadas anteriormente.

Los análisis así como los métodos y técnicas aplicadas para realizar los ensayos de estabilidad en ésta investigación se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados para el estudio de estabilidad

PARAMETRO	MÉTODO/TÉCNICA
ORGANOLÉPTICO	Apariencia, consistencia, olor y color
FÍSICO- QUÍMICO	pH (pH digital JENWAY 3510) Densidad (picnómetro) Extensibilidad (PN/L/CP/003/00) Concentración aceite esencial (GC-MS)
MICROBIOLÓGICO	<i>Aerobios mesófilos</i> (USP 32) Hongos-levaduras (USP 32) <i>Escherichia coli</i> (USP 32) <i>Staphylococusaereus</i> (USP 32) <i>Speudomona aeruginosa</i> (USP 32)

Elaboración: La autora

3.4.1. Predicción de la Estabilidad

3.4.1.1. Método de Arrhenius

Este método se basa en evaluar la influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción utilizando la ecuación de Arrhenius.³⁵

Para aplicar la ecuación de Arrhenius se realiza sucesivamente diferentes etapas:

En principio se determina el contenido del principio activo (aceite esencial) en las tres temperaturas mediante GC-MS cada cierto intervalo de tiempo (0, 1, 2, 3 meses) y a temperatura ambiente 21 °C Aprox., 30 °C.± 2 °C y 40 °C± 2 °C con humedad relativa del 75 % ± 5 %.

Luego se determina el orden de reacción, se construye la gráfica con las pendientes respectivas a las temperaturas de estudio.

Por último, la estabilidad química de un medicamento se suele expresar por el tiempo de vida útil como T90% a la temperatura de 30°C de la **ZONA IV b**, zona donde se ubica nuestro país según Normas ICH.

³⁵ Salazar, R.; Amela, J.; Rivero, X. Planificación y Programación de los Estudios de Estabilidad. En *Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*.Eds., Glatt Laborotecnic: Barcelona, 2001; vol. 1.pp 437-459.

3.5. BIOENSAYO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE

La prueba del efecto repelente es conducida según el método propuesto por Talukder y Howse³⁷. Se utiliza papeles de filtro de 9 cm de diámetro separados en dos mitades iguales, la crema se aplica en una de las mitades. Las mitades tratadas y no tratadas de cada círculo se colocan en forma contigua dentro de cajas Petri, y se libera en su interior 10 mosquitos conocidos como zancudos y que comúnmente se encuentran en clima cálido. Se realiza recuentos de mosquitos presentes en cada mitad del círculo cada hora hasta la cuarta hora posterior al tratamiento.³⁸ Los datos serán convertidos en porcentaje de repelencia (PR) por medio de la siguiente fórmula:

$$PR (\%) = (N_c - 50) \times 2$$

Donde N_c = porcentaje de mosquitos presentes en la mitad testigo.

Los valores se categorizan según la siguiente escala:

Clase	Grado de Repelencia (%)
0	>0.01 a < 0.1
I	0,1 a 20
II	20,1 a 40
III	40,1 a 60
IV	60,1 a 80
V	80,1 a 100

El bioensayo se realizó en la reserva ecológica LAIPUNA (cantón Mácara). Los mosquitos fueron capturados a través de trampas de luz blanca y UV utilizando un aspirador. (**Anexo V**).

3.6. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA POR VIA DERMICA DE LA CREMA REPELENTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *B. graveolens*

Mediante el estudio de Toxicidad Aguda se determinó el potencial toxico de la crema repelente que se traduce en los efectos adversos observados. Los mismos se evaluaron mediante la aparición de signos clínicos, pesos de animales, mortalidad, tras la administración por vía dérmica en una sola dosis dentro de las 24 horas.

³⁷ Talukder, F.; Howse, P.E. Deterrent and insecticidal effects of extracts of pithraj, *Aphanamixi spolytachya* (Meliaceae) against *Tribolium castaneum*. Journal of Chemical Ecology, **1993**, *19*, 2463-2471.

³⁸ Viglianco, A.; Novo, R.; Cragolini, C., Nassetta, M. Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.) *Agriscientia*, 2006, *23*,83-89

El Estudio se llevó a cabo en el laboratorio PROGECA de la Facultad de Ciencias Químicas- Universidad de Guayaquil y se lo detalla a continuación.

Diseño experimental

La Toxicidad aguda por la vía dérmica del producto, se determinó mediante procedimientos descritos en el protocolo de la OECD TG 402 (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo, 2001).

Animales

Para el ensayo, se usaron ratas hembras /machos (*Wistar*) con un peso de la media \pm 20 %, provenientes del Bioterio del Laboratorio por lo que el proceso de cuarentena se consideró no aplicable.

Tratamientos

La prueba incluyo dos grupos tratados:

Tabla 6. Grupos tratados (machos) en el estudio de Toxicidad aguda por vía dérmica

GRUPOS	No. ANIMALES (machos)	Peso inicial Machos (g)	Concentración (mg p.a. /kg peso corporal)
A Control (solución salina ClNa 0,9%)	3	198,7 \pm 1,1	2000
B (Crema palo santo)	6	195,1 \pm 3,4	2000

Fuente: Estudio de toxicidad aguda dérmica de la crema repelente a base del aceite esencial de *B. graveolens*. Laboratorio PROGECA. 2012

Tabla 7. Grupos tratados (hembras) en el estudio de Toxicidad aguda por vía dérmica

GRUPOS	No. ANIMALES (hembras)	Peso inicial Hembras (g)	Concentración (mg p.a. /kg peso corporal)
A Control (solución salina ClNa 0,9%)	3	200,7 \pm 1,1	2000
B (Crema palo santo)	6	195,1 \pm 3,5	2000

Fuente: Estudio de toxicidad aguda dérmica de la crema repelente a base del aceite esencial de *B. graveolens*. Laboratorio PROGECA.2012

Bioensayo

Un día antes del inicio del ensayo, se preparó el área de la piel para la experimentación en cada uno de los animales, se rasuro el área dérmica de aproximadamente 10% de la superficie corporal del animal. Se colocó el parche semioclusivo humedecido con la cantidad previamente calculada del producto a prueba según el peso del animal.

Luego de efectuar la administración de la dosis se hizo seguimiento clínico de los animales, teniendo como posibles desenlaces la muerte o ausencia de signos clínicos hasta su sacrificio 14 días después de haber administrado el producto.

Variables

Las variables registradas durante el ensayo correspondieron a:

Variación de peso: Se pesaron semanalmente cada uno de los animales y sus pesos fueron registrados durante los días: 0 antes de la dosificación y después del ayuno de 12 horas, 7 y 14 post dosificación y antes del sacrificio.

Mortalidad: Se registró diariamente la presencia de mortalidad en los animales tratados.

Signos clínicos: Durante los 14 días de evaluación, los animales fueron observados diariamente para su valoración clínica. Registrándose signos clínicos como: agresividad, letárgica, dificultades respiratorias, inmovilidad, temblor, piel, pelaje, ojos, cavidad oral (hocico), abdomen y genitales externos.

Valoración patológica: Al final del periodo de evaluación (día 14) para cada grupo, los animales fueron sacrificados atendiendo el principio de las 3 ERRES. Las necropsias incluyeron exámenes macroscópicos internos de los órganos torácicos, abdominales y pélvicos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN

4.1.1. VALORACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

La identificación de los compuestos químicos del aceite esencial de *B. graveolens* por GC-MS, se basó en la comparación de los espectros de masas con los espectros de la base de datos Wiley 7n.1 del equipo. En la siguiente figura 7 se muestra el cromatograma obtenido del aceite en la columna DB-5MS.

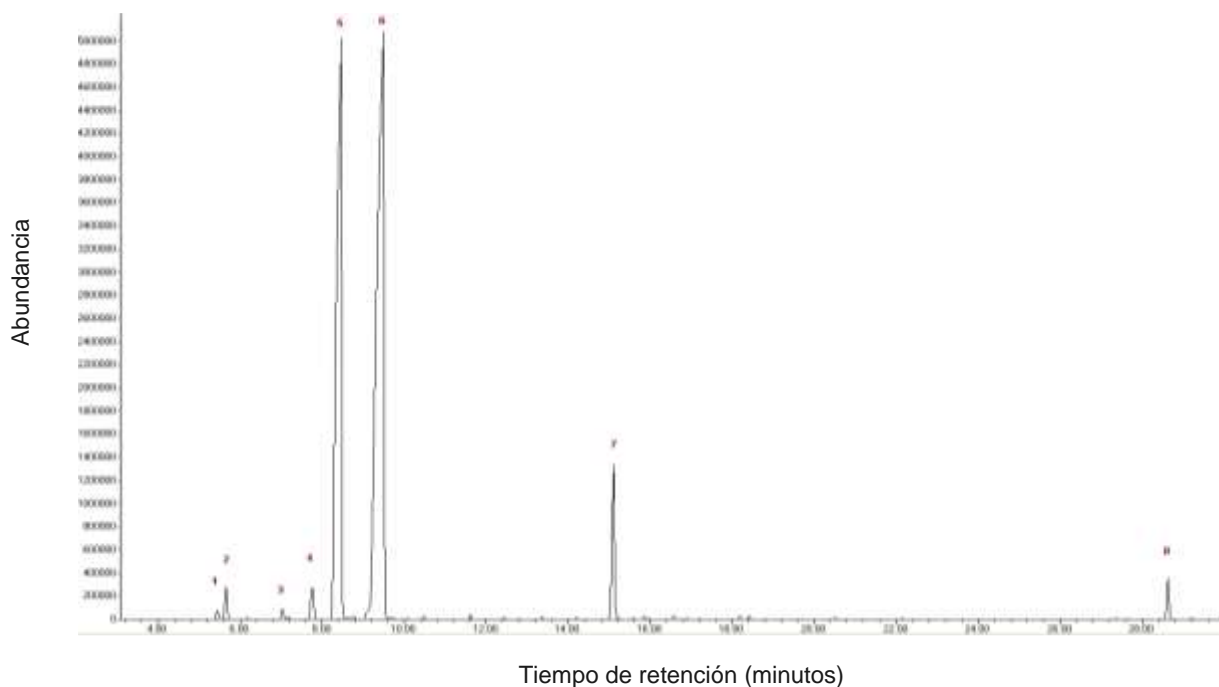


Figura 7. Cromatograma del aceite esencial de *B. graveolens*

Elaboración: La autora

En la tabla 8 se encuentran los compuestos que constituyen la mayor proporción desde el punto de vista cuantitativo en el aceite esencial correspondiendo a un 98,02%. Los compuestos se encuentran tabulados según el orden de elución de la columna DB-5 MS.

El aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos. Los resultados concuerdan con la contribución de Salas M.¹⁰, en donde se reportó la presencia de los ocho compuestos mayoritarios en el aceite esencial de los frutos de *B. graveolens* no existiendo ninguna variación en el aceite obtenido.

¹⁰ Salas, M.; Zaragoza R. L.; Zaragoza T. Extracción, caracterización físico química y determinación de componentes del aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja. El Empalme, La Ceiba y Yaraco. UTPL. 2006

Tabla 8. Composición química del aceite esencial de *B. graveolens*

Picos	COMPONENTES	Índice de Retención		% Cantidad Relativa
		RI ^a	RI ^{ref.}	DB5-MS
1	α -Thujene	866	905	0,26
2	α -pinene	871	907	0,99
3	Sabinene	923	966	0,29
4	p-cymene	1006	1002	1,51
5	α -phellandrene	1022	1024	35,55
6	Limonene	1029	1029	52,82
7	Menthorfuran	1158	1164	5,32
8	Germacrene- D	1469	1451	1,28
Total* %				98,02

RI: Índice de retención en la columna no polar DB5-MS)

a= Compuestos ordenados según la elución en la columna DB5-MS

ref = Índices de retención de referencia

*= sumatoria de los compuestos encontrados en la columna DB5-MS

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

De acuerdo al análisis cuantitativo en el aceite esencial el componente predominante fue el monoterpeno **limoneno** (52,8213%). El **limoneno** ha sido aprobado por el U.S. Environmental Protection Agency (EPA) para ser usado como pesticida natural y repelente de insectos sin embargo en investigaciones realizadas se demostró que el limoneno tiene una repelencia significativa a altos niveles pero por si sólo no es equivalente al estándar sintético de comparación (piretrinas).^{40,41}

Puesto que los aceite esenciales son una mezcla heterogénea de sustancias químicas, es cuestionable si el efecto repelente es el resultado de un sinergismo de todos los compuestos o es reflejo solo de aquéllos compuestos presentes en altos niveles según el análisis por GC-MS. Nerio L.⁴², ha atribuido la actividad repelente a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos, en algunos casos pueden trabajar sinérgicamente mejorando su efectividad.

Existen reportes para la propiedades repelentes de diversas plantas cuyos aceites esenciales se componen de: α - pineno, canfeno, mirceno, beta pineno, 1,8 Cineol, linalol , Beta cariofileno, α -Thujene, α -Pinene, α -Phellandrene, limonene, sabinene, p-Cymene, menthorfurano, germacrene- D, en su mayoría presentes en el aceite esencial de *B. graveolens*.

⁴⁰ Limonene. R.E.D. Facts.1994. USA EPA. sitio web: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/3083fact.pdf>

⁴¹ Karr, L.; Coats, J.; Insecticidal properties of d-Limonene. *J.PesticideSci.* **1988**.13.pp 287-290.

⁴² Nerio L, Olivero-Verbel J, Stashenko E.Repellent activity of essential oils: a review. **2010**. PubMed. Sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729299>

4.1.2 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO

El aceite esencial de *B. graveolens* es un líquido viscoso a temperatura ambiente y en refrigeración; incoloro y un olor penetrante balsámico (característico de la especie). En la tabla 9 se indican los resultados de los análisis físico - químicos.

Tabla 9. Características Físico-Químicas del aceite esencial de *B. graveolens*

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
Solubilidad	-	Propilenglicol: Insoluble Glicerina: Fácilmente soluble Alcohol 70%: Insoluble
Densidad Relativa	g/ cm ³	0,844
Índice de Refracción	-	1,473

Elaboración: La autora

El Propilenglicol y el Alcohol no consiguieron la dilución del aceite esencial mientras al adicionar 1 ml de glicerina a 1 ml de aceite resultó ser miscible, siendo este último el medio para incluir el principio en la forma farmacéutica semisólida. Hernández L.⁴³ destaca la propiedad de la glicerina de formar disoluciones concentradas y permanentes, imposibles de obtener con otros vehículos.

Para la densidad relativa y el índice de refracción se consideró los parámetros establecidos para el aceite por el Área de aceites esenciales en donde la densidad es 0,85 g/cm³ y el índice de refracción es 1,47 de acuerdo a los datos obtenidos (Tabla 9). Los resultados que se encuentran demuestran que el aceite presentó buenas condiciones para los procesos posteriores durante la investigación.

4.1.3. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD ACEITE ESENCIAL - EXCIPIENTES

4.1.3.1. Diseño Factorial de Plackett y Burman

Luego de realizado el análisis por GC-MS se obtuvo las siguientes respuestas (potencia de principio activo) en cada una de los ensayos en función de sus factores o excipientes.

⁴³ Hernández, L.; Quintana, M.; Morris, H. Obtención de glicerol a partir de la microalga *Dunaliella salina*. *Rev. Cubana Farm.* **2000**; *34*, 134-137

Apartir de los datos de cada potencia obtenida para cada formulación se calculó su efecto promedio como se ve en la Tabla 10

Tabla 10. Matriz de ensayos. Determinación de la respuesta mediante GC-MS

No. MEZCLAS	FACTORES (Excipientes)								DUMMIES			RESPUESTA (Potencia)
	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L	M	
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	75
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	82
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	80
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	57
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	64
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	55
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	80
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	50
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	92
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	90
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	53
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
SUMA +	423	421	412	499	407	412	427	431	425	397	414	
SUMA -	415	417	426	339	431	426	411	407	413	441	424	
EF. PROM.	1,33	0,67	-2,3	26,7	-4,0	-2,3	2,7	4,0	2,00	-7,3	-1,7	
								E_d^2	4	53,29	2,89	

Elaboración: La autora

Para averiguar la significancia de los efectos, se calculó la varianza experimental (S_{exp}); ésta se considera que es la varianza de los efectos de los factores “dummy” (K, L, M), así:

$$S_{exp}^2 = \frac{\sum E_d^2}{n}$$

$$S_{exp}^2 = \frac{60,18}{3}$$

$$S_{exp}^2 = 20,06$$

La desviación estándar experimental (S) es la raíz cuadrada de la varianza experimental

$$S = \sqrt{S_{exp}^2}$$

$$S = 4,478$$

Para cada efecto se calculó su t experimental así: $t_E = \frac{E_i}{s}$

Los resultados se exponen en un informe que incluye la siguiente tabla.

Tabla 11. Significancia de los efectos en función de su respuesta

Mezcla	Resp.	Fac.	Efec.	E ² d	"t"	Significancia*			
						95%	97,50%	99,00%	99.9%
						p= 0,05	p= 0,025	p= 0,01	p= 0,005
1	75	1							
2	82	A	1,33		0,296951947	*	*	*	*
3	80	B	0,67		0,149592334	*	*	*	*
4	57	C	2,3		0,513525923	*	*	*	*
5	64	D	26,7		5,961366147	**	**	**	*
6	55	E	4		0,893088561	*	*	*	*
7	80	F	2,3		0,513525923	*	*	*	*
8	50	G	2,7		0,602834779	*	*	*	*
9	92	H	4		0,893088561	*	*	*	*
10	90	J	2	4	0,446544281	*	*	*	*
11	53	K	7,3	53,29	1,629886625	*	*	*	*
12	60	L	1,7	2,89	0,379562639	*	*	*	*

(*) No significativo, (**) Significativo

Elaboración: La autora

Al comparar los valores de "t" con la Tabla de Student (Tabla 12) para los 3 grados de libertad, el **factor D** conformado por los excipientes: ácido esteárico (+) y cera blanca (-) es mayor al t tabulado, siendo significativo a una probabilidad de 99 %.

Tabla 12. Tabla de STUDENT

P	G.L.=3
95%	2,353
97,50%	3,182
99%	5,84
99.9%	12,99

Fuente: Amela, 2001

Observando las respuestas en la matriz de ensayos (Tabla 10) para el factor D, el ácido esteárico se encuentra con valores altos a diferencia de las mezclas con cera blanca, resultando el factor incompatible para la forma farmacéutica. Además se detectó presencia de impurezas de las materias primas de la fase oleosa en la mayoría de mezclas con este factor; hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos insaturados, aldehídos entre otros su presencia posiblemente ocasionarían la disminución del porcentaje de principio activo.

La cera blanca por su estructura, presenta alta susceptibilidad a enrancimiento debido al aumento de la superficie de los compuestos oleosos al ser emulsionados y la introducción de aire en la manufactura, proceso que se evidenció por el cambio significativo de la apariencia en las mezclas con este excipiente.

Según Amela J.³⁶, al considerar 2 ó más excipientes de cada tipo de función si alguno es incompatible con nuestro principio activo se escoge para la formulación el que no lo fuera. Para realizar la formulación se seleccionó como agente viscosante al ácido esteárico.

4.2. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN

4.2.1. Establecimiento de la fórmula

La fórmula seleccionada para la crema es la mezcla 9 (Tabla 11) presenta mayor respuesta de porcentaje de principio activo y se descarta cualquier tipo de interacción entre los distintos componentes de la formulación.

La crema repelente se elaboró en el laboratorio de tecnología farmacéutica del Departamento de Química siguiendo las normas de fabricación especificadas para el producto y presenta las siguientes características como se ve en las tablas 14,15 y 19.

4.2.2. Fórmula de composición

Cada 100 g contiene:

Aceite esencial <i>B. graveolens</i> (Palo santo).....	3 %
Excipientes	c.s.p.

4.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Las cremas se almacenaron a las condiciones propuestas por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INH) durante 3 meses. Se evaluaron las propiedades organolépticas, físico-químicas y microbiológicas del producto.

³⁶ Amela, J.; Valero, E. Estudios de preformulación. En Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Eds., Glatt Laborotecnic: Barcelona, 2001; Vol. 1, pp 95-103

4.3.1 Parámetros organolépticos

Como puede observar en la tabla 10 la crema presenta un aspecto homogéneo, una textura cremosa y un color blanco y olor balsámico durante el periodo de estabilidad; en las muestras almacenadas en condiciones aceleradas sólo se observó un ligero cambio del color al tercer mes del estudio, pero se mantiene en blanco, pequeña alteración aceptable en temperaturas elevadas.

Tabla 14. Resultados del análisis organolépticos de la crema

ANALISIS	CONDICIONES	MESES			
		0	1	2	3
ASPECTO	Ambiente	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	30 °C	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	40 °C	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
CONSISTENCIA	Ambiente	Semisólida	Semisólida	Semisólida	Semisólida
	30 °C	Semisólida	Semisólida	Semisólida	Semisólida
	40 °C	Semisólida	Semisólida	Semisólida	Semisólida
COLOR	Ambiente	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	30 °C	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	40 °C	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
OLOR	Ambiente	Balsámico	Balsámico	Balsámico	Balsámico
	30 °C	Balsámico	Balsámico	Balsámico	Balsámico
	40 °C	Balsámico	Balsámico	Balsámico	Balsámico

Elaboración: La autora

En ningún lote se detectó arenosidad sensible al tacto ni grumos, éstas características no cambiaron apreciablemente durante el tiempo de estudio.

La consistencia de la crema se mantuvo a las tres temperaturas, aunque las muestras almacenadas a 40°C, una vez finalizado el período de 3 meses, mostró cierta fluidez.

4.3.2. Parámetros físicos-químicos

En la tabla 15 se indican los resultados de los análisis físico-químicos de la crema al ambiente, 30°C y 40 °C, durante 3 meses de evaluación.

Tabla 15. Resultados del análisis físico-químico de la crema

ANÁLISIS	CONDICIONES	MESES			
		0	1	2	3
Densidad g/cm ³	Ambiente	0,	0,83098	0,8258	0,7979
	30 °C	0,7746	0,9207	0,8597	0,8545
	40 °C	0,7746	0,8638	0,8597	0,85028
pH	Ambiente	5,6	5,8	5,8	5,9
	30 °C	5,6,	5,9	5,9	6
	40 °C	5,6	5,8	6	6
Extensibilidad mm ²	Ambiente	1396,3	1689,5	1944,2	2061,2
	30 °C	1396,3	1233,7	2078,4	1689,5
	40 °C	1396,3	1396,3	1689,5	1846,6
Concentración Aceite esencial (%)	Ambiente	98,02	91,03	74,12	72,29
	30 °C	98,02	90,28	70,88	70,64
	40 °C	98,02	91,72	71,63	70,04

Elaboración: La autora

Los parámetros densidad, pH y extensibilidad se analizaron estadísticamente mediante Análisis de Varianza ANOVA, con el fin de determinar diferencias significativas entre los 3 parámetros vs el tiempo, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 16. Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Densidad vs. Tiempo

Contraste	Diferencia	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
30 °C vs Ambiente	0,045	2,792	0,372	
30°C vs 40°C	0,015	2,792	0,882	
40 °C vs Ambiente	0,030	2,792	0,631	

Elaboración: La autora

Tabla 17. Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre pH vs. Tiempo

Contraste	Diferencia	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
40 °C vs Ambiente	0,075	2,792	0,623	
40 °C vs 30 °C	0,000	2,792	0,639	
30 °C vs Ambiente	0,075	2,792	0,803	

Elaboración: La Autora

Tabla 18. Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Extensibilidad vs. Tiempo

Contraste	Diferencia	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
Ambiente vs 30 °C	4,268	2,792	0,623	
Ambiente vs 40 °C	4,143	2,792	0,639	
40 °C vs 30 °C	0,125	2,792	1,000	

Elaboración: La autora

Los resultados nos indican que existe diferencias no significativas (con un límite de confianza del 95%) entre los parámetros evaluados y la temperatura, durante los tres meses del estudio.

Al observar la Tabla 15 los valores de la *densidad* decrecen debido a que más alta es la temperatura más fluido se vuelve el producto, por tanto la densidad baja.⁴⁴ Explicando la fluidez de la crema almacenada 40 °C. El *pH* obtenido de la crema repelente aunque no se mantiene constante debido a la ausencia de un amortiguador de pH (ver Tabla 15) sin embargo el pH obtenido está dentro del rango permitido para formulaciones tópicas, desde el punto de vista clínico dermatológico la piel tiene un intervalo de pH de 4–6, (ligeramente-acido), se puede considerar que es exento de provocar algún tipo de afectación en la piel del consumidor, ya que a valores muy bajos se produce disfunciones en el sistema defensivo de la piel.

La prueba de *extensibilidad* proporciona una medida del umbral de deformación del sistema, los valores alcanzados revelan aumento de extensibilidad desde el segundo mes, coincidiendo con lo descrito por García O.⁴⁵, a mayor área de extensibilidad, menor consistencia y por tanto, mayor facilidad de aplicación del producto.

Se valoró de forma mensual el producto a las diferentes condiciones de estudio mediante GC-MS. En la tabla 15 se muestra los porcentajes de concentración en relación al tiempo de estudio (3 meses).

Al observar los valores en la tabla correspondientes a las muestras al tiempo cero y los datos obtenidos en el transcurso de los 3 meses de evaluación, se observa considerable disminución a partir del primer mes del contenido de principio activo.

Salazar R.³⁷ denomina inestabilidad química a la descomposición del principio activo que posee durante el periodo de almacenamiento, con la consiguiente aparición de productos químicos. En el estudio de estabilidad, los perfiles cromatográficos a más de impurezas no revelan productos de degradación y al no existir alteraciones en los demás parámetros; la degradación del principio activo es atribuible al material de acondicionamiento del producto final.

⁴⁴ Almirall, I.; Fernández, T.; González, H.; Díaz M. Diseño de una crema para masajes con extracto de *spirulina* cubana. *Rev Cubana Farm.* **2005**, 39.

⁴⁵ García, O.; Suárez, Y.; Mishig, M.; Thanh T.; Desarrollo y optimización de una jalea de piroxicam 0,5. *Rev. Cubana de Farmacia.* **2009**, 43, 4-19

³⁵ Salazar, R.; Amela, J.; Rivero, X. Planificación y Programación de los Estudios de Estabilidad. En *Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*. Eds., Glatt Labortecníc: Barcelona, 2001; Vol. 1.pp 437-459

El producto se envasa en material plástico colapsible, por su empleo en la mayoría de formas tópicas; sin embargo, presentó inconvenientes por su permeabilidad a productos volátiles.²⁸ Por consiguiente se produce la volatilización de componentes del aceite esencial influyendo en la estabilidad del principio activo dentro de la forma farmacéutica.

Esto se confirma por comparación del tipo de envase (vidrio) usado en el diseño Plackett y Burman, la concentración del aceite esencial permanece al 92 % durante 2 meses, mientras con el envase de plástico un promedio de 72% mostrando que el único factor responsable para el decremento de la potencia es el material de envase usado para la crema repelente de *B. graveolens*.

4.3.3. Parámetros microbiológicos

El análisis microbiológico de la crema repelente sometida a las tres condiciones: Ambiente Loja (21 °C Aprox.), 30 °C, 40 °C, se realizó en el laboratorio de bioactividad del Departamento de Química, UTPL, los resultados se exponen en la tabla 19, los ensayos para cada bacteria se indican en el **Anexo VI**.

Tabla 19. Pruebas de estabilidad microbiológica de la crema repelente.

ANÁLISIS	ESPECIFICACIONES USP	CONDICIONES	MESES			
			0	1	2	3
Bacterias aerobias mesofila / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Ausencia	<10 ufc/g	30 ufc/g	40 ufc/g
		30 °C		<10 ufc/g	<10 ufc/g	20 ufc/g
		40 °C		Ausencia	<10 ufc/g	<10 ufc/g
Hongos, mohos y levaduras / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C		Ausencia	Ausencia	Menor a 10 ufc/g
		40 °C		Ausencia	Ausencia	Menor a 10 ufc/g
<i>Escherichia coli</i> / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i> / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i> / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C		Ausencia	Ausencia	Ausencia

Elaboración: La autora

²⁸ Suñe, J.M. Material de Acondicionamiento de Uso Farmacéutico. *En Tratado de farmacia galénica*; Faulí, T.C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000; Vol.1, pp 227-239.

El análisis microbiológico es de suma importancia ya que las formulaciones O/W cuyo componente mayoritario es el agua, tienen un importante riesgo de contaminación microbiológica. En los resultados obtenidos se establece que las colonias bacterianas, así como el conteo total de hongos y levaduras se encuentran por debajo del máximo permisible por las especificaciones USP-NF32 asegurando por consiguiente los parámetros de calidad en cuanto a asepsia y cantidad adecuada de agente antimicrobiano en la elaboración del producto.

4.3.4. Predicción de la Estabilidad

4.3.4.1. Método de Arrhenius

El método de predicción más frecuentemente utilizado es el método de Arrhenius, presenta varias limitaciones como el tiempo de vida más estricto generalmente es 90%. Los datos de la tabla 15 no se encuentran dentro de los rangos establecidos para este método y por tratarse de un principio activo botánico no presenta especificaciones en las farmacopeas.

4.4. BIOENSAYO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE

En la tabla 20 se incluyen los porcentajes y clases de repelencia de las muestras de cremas durante el periodo de evaluación.

Tabla 20. Porcentaje de repelencia de la crema a base de *B. graveolens* durante los 3 meses de estudio usando el test de papel filtro.

No. Muestra	Tiempo	Repelencia (%) ¹ a:				Repelencia Media (%) ¹	Clase de Repelencia
		1h	2h	3h	4h ²		
1	Mes 0	75,93	70,05	66,93	64,15	68,76	IV
2	Mes 1	77,74	76,8	70,05	67,03	72,90	IV
3	Mes 2	78,52	73,74	70,05	63,40	71,43	IV
4	Mes 3	81,89	79,52	68,43	65,43	73,82	IV

¹Porcentaje de repelencia PR (%)

² horas de tratamiento

Elaboración: La autora

Los resultados de los bioensayos de repelencia indican que la crema a base del aceite esencial de *B. graveolens* presentó alto efecto repelente frente a los zancudos

(mosquitos de estudio) ubicándose en la **clase IV**. Si bien la máxima repelencia PR = 73,82% se logró con la muestra del tercer mes, no existe variación entre las muestras de los otros meses. **(Anexo VII)**

Aunque existe una leve tendencia a la disminución de la actividad repelente con el aumento del tiempo de exposición en las últimas horas hecho que puede ser atribuido a la alta volatilidad de los metabolitos presentes en los aceites esenciales,⁴⁶ la eficiencia de la crema al 3% muestra actividad repelente contra zancudos durante un periodo promedio de 4 horas, con relación al repelente comercial reportado en la literatura por Rey J.², cuyo principio activo es el DEET (6.65%) que presenta un tiempo de protección completa de 2 horas, pues la mitad de concentración de la crema repelente actúa por mayor tiempo.

Al comparar la eficiencia con los repelentes naturales comercializados contra mosquitos, tales como el aceite de citronela y el de eucalipto (30 min a 1h), se encontró que la crema repelente a base de *B. graveolens* repele por mayor tiempo.

4.5. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA POR VÍA DÉRMICA DE LA CREMA REPELENTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *B. graveolens*

Las variables consideradas para en el estudio dieron como resultado lo siguiente:

Variación en peso

Tanto en el grupo A como para el grupo tratado B no presentaron diferencia significativa con una probabilidad de ($p < 0,5$).

Mortalidad

No existió presencia de animales muertos (0% mortalidad).

⁴⁶ Olivero, J.; Caballero K.; Jaramillo, B.; Stashenko, E. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst Universidad de Santander

⁴ Rey, J.; Rutledge, R. Repelentes contra mosquitos. Florida. Medical Entomology Laboratory. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville. 2004

Signos toxicológicos

En las observaciones realizadas, durante el periodo de estudio no presentaron alteración a nivel de pelaje ni de piel u otros signos como: prurito, eritema, formación de edemas, escara/costras.

Patológica Macroscópica

Al término del ensayo se sacrificaron a todos los animales y se les practicó la necropsia macroscópica, observando si existían alteraciones a nivel de órganos y tejidos. A la dosis de 2000 mg/kg, no se observaron alteraciones en ninguno de los órganos observados. Tabla 21 y 22

Tabla 21. Observaciones Macroscópicas (machos)

Hembras	A	B
Respiratorio	0	0
Digestivo	0	0
Sistema Nervioso	0	0

(0) Ausencia de Anormalidad

(P) Presencia de la Anormalidad

Fuente: Informe de Ensayo Toxicológico. Laboratorio PROGECA.2012

Tabla 22. Observaciones Macroscópicas (hembras)

Machos	A	B
Respiratorio	0	0
Digestivo	0	0
Sistema Nervioso	0	0

(0) Ausencia de Anormalidad

(P) Presencia de la Anormalidad

Fuente: Informe de Ensayo Toxicológico. Laboratorio PROGECA. 2012

Los animales expuestos por vía dérmica al producto cuando se les suministra las dosis de 2000 mg/kg, según los resultados descritos no revelaron ningún tipo de alteración en los animales tratados tópicamente con el producto de estudio en peso, en los sistemas digestivo, nervioso y respiratorio al término de 14 días del estudio.

Los resultados descritos, manifiestan que la DOSIS AGUDA DERMICA de 400 mg/200g de peso corporal en ratas, bajo las condiciones de ensayo (OECD TG 402) demuestran que es un producto que no produce toxicidad en los animales de experimentación.

Arencibia D.⁴⁷, afirma que aunque para valorar cómo respondería un organismo humano no basta una extrapolación directa de los resultados obtenidos con animales, sí dan idea del grado de toxicidad pues los roedores han sido las especies con un largo historial de experimentación y son los que mejor han ejemplificado la reacción en humanos.

El producto al 3% de concentración no presenta toxicidad, aspecto de gran importancia pues la crema será aplicada en áreas extensas de la piel del consumidor.

⁴⁷ Arencibia, F.; Rosario, A.; López, Y.; Medina, M.; Infante, J.; Díaz, D.; Priet, J.L. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Rev. Toxicól. [Online]. 2003 pp 1-13 .Sitio web: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Teniendo en cuenta los antecedentes encontrados en la literatura consultada y los resultados obtenidos mediante GC-MS, se define que su actividad repelente del aceite esencial de *B. graveolens* no es atribuible a un mecanismo específico, sino a la actividad combinada de la gran variedad de compuestos químicos con mayor abundancia presente en el aceite esencial.
- A través de los estudios de preformulación se confirmó las condiciones óptimas del principio activo (Palo santo) para el desarrollo de la investigación.
- Mediante el diseño factorial se seleccionó la fórmula final, utilizando como agente viscosante al ácido esteárico, asegurando una crema repelente sin cualquier tipo de interacción entre el aceite esencial y sus excipientes.
- Los ensayos de estabilidad acelerada permitieron conseguir el determinante de la inestabilidad en el transcurso del estudio, al no existir alteraciones en los parámetros físico-químicos y microbiológicos; se atribuye al material de acondicionamiento como el responsable del decremento del porcentaje de concentración del aceite esencial.
- Mediante el método de Arrhenius se determina la vida útil de productos en donde su concentración no disminuya drásticamente (mínimo 10%) en la investigación realizada la concentración del aceite esencial fue influenciada por el tipo de envase usado, resultando no ser el apropiado para la crema repelente.
- A través del bioensayo de la actividad repelente se logró determinar la eficacia de la crema repelente a partir del aceite esencial de *B. graveolens* presenta una clase repelente IV (PR=73,82%) resultando efectivo un periodo de 4 horas, constituyendo un control para mosquitos y posible alternativa a los repelentes sintéticos.
- El producto se sometió a determinación de la toxicidad aguda dérmica mostró no ser tóxico para los animales de experimentación. Por lo tanto puede ser aplicado a nivel dérmico de los consumidores.

- Los resultados obtenidos en la investigación realizada, demostraron la actividad repelente del aceite esencial extraído de los frutos de *B. graveolens*, propiedad respaldada por su uso en medicina tradicional, considerados como fuente potencial de repelentes contra mosquitos.
- Los Repelentes Botánicos son productos promisorios para la industria farmacéutica, ya que son productos eco-amigables, biodegradables y seguros para los usuarios.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio del aceite esencial de los frutos de *B. graveolens* realizando ensayos con otras especies de mosquitos; así mismo el desarrollo con otras metodologías reportadas en estudios con el fin de comprobar su efectividad frente esas especies
- Realizar la preparación de la crema repelente de acuerdo a estándares de calidad, con el fin de evitar riesgos de contaminación y con ello pérdida de efectividad.
- Es indispensable realizar el control del pH desde el momento de manufactura pues es un factor importante dentro de las formas farmacéuticas tópicas, el mismo debe estar dentro del pH normal de la piel (4-6), es recomendable la adición de un amortiguador de pH para que permanezca dentro del rango.
- En el estudio de preformulación perfeccionar la fórmula mediante ensayos de interacciones entre el principio y excipientes a mayores temperaturas: 45-75 °C durante 2 semanas a 1 mes.
- Es necesario realizar un estudio de preformulación de la crema repelente empleando diversos tipos de envases de material impermeable en donde no ocurra la volatilización de los compuestos del aceite esencial y con ello la disminución de su concentración.
- El producto crema repelente de *B. graveolens* al 3 % no mostró ninguna toxicidad pudiéndose formular en mayores concentraciones, las mismas que se deben analizar mediante el estudio de toxicidad aguda dérmica.
- Es recomendable el empleo de métodos indirectos para medir el grado de repelencia de la crema repelente sin la participación de voluntarios humanos, debido a que no presentan riesgos de los vectores hacia humanos.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXO I

MEZCLAS PRINCIPIO ACTIVO-EXCIPIENTES

FÓRMULA 1	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETOESTERILICO	10
VASELINA SÓLIDA	6
VASELINA LÍQUIDA	4
ACIDO ESTEARICO	2
ACEITE DE SILICONA	1,5
BHT	0,1
TWEEN 80	0,5
SPAN 60	3,5
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 2	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETOESTEARILICO	10
PARAFINA SÓLIDA	6
PARAFINA LÍQUIDA	4
ACIDO ESTEARICO	2
α- TOCOFEROL	0,1
ACEITE DE SILICONA	1,5
TWEEN 80	0,5
SPAN 60	3,5
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 3	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETILICO	10
VASELINA SOLIDA	6
PARAFINA LIQUIDA	4
ACIDO ESTEARICO	2
α- TOCOFEROL	0,1
TWEEN 80	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 4	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETOESTEARILICO	10
VASELINA SOLIDA	6
VASELINA LIQUIDA	4
CERA BLANCA	2
α- TOCOFEROL	0,1
TWEEN 40	0,5
SPAN 60	3,5
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 5	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETOESTEARILICO	1
VASELINA SOLIDA	6
VASELINA LÍQUIDA	4
CERA BLANCA	2
BHT	0,1
TWEEN 80	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 6	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETOESTEARILICO	10
PARAFINA SOLIDA	2
VASELINA LIQUIDA	10
CERA BLANCA	2
α- TOCOFEROL	0,1
ACEITE DE SILICONA	1,5
TWEEN 40	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 7	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETILICO	10
PARAFINA SOLIDA	6
VASELINA LIQUIDA	4
ACIDO ESTEARICO	2
BHT	0,1
TWEEN 40	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 8	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETILICO	10
PARAFINA SOLIDA	6
PARAFINA LIQUIDA	4
CERA BLANCA	2
ACEITE DE SILICONA	1,5
BHT	0,1
TWEEN 80	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 9	
COMPONENTES	% (p/v)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETILICO	10
VASELINA SOLIDA	6
VASELINA LIQUIDA	4
ACIDO ESTEARICO	2
ACEITE DE SILICONA	1,5
α- TOCOFEROL	0,1
TWEEN 40	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 10	
COMPONENTES	% (p/v)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETOESTEARILICO	10
PARAFINA SOLIDA	6
PARAFINA LIQUIDA	4
ACIDO ESTEARICO	2
BHT	0,1
TWEEN 40	0,7
SPAN 60	3,3
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 11	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETILICO	10
VASELINA SOLIDA	2
PARAFINA LIQUIDA	14
CERA BLANCA	0,03
ACEITE DE SILICONA	2
BHT	1
TWEEN 40	0,5
SPAN	3,5
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PURIFICADA	C.S

FÓRMULA 12	
COMPONENTES	% (p/p)
PRINCIPIO ACTIVO	3
ALCOHOL CETILICO	10
PARAFINA SOLIDA	6
VASELINA LIQUIDA	4
CERA BLANCA	0,03
α- TOCOFEROL	0,5
TWEEN 80	0,5
SPAN 60	3,5
METILPARABENO	0,18
PROPILPARABENO	0,02
PROPILENGLICOL	10
GLICERINA	3
AGUA PARA AFORO	C.S

ANEXO II

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Extracción Líquido -Líquido

La crema repelente recibe un tratamiento antes de ser inyectada en el método de análisis (GC/MS), para ello se realiza lo siguiente:



1

1) Pesar el contenido de los viales



2

2) Agregar 8 ml de metanol y agitar en un vórtex durante 5 minutos



3

3) Llevar a un baño ultrasónico durante 10 minutos



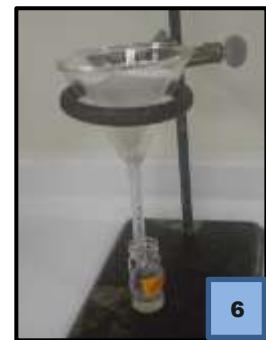
4

4) Traspasar la mezcla a un embudo de decantación y adicionar el 8 mL de hexano (disolvente apolar).



5

5) Se agita vigorosamente y se espera por 10-15 minutos la separación de las fases



6

6) Agitar vigorosamente y se espera por 10-15 minutos la separación de las fases



7

7) Adicionar Sulfato de sodio anhidrido a la parte hexanica para eliminar en su totalidad el contenido de agua.



8

8) Filtrar con filtros Millipore 0,45 μm .



9

9) Realizar la dilución con diclorometano (10 μl :990 μl) para inyectar

ANEXO III

FORMULACIÓN DE LA CREMA CON CÁLCULO BHL

	COMPONENTES	% FORMULA	BHL	BHLr
FASE GRASA 17%	ACEITE ESENCIAL <i>B. graveolens</i>	3		
	ALCOHOL CETILICO	8	14,47	7,06
	VASELINA SOLIDA	4	12	2,82
	VASELINA LIQUIDA	3	12	2,12
	ACIDO ESTEARICO	2	15	1,76
	ACEITE DE SILICONA	1,5		
	α-TOCOFEROL	0,1		
	SUMA	17		13,76
EMULSIFICANTE 4%	TWEEN 40	0,7	15,6	
	SPAN 60	3,3	4,7	
FASE ACUOSA	METILPARABENO	0,18		
	PROPILPARABENO	0,02		
	PROPILENGLICOL	10		
	GLICERINA	3		
	SUMA TOTAL	62,8		
	AGUA			
CALCULO BHLr		15,6-13,76	1,84	0,6752293
		13,76-4,7	9,06	3.3247706
		SUMA =	10,9	4

ANEXO IV

PRODUCTO SOMETIDO AL ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Fotografía 5. Crema repelente sometida a Estabilidad Acelerada a Temperatura Ambiente



Elaboración: La autora

Fotografía 6. Crema repelente sometida a Estabilidad Acelerada a 30 °C



Elaboración: La autora



Elaboración: La autora

Fotografía 7. Crema repelente sometida a Estabilidad Acelerada a 40 °C



Elaboración: La autora

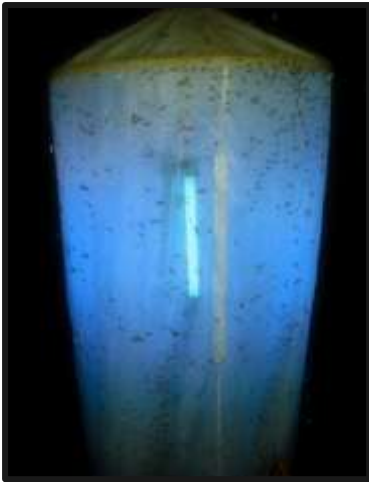


Elaboración: La autora

ANEXO V

EQUIPO PARA EL BIOENSAYO DE REPELENCIA

Fotografía 8. Trampa de Luz



Elaboración: La autora

Fotografía 9. Aspirador de mosquitos



Elaboración: La autora

ANEXO VI

BIOENSAYO DE REPELENCIA

Fotografía 10. Bioensayo de Repelencia entre la crema mes 0 (A) y crema mes 3 (B)



Fuente: La autora

ANEXO VII

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN AGAR REALIZADOS AL PRODUCTO

Fotografía 11. Aerobios mesófilos



Elaboración: La autora

Fotografía 12. Hongos, mohos y levaduras



Elaboración: La autora

Fotografía 13. *Escherichia coli*



Elaboración: La autora

Fotografía 14. *Staphilococos aureus*



Elaboración: La autora

Fotografía 15. *Pseudomona aeruginosa*



Elaboración: La autora