



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

"Diseño y desarrollo de un desinfectante para pisos a base del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*)"

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

AUTORA: Bravo Arias, Olga Fabiola

DIRECTOR: Ojeda Riascos, Edgar Santiago, BQF

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Bioquímico Farmacéutico.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "Diseño y desarrollo de un desinfectante para pisos a base del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*)" realizado por: Bravo Arias Olga Fabiola, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2014

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Bravo Arias Olga Fabiola declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: Diseño y desarrollo de un desinfectante para pisos a base del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*), de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Edgar Santiago Ojeda Riascos director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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).....

Bravo Arias Olga Fabiola

C.I 1105433377

DEDICATORIA

A mis padres, Fabiola Arias Molina y Raúl Bravo Luna, a mi hermano, Marcelo Bravo Arias, por su apoyo incondicional en cada instante de mi vida, ya que es gracias a ellos que he podido seguir mi sueños y llegar a donde me encuentro, por estar conmigo en todo momento por animarme y enseñarme que puedo cumplir mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a Dios quien supo guiarme y darme fuerzas para seguir adelante, y cumplir mis objetivos.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Titulación de Bioquímica y Farmacia por abrirme las puertas y permitirme cumplir con mis objetivos tanto personales como académicos.

Al BQF Santiago Ojeda Riascos y a la BQF Marisol Vacacela por su asesoría en la elaboración de este trabajo. Por compartir sus conocimientos y experiencia durante mi formación como profesional.

Al Departamento de Química, al Laboratorio de Química, quienes me brindaron todos los medios a su disposición para permitirme la elaboración del presente trabajo.

Finalmente a mi familia, compañeros y amigos quienes mediante su conocimiento y consejo contribuyeron para alcanzar la culminación de mi carrera profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	II
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Desinfectantes.....	6
1.1.1 Desinfectantes naturales.....	6
1.2 Aceites esenciales.....	6
1.2.1 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.....	7
1.2.2 Concentración de los aceites esenciales con actividad antimicrobiana ...	7
1.2.3 Componentes responsables de la actividad antimicrobiana.....	7
1.3 Palo Santo (Bursera graveolens).....	8
1.3.1 Clasificación Taxonómica	8
1.3.2 Sinónimos.....	8
1.3.3 Descripción botánica.....	8
1.3.4 Hábitat	9
1.3.5 Aceite esencial de Bursera graveolens	9
1.3.6 Parte utilizada	9
1.3.7 Características y usos.....	9
1.4 Componentes principales de los productos para limpieza y desinfección	10
1.4.1 Principales características en un desinfectante.....	11
1.5 Estudios de estabilidad.....	11
1.5.1 Tipos de estudios de Estabilidad:.....	12
1.5.2 Estudios a tiempo.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Obtención del aceite esencial.....	14
2.1.1 Área de recolección.....	14
2.1.2 Extracción del aceite esencial.....	14
2.2 Estudios de preformulación.....	15
2.2.1 Valoración del Principio activo.....	15
2.2.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas.....	17
2.2.2.1 Densidad Relativa.....	17

2.2.2.2 Índice de refracción.....	17
2.2.2.3 Solubilidad	17
2.2.3 Estudio de compatibilidad aceite esencial – excipientes.	18
2.2.3.1 Diseño factorial de Plackett y Burman.....	18
2.3 Estudios de Formulación	20
2.3.1 Establecimiento de la fórmula	20
2.3.2 Proceso de fabricación	20
2.4 Estudio de estabilidad	21
2.4.1 Predicción de la estabilidad.....	21
2.4.1.1 Método de Arrhenius.....	21
2.5 Estudio de actividad antimicrobiana y antifúngica.....	22
2.5.1 Actividad antimicrobiana del aceite.	22
2.5.2 Actividad antifúngica del aceite.	23
2.5.3 Actividad antifúngica en producto terminado	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
3.1 Identificación de componentes del aceite esencial mediante C/MS.....	25
3.2 Control de calidad del aceite esencial de palo santo (<i>Bursera.graveolens</i>)	26
3.3 Compatibilidad excipientes - aceite esencial:.....	26
3.4 Elaboración del desinfectante.....	30
3.4.1 Fórmula de composición.	30
3.5 Pruebas de estabilidad del desinfectante	30
3.5.1 Análisis organoléptico.....	30
3.5.2 Análisis Físico químico.....	30
3.5.3 Análisis microbiológico.....	32
3.5.4 Determinación de la vida útil	33
3.6 Estudio de actividad antibacteriana y antifúngica del aceite.	33
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS.....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Zonas climáticas en el Mundo.	12
Tabla 2. Solubilidad en términos descriptivos.....	18
Tabla 3. Distribución y acondicionamiento de las mezclas	19
Tabla 4. Formulación base para el desinfectante	20
Tabla 5. Parámetros de estabilidad.....	21
Tabla 6. Compuestos identificados en el aceite esencial de palo santo	25
Tabla 7. Factores o excipientes usados para el diseño de Plackett y Burman.....	27
Tabla 8. Matriz de ensayos. Determinación de la respuesta mediante GC/MS	27
Tabla 9. Potencia del principio activo para cada mezcla	28
Tabla 10. Tabla de Student	29
Tabla 11. Fórmula escogida para la elaboración del desinfectante	29
Tabla 12. Resultados del análisis organoléptico.....	30
Tabla 13. Resultados del análisis físico-químico	31
Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de Turkey (HSD) entre pH y tiempo. .	31
Tabla 15. Prueba de comparación múltiple de Turkey(HSD) densidad vs tiempo	32
Tabla 16. Resultado de análisis microbiológico.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árbol <i>B.graveolens</i> (Palo santo)	8
Figura 2: Mapa del área de recolección de <i>B. graveolens</i>	14
Figura 3: Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N.....	15
Figura 4. Esquema del análisis cromatográfico del aceite esencial.....	16
Figura 5: Refractómetro ABBE	17
Figura 6. Diagrama de fabricacion del desinfectante	20
Figura 7. Cromatograma del aceite esencial de Palo Santo	25
Figura 8: Resultados del análisis microbiológico	33

RESUMEN

En el presente trabajo se buscó aplicar como agente desinfectante el aceite esencial de Palo Santo. Con el fin de determinar la compatibilidad principio activo – excipientes en un periodo de tiempo determinado se realizó un estudio de preformulación en base al diseño factorial de Plackett y Burman. La valoración del aceite esencial se realizó mediante GC-MS.

Se realizó el estudio de las características físico-químicas y microbiológicas durante los seis meses de estudio de estabilidad, en donde se observaron variaciones en la coloración, pH, y concentración del principio activo, Finalmente, se realizó la actividad biológica del producto terminado aplicando la técnica de microdilución en caldo, el mismo que mostró inhibición a concentraciones inferiores a 1000ppm, incluso en la muestra de excipientes libre de principio activo, frente a: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*

Palabras clave: Palo Santo (*Bursera graveolens*), desinfectante, aceite esencial, Plackett y Burman, microdilución en caldo

ABSTRACT

The aim of this study was to apply the essential oil of palo santo (*Bursera graveolens*) as a disinfectant. To determine the compatibility active principle – excipients through of a period time study was performed based on the factorial Plackett and Burman. The essential oil valuation of was performed by GC-MS.

The study of the physico-chemical and microbiological characteristics were performed during the six-month stability study, where the variations were observed in the color, pH, and concentration of the active principle. The biological activity of the product was performed using the broth microdilution assay. The results showed inhibition at concentrations less than 1000 ppm even in the sample free of active ingredient against to *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*.

Key words: Palo Santo (*Bursera graveolens*), disinfectant, essential oil, Plackett and Burman, broth microdilution

INTRODUCCIÓN

En la presente investigación se buscó diseñar y desarrollar un producto que posea todas las características de un desinfectante aplicando como agente desinfectante el aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*), cuyo objetivo fundamental será el combatir y eliminar en gran parte los gérmenes y bacterias mejorando las condiciones sanitarias, ya que como Bioquímicos Farmacéuticos es parte de nuestro trabajo contribuir con el desarrollo de nuevos productos en la industria, con el fin de evitar contaminaciones y preservar la salud de las personas. Este trabajo se desarrolla en tres capítulos, el primer capítulo comprende el marco teórico y trata sobre los conceptos fundamentales de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación y en el tercer capítulo se expone y analiza los resultados.

Esta investigación se realizó con el fin de contribuir con la sanitización de espacios tanto públicos como domésticos mediante la producción de un desinfectante natural, a partir de aceite esencial de Palo Santo, esto, mediante el desarrollo de los siguientes objetivos específicos también considerados como componentes del proyecto: La valoración de la composición química del aceite esencial de *B. graveolens* mediante cromatografía de gases acoplada a espectro de masas (CG-MS), para la identificación de los componentes, se determinó los índices de Kóvats de los picos detectados en la columna DB-5MS, se analizó el espectro de masas de los mismos, se comparó el espectro de cada pico con los propuestos en la librería WILEY y se realizó la comparación de los índices de Kóvats obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura. Mediante el diseño factorial Plackett y Burman se realizó el estudio de preformulación farmacéutica del principio activo, con el objeto de determinar las incompatibilidades con sus posibles excipientes a fin de conseguir la mezcla más estable para el desarrollo del producto, por lo cual se sometieron las distintas mezclas a temperatura ambiente, 30 y 40 °C durante 8 semanas luego de lo cual se procedió a su observación y análisis, mediante CG/MS, con el fin de determinar el contenido en principio activo, detectar y cuantificar posibles impurezas y productos de degradación. Una vez escogida la fórmula del desinfectante, esta, se sometió a condiciones de estrés o degradación acelerada para determinar su estabilidad durante 6 meses siguiendo Normas ICH (Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), en intervalos de 30 días se evaluó el producto mediante ensayos organolépticos, físico-químicos y microbiológicos, para los resultados obtenidos del análisis físico-químico se empleó el programa XLSTAT, que es un

complemento de solución de estadística y análisis de datos para el Microsoft Excel. Finalmente para la evaluación del efecto antimicrobiano con la finalidad de determinar la efectividad del producto terminado se aplicó el método de microdilución en caldo, usando una concentración bacteriana de 5×10^5 ufc/mL para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y una concentración de 1×10^5 esporas/mL para hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

MARCO TEÓRICO

1.1 Desinfectantes

Los pisos son lugares propicios para el crecimiento y proliferación de microorganismos, los cuales pueden ser capaces de afectar la salud en cualquiera que sea la situación. Un agente desinfectante es, por lo general un producto químico cuya principal característica es llevar compuestos que matan y destruyen la estructura externa de los parásitos, bacterias, protozoarios, hongos, virus, prácticamente por oxidación o desintegración.^[4] Muchos desinfectantes y prácticas de desinfección han sido inspirados por prácticas empíricas de higiene personal, tales como el escalado con agua, el uso de colorantes o la exposición a los rayos de sol en primavera. El arte y la ciencia de la desinfección precedieron, sin duda, a la teoría infecciosa de la enfermedad. En un principio se observó que ciertos compuestos, cuando se aplicaban sobre cadáveres en descomposición o se agregaban a las aguas residuales, atenuaban la emanación de malos olores. Sobre tales bases empíricas, el uso de los desinfectantes y su aplicación en la desinfección se fue desarrollando hasta configurar una ciencia de considerable magnitud^[7]

1.1.1 Desinfectantes naturales

Los desinfectantes naturales hacen referencia a aquellas sustancias con capacidad antimicrobiana, diferentes a los desinfectantes químicos tradicionales tales como el hidróxido de sodio, los compuestos fenólicos o los ácidos orgánicos. Entre estas sustancias tenemos los aceites esenciales u otros extractos vegetales. Generalmente los aceites esenciales tienen notables propiedades antimicrobianas, sin embargo su mecanismo de acción aún no está definido. Diversos estudios determinan que los aceites esenciales procedentes de: clavo, canela, mostaza, orégano, romero y tomillo poseen la actividad antimicrobiana más acentuada^[8]

1.2 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).^[9]

1.2.1 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los componentes mayoritarios de un aceite esencial pueden constituir hasta un 85% del total, mientras que el resto se presentan como trazas. La concentración de compuestos en el total de la mezcla de aceite de una planta puede ser muy variable. Algunos estudios demuestran que los componentes minoritarios cumplen un papel crítico, en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre ellos de forma que el aceite entero tiene mayor actividad que la mezcla de sus principios activos minoritarios. Los aceites esenciales son en general ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a Gram negativas, esto puede deberse a la influencia de la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales de naturaleza lipófila.^[8]

1.2.2 Concentración de los aceites esenciales con actividad antimicrobiana

En relación a la concentración utilizada de los aceites esenciales como alternativa antimicrobiana, existen estudios en *Citrus reticulata* (mandarina) en los que se determinó la actividad antibacteriana del aceite en soluciones a concentraciones: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% usando etanol como solvente. Al realizar la comparación entre el aceite esencial de mandarina variedad Dancy y el aceite comercial Gerch el aceite de la variedad Dancy inhibió a partir del 10%, mientras que el comercial Gerch inhibió a partir del 20%.^[10]

1.2.3 Componentes responsables de la actividad antimicrobiana.

En el estudio realizado por Bailac *et.al*^[11], en el cual se analizó y determinó los principales componentes y propiedades del aceite esencial de *Eupatorium patens*, se observó que al igual que en estudios previos realizados sobre aceites esenciales que presentaron actividad antimicrobiana, el aceite esencial de *Eupatorium patens* poseía un alto porcentaje de terpenos oxigenados (71,5%). Analizando, además, otras publicaciones que relacionan la composición química del aceite esencial con su actividad antimicrobiana, se puede inferir que la presencia de estos terpenos oxigenados serían los responsables de dicha actividad. En el estudio realizado por Robles *et al.*, 2001 mostraron que el extracto etanólico y fracciones de *Bursera graveolens* presentaron efecto inhibitorio frente *S. aureus* y *B. subtilis*. Esta acción antimicrobiana parece que se debe a la presencia de compuestos del tipo triterpenos tetraciclicos cuya estructura es similar a la del conocido antibiótico ácido fusídico.^[6]

1.3 Palo Santo (*Bursera graveolens*)

1.3.1 Clasificación Taxonómica

En la figura 1. Se observa el árbol de *Bursera graveolens*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Burseraceae

Género: *Bursera*

Especie: *Graveolens*

Nombre científico: *Bursera graveolens* (Kunth)
Triana & Planch

Nombre común: Palo Santo



Figura 1: Árbol *B.graveolens* (Palo santo)

Fuente: Cortesía del PhD Vladimir Morocho. Departamento de Química de la Universidad Técnica Partícula de Loja

1.3.2 Sinónimos

Elaphrium graveolens Kunth, *Spodias edmonstonei* Hook. F, *Amyris caranifera* Willd ex Engl, *Bursera malacophylla* B.L. Rob, *Bursera penicillata* (DC.) Engl, *Elaphrium graveolens* Kunth, *Elaphrium pubescens* Schltdl.

1.3.3 Descripción botánica

Es un árbol caducifolio que llega hasta 15 m de altura y diámetro a la altura del pecho (DAP) de 30-50 cm, posee corteza lisa de color morado grisáceo, fuste cilíndrico y copa globosa. La corteza y las ramas exudan una resina amarilla con olor alcanforado o incienso, sus hojas alternas con borde crenado y flores en panícula. 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 (bivaldo), estriado y color verde claro por dentro. El periodo de fructificación está comprendido durante los meses de abril y mayo.^[12]

1.3.4 Hábitat

La especie *B. graveolens* (Palo Santo) se encuentra en bosques de clima tropical seco, distribuido desde México a Perú. En Ecuador se encuentra en altitudes de hasta 1500 msnm, en lugares como el archipiélago de Galápagos, Guayas, Imbabura, Manabí y en la provincia de Loja.^[13]

1.3.5 Aceite esencial de *Bursera graveolens*

El aceite esencial de *B. graveolens* se extrae generalmente de las hojas, tallos y frutos.

1.3.6 Parte utilizada

Habitualmente se ha empleado el tronco como materia prima en el proceso de extracción del aceite esencial, sin embargo el Departamento de Química (UTPL) ha tomado la iniciativa de utilizar el fruto como materia prima para la extracción el aceite esencial obteniendo resultados favorables.^[14]

1.3.7 Características y usos **Composición Química**

En la evaluación cualitativa realizada a las ramas de *B. graveolens*, se encontraron los metabolitos pertenecientes a los siguientes grupos químicos: en el extracto etéreo, aceites y grasas, triterpenos, y esteroides; en extracto alcohólico: resinas, sustancias reductoras, fenoles y taninos; en el extracto acuoso la presencia de fenoles y taninos, flavonoides, sustancias reductoras, saponinas y aminoácidos.^[15] Los componentes 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).^[13] Los constituyentes mayoritarios encontrados en el aceite de hojas son limoneno (48.3%), óxido de cariofileno (13.6%) y trans-cariofileno (8.1%). El aceite de los tallos se constituyó principalmente por limoneno (42.1%), mirceno (19.8%) y mentofurano (14.7%). Los principales compuestos hallados en el aceite esencial de los frutos de Palo Santo son α -tujeno (0.26%), α - pineno (0.99%), α -felandreno (1.51%), limoneno (52.82%), sabineno (0.29%), p-cimeno (35.55%), mentofurano (5.32%) y germacreno-D.^[16]

Usos

B. graveolens, ha sido utilizado desde épocas remotas como remedio para curar dolores estomacales, sudoríficos y como ungüento para reumatismo. Además se le atribuye las bondades etnomédicas para las fatigas y latidos acelerados del corazón, para mareos jaquecas con solo frotarse unas gotas de este aceite en las zonas afectadas. La madera seca es utilizada como sahumerio y para espantar mosquitos.^[17]

1.4 Componentes principales de los productos para limpieza y desinfección.

Desengrasantes

Productos que disuelven restos de grasas y aceites. Contienen alcohol o éter.^[18]

Vehículo

Sustancia que se emplean en las formulaciones farmacéuticas para diluir el complejo total hasta un volumen o peso determinado.^[18]

Surfactantes

Los surfactantes aniónicos (sulfonatos, estersulfatos, jabones) y no iónicos (alcoholes o fenoles etoxilados) actúan como agentes de mojabilidad del sustrato, rebajan la tensión interfacial, se adsorben y cambian el potencial superficial, emulsionan el sucio líquido, y dispersan las partículas sólidas. En algunas aplicaciones especiales se usan las propiedades bactericidas de los surfactantes catiónicos, tales como en formulaciones desinfectantes, en los cuales están a menudo asociados con surfactantes no iónicos.^[19]

Agentes secuestrantes

Estos agentes tienen como propósito mejorar la acción limpiadora del surfactante mediante varios efectos. Su principal acción es secuestrar a los cationes divalentes del agua dura (calcio, magnesio) para evitar la interacción de estos iones con los surfactantes.

La eliminación se hace en forma de solubilización (quelato), precipitación, o intercambio iónico. Otra de las acciones de los mejoradores es mantener el pH de la solución a un valor alcalino, neutralizar los ácidos grasos libres y formar jabones insitu en la interface.^[19]

1.4.1 Principales características en un desinfectante

Las características principales de un desinfectante:^[4]

- ✓ Buena concentración de ingredientes activos lo cual garantizará su efectividad y poder residual.
- ✓ Aroma agradable
- ✓ No contiene sustancias tóxicas para el organismo humano o para animales menores, esto quiere decir, que al aplicarse el producto éste no contamine.
- ✓ Es soluble en agua.
- ✓ Amplio espectro de actividad.
- ✓ Es estable: tiempo prolongado de vida útil.
- ✓ No reacciona con materia orgánica ni se activa en presencia de ella.
- ✓ Es de acción rápida.
- ✓ Capacidad de penetración.
- ✓ Es compatible con todos los materiales.
- ✓ Disponibilidad y buena relación costo-riesgo-beneficio.
- ✓ No afecta al medio ambiente.

Parámetros organolépticos

La observación proporciona una primera impresión de la calidad del producto. Debe ser homogéneo de olor y color agradable o como mínimo aceptable

Parámetros microbiológicos

El método se basa fundamentalmente en incorporar al medio de cultivo el desinfectante o el microorganismo en concentración conocida para que luego de solidificado el medio se adicione la contraparte y observar inhibición de crecimiento según la técnica utilizada.^[15]

Según la USP de acuerdo a la actividad de agua del producto conviene realizar pruebas microbiológicas tales como: Recuento Total de Microorganismos Aerobios (RTMA), Recuento Total Combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras (RTCHL); y como alternativa descartar la presencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

1.5 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.^[20]

Los estudios de estabilidad por su importancia son considerados actualmente requisito para el monitoreo de las reacciones de degradación para así predecir el periodo de validez bajo condiciones normales de almacenamiento. Los datos que de ellos se obtienen, junto

con los derivados de los estudios de estabilidad a tiempo real pueden emplearse para evaluar los efectos químicos bajo condiciones no aceleradas, así como el impacto de incursiones cortas fuera de las condiciones declaradas, como pueden ocurrir durante la transportación. De esta forma se garantiza la integridad de la formulación durante el lapso de tiempo donde ésta cumpla los fines para los cuales fue creada.^[21]

1.5.1 Tipos de estudios de Estabilidad

Los estudios acelerados, se basan en el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción. Consiste en sostener la muestra a condiciones extremas de almacenamiento, temperatura superior a la del ambiente, normalmente desde 30 °C, 40 °C, 50 °C incluso hasta 60 °C y a menudo en distintas condiciones de humedad relativa y en envases distintos, con esto se busca acelerar el proceso de degradación del o los principios activos con la finalidad de predecir la velocidad de degradación mediante el método de Arrhenius.^[22]

1.5.2 Estudios a tiempo real

Los estudios a tiempo real, consisten en someter a la muestra a condiciones normales de humedad relativa y temperatura, determinando de forma periódica la degradación del principio activo.^[23]

En la Tabla 1 se puede observar los requisitos de humedad y temperatura conforme a la zona climática.

Tabla 1. Zonas climáticas en el Mundo.

ZONAS	T °C	HR %	CLIMA	PAISES
1	21	45	Templado	Norte de Europa
2	25	60	Mediterráneo y subtropical	Sur de Europa, EE UU, Japón
3	30	35	Caliente y seco	Sahara
4	30	70	Caliente y húmedo	África Central ECUADOR

Fuente: International conference Harmonization ^[35]

MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención del aceite esencial.

2.1.1 Área de recolección.

En la Figura 2 se observa el área de recolección de los frutos de *B. graveolens*, esta, se encuentra al suroeste de la provincia de Loja, cantón Zapotillo, parroquia Limones comunidad de Malvas.

La superficie total aproximada es de 300 ha y se encuentra ubicada entre las coordenadas UTM: 9522447 N Y 577089 E.

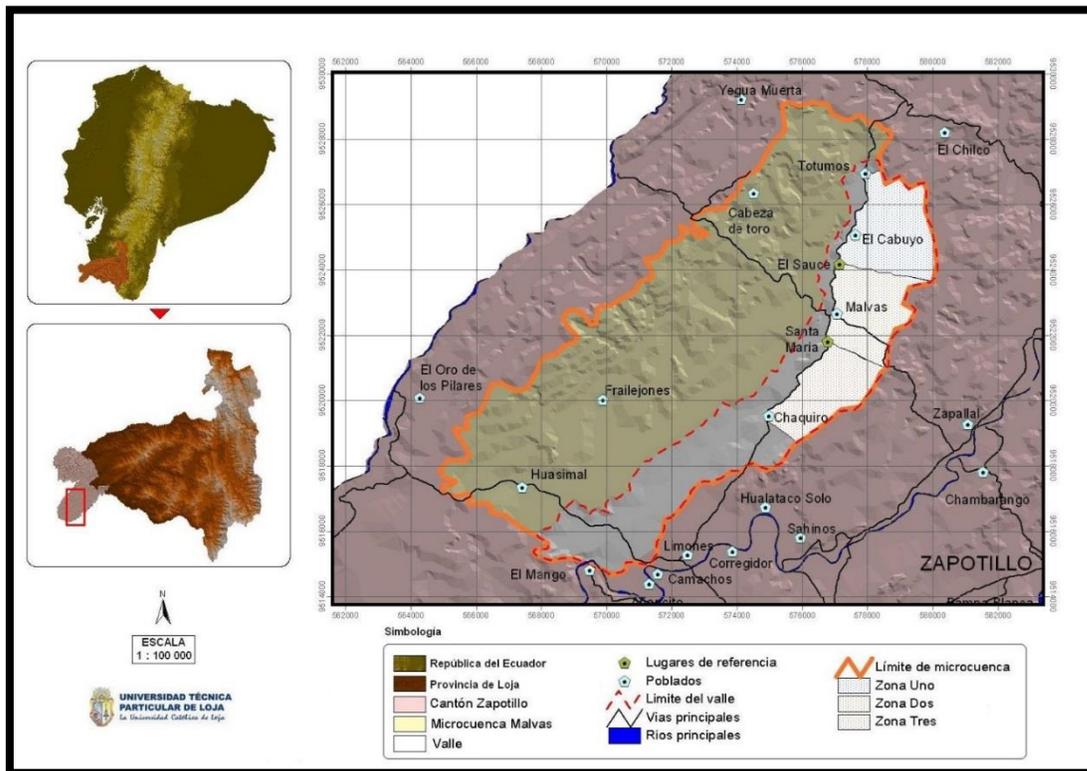


Figura 2: Mapa del área de recolección de *B. graveolens*.

Fuente: Cortesía del Ph.D. Vladimir Morocho. Departamento de Química de la Universidad Técnica Partícula de Loja

2.1.2 Extracción del aceite esencial

El aceite esencial de *B. graveolens* se obtiene a partir de 10 000 g de frutos secos. Mediante arrastre con vapor de agua, utilizando un equipo de destilación tipo Clevenger durante 2 horas. En la parte inferior del cilindro se encuentra una placa perforada donde se colocan 1000 g de frutos, bajo la placa se coloca 1.5 L de agua destilada. El vapor formado pasa por el material vegetal y va arrastrando los componentes volátiles q forman parte del aceite esencial de la planta, el vapor es condensado y la mezcla de agua y aceite se recolecta en

un florentino, donde se separan a causa de la diferencia de densidades. La destilación por arrastre con vapor de agua toma alrededor de 2 horas. Posteriormente el aceite es sometido a control de calidad que corresponde con los estudios de reformulación del principio activo.

2.2 Estudios de preformulación.

2.2.1 Valoración del Principio activo.

La identificación de los compuestos que conforman el aceite esencial de *B. graveolens* se realizó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). El equipo empleado para la realización el análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masa Agilent serie 5973 Inert. Dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.0100 SP1, el equipo cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. La columna capilar con la cual se correrá la muestra será una DB-5MS (5% Fenilmetilpolisiloxano) de 30 m de longitud, diámetro (DI) 0.25 mm, película 0.25 μm . Para inyectar la muestra en el equipo se ha de disolver 10 μl de aceite esencial con 990 μl de diclorometano (Cl_2CH_2) grado HPLC en un vial para cromatografía de 1.5mL.



Figura 3: Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N
Elaboración: Bravo, O. (2014)

Adicionalmente se realizará la inyección de la muestra de hidrocarburos (C_{10} a C_{25}), conocido comercialmente como TPH-6RPM de CHEM SERVICE bajo los mismos parámetros operacionales de inyección del aceite, estos se utilizarán posteriormente para realizar el cálculo de los índices de Kóvats. Para la identificación de los componentes, se determinan los índices de Kóvats de los picos detectados en la columna DB-5MS, se analizara el espectro de masas de los mismos y se los compara el espectro del pico con el

los propuestos en la librería WILEY. Por último se realiza la comparación de los índices de Kóvats obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura.

En la figura 4 se muestran las condiciones operacionales bajo las cuales la muestra es inyectada al equipo.

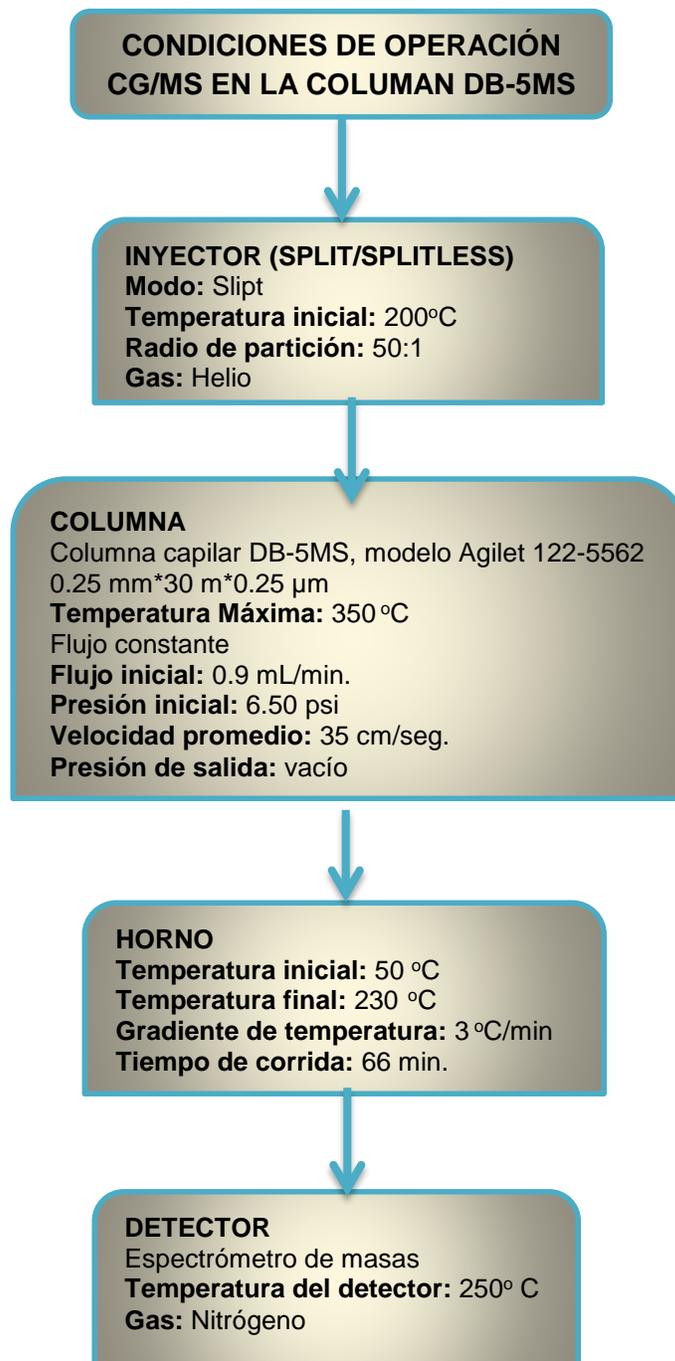


Figura 4. Esquema del análisis cromatográfico del aceite esencia
Fuente: Bravo, O. (2014)

2.2.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas.

2.2.2.1 Densidad Relativa.

La densidad relativa se obtuvo en función de la relación entre la masa de un volumen de una sustancia y la relación masa-volumen del agua a una misma temperatura. Para esto se pesó un picnómetro de 2mL de capacidad, vacío y seco registrándose este peso como ***m***, luego se llena con agua destilada, se pesa y se registra este peso como ***m1***, se seca el picnómetro, y se llena con la porción de aceite a ensayar, se pesa y este peso se registra como ***m2***.

La densidad relativa se calculó a través de su fórmula:

$$\rho = \frac{(m_2 - m)}{(m_1 - m)}$$

2.2.2.2 Índice de refracción.

Se utiliza un refractómetro ABBE como el observado en la figura 5, según la norma AFNOR NF T 75-112 inicialmente se calibra el refractómetro midiendo el índice de refracción del agua, e cuando se ha ajustado se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma inferior, cerramos el termo prisma y realizamos la lectura.



Figura 5. Refractómetro ABBE
Fuente: Laboratorio del Departamento de Química

2.2.2.3 Solubilidad

Insoluble en propilenglicol y alcohol al 70%, soluble en glicerina. ^[25]

La solubilidad del aceite esencial se probó con diferentes disolventes tales como: Propilenglicol, glicerina y alcohol al 70%.

De acuerdo a la USP – NF32, las solubilidades se indica mediante términos descriptivos en la Tabla 2:

Tabla 2. Solubilidad en términos descriptivos.

Término Descriptivo	Partes Disolvente Requeridas para 1 Parte de Sólido
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: Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional. ²²

2.2.3 Estudio de compatibilidad aceite esencial – excipientes.

El estudio se basa en mezclar el principio activo con los excipientes más comunes 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 la formulación con las máximas garantías posibles.

2.2.3.1 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 emplean 5 factores a dos niveles diferentes señalados por los signos (+) y (-) donde el número de experimentos fue 8. En este caso los factores son excipientes y dos de los factores son variables dummy (grados de libertad) y no contienen excipientes a ninguno de los dos niveles.

A. Descripción

Composición de las mezclas.

En general la composición de las mezclas fue:

Principio activo.....5%

Excipientes.....95%

B. Elaboración y Acondicionamiento de las muestras

Posteriormente, se procedió a preparar 50mL de las mezclas en un vaso de precipitación, combinando porciones sucesivas de los excipientes con el aceite esencial.

Una vez preparadas se repartieron en viales de 10mL de capacidad, y se conservaron a tres temperaturas distintas: ambiente, 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	Mezclas	Cantidad/vial	Condiciones
2	todas	2g	Temp. amb
2	todas	2g	30°C
2	todas	3g	40°C

Fuente: Amela, J., Valero, E. (2001).^[38]

C. Análisis de las mezclas

Una vez transcurridas 8 semanas se analizó mediante GC/MS, empleado la misma técnica con la que se analizó el aceite esencial para el proceso de preformulación.

Tratamiento de las muestras

Las mezclas estudiadas contienen una fase acuosa y una fase oleosa, por ello los compuestos de interés se extraen mediante un disolvente orgánico apolar (hexano). En ese sentido, previo al análisis cromatográfico, las mezclas se trataron basándose en una extracción Líquido – Líquido

D. Análisis estadístico

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

2.3 Estudios de Formulación

2.3.1 Establecimiento de la fórmula

Con los datos obtenidos a partir del diseño de Plackett y Burman se escogieron los excipientes más adecuados que fueron incluidos en la fórmula del desinfectante de palo santo (*B. graveolens*), dichos componentes se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Formulación base para el desinfectante

Función	Componente
Principio activo	Aceite esencial
Tensioactivo	Lauril sulfato de sodio
Quelante	EDTA
Solvente	Alcohol al 96%
Fragancia	Fragancia de fresa
Conservante	Metilparabeno
Conservante	Propilparabeno
Antioxidante	Ácido ascórbico
Colorante	Rojo#40
	Agua

Elaboración: Bravo, O. (2014)

2.3.2 Proceso de fabricación

En la figura 6 se resume el proceso de fabricación del desinfectante.

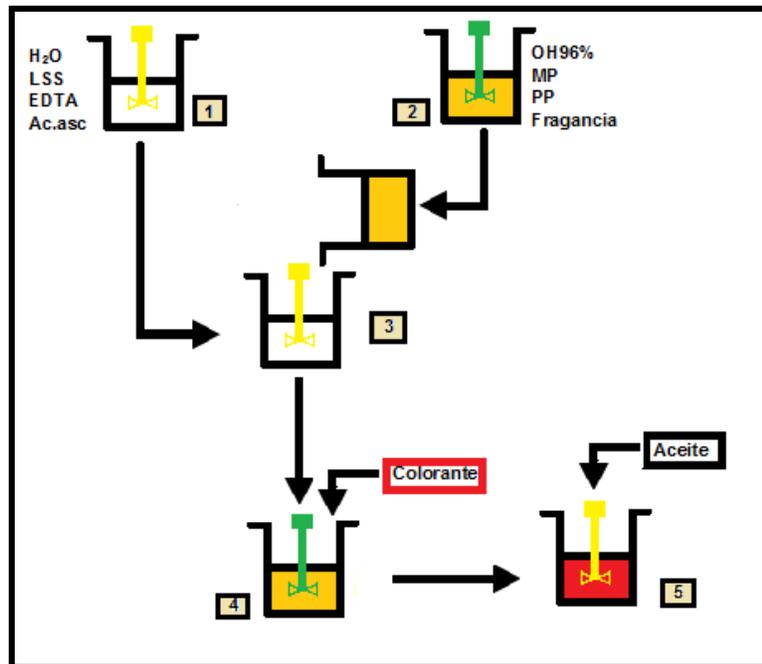


Figura 6. Diagrama de fabricación del desinfectante

Elaboración: Bravo, O. (2014)

Procedimiento

1. En el agua disolver mediante agitación constante el lauril sulfato de sodio, el EDTA y el ácido ascórbico.
2. En alcohol disolver los conservantes y la fragancia.
3. Integrar el paso 2 en el 1 sin detener la agitación.
4. A la mezcla previa agregar el colorante.
5. Por último sin detener la agitación agregar el aceite. Mantener agitando por 2 minutos.

2.4 Estudio de estabilidad

El producto fue sometido a estudios de estabilidad acelerada durante 6 meses a temperaturas diferentes a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$., $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a temperatura ambiente con una humedad relativa del $75\% \pm 5\%$.

Se preparó un lote piloto de 9 unidades (50mL/unidad), las muestras fueron tomadas al azar para evaluar las propiedades organolépticas, físico – químicas y microbiológicas a la temperatura y humedad mencionadas en la Tabla 5.

Para el tratamiento de los resultados obtenidos del análisis físico-químico se emplea el programa XLSTAT que es un complemento para el análisis estadístico en Excel.

Tabla 5. Parámetros empleados en el estudio de estabilidad

PROPIEDADES	PARÁMETRO
Organolépticas	Color, Olor, Aspecto
Físico-Químicas	pH, Densidad, Concentración del aceite
Microbiológicas	Aerobios mesófilos Hongos y Levaduras

Elaboración: Bravo, O. (2014)

2.4.1 Predicción de la estabilidad.

2.4.1.1 Método de Arrhenius.

El método se basa en el análisis de la influencia de la temperatura sobre la velocidad de degradación de los compuestos.

Se siguen las siguientes etapas:

Primero se determina en contenido del principio activo mediante GC/MS en las tres temperaturas a un determinado intervalo de tiempo. (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses)

Luego se determina el orden de reacción, y se elabora una gráfica con las pendientes en función del tiempo y la temperatura de estudio.

Finalmente se establece la estabilidad química de un producto la cual se expresa como el tiempo de vida útil T90% a la temperatura de 30 °C de la ZONA IV b que corresponde a la ubicación del Ecuador según Normas ICH.

2.5 Estudio de actividad antimicrobiana y antifúngica.

2.5.1 Actividad antimicrobiana del aceite.

Se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. graveolens* en *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Se utilizó microplacas esterilizadas de 96 pocillos, se sometió el aceite esencial con cada uno de los microorganismos de prueba incubados durante 24h a 37°C, y ajustando la población bacteriana a 2×10^6 ufc/mL con Caldo Muller-Hinton que fueron colocados en cada pocillo 100 μ L al final de la prueba excepto en el control de esterilidad, siendo ajustada la cantidad de 5×10^5 ufc/mL en un volumen total de 200 μ L. Se procedió a colocar 180 μ L de caldo Muller-Hinton al primer pocillo y 100 μ L a todos los demás pocillos restantes, luego se añadió 20 μ L del compuesto a probar (aceite) diluido en DMSO en el primer pocillo. Se realizaron diluciones seriadas, tomando 100 μ L del primer pocillo y diluyendo con 100 μ L del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta el último pocillo donde está la concentración mínima a la que se quiere llegar, de este último se toman 100 μ L y se desecha, quedando así 100 μ L de medio + aceite en cada pocillo. Realizando el mismo procedimiento anterior, se empleó tres controles: Esterilidad, DMSO y de Antibiótico (Gentamicina 100mg/mL) es decir: 180 μ L de Caldo+ 20 μ L de aceite; 180 μ L de caldo+ 20 μ L de DMSO para control de crecimiento y 180 μ L de caldo+ 20 μ L Gentamicina como control positivo. Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron por 24h a 37°C, la prueba se realizó por triplicado. Este método se aplicó también para probar la actividad en el producto terminado.^[24]

2.5.2 Actividad antifúngica del aceite.

La actividad antifúngica se usó el mismo medio usado con bacterias (20µL del aceite esencial en 980 de DMSO); se siguió el mismo procedimiento citado previamente variando algunos parámetros: la concentración final del inóculo 5×10^4 esporas/mL, se realizó diluciones seriadas hasta obtener 8 diluciones consecutivas y el control positivo que se emplea una solución al 1% de Itraconazol. Se incubó las placas a 28°C de 24-96h. La prueba con *Trichophyton rubrum* se realizó por triplicado.

2.5.3 Actividad antifúngica en producto terminado

Se siguió el mismo procedimiento citado previamente Para medir la actividad biológica se inóculo con dos hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagraophytes* a una concentración final de 1×10^5 esporas/mL. Se diluyo 20µL del desinfectante en 180µL DMSO. Los dermatofitos se incubaron a 30°C. Como control positivo se utilizó Itraconazol con un valor de 0,48 µg/mL y DMSO. La actividad también se estudió en la formula libre de principio activo en la misma disolución antes mencionada. La actividad también se estudió con 10 µL de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Identificación de componentes del aceite esencial mediante GC/MS

Para la identificación de los componentes, se determinan los índices de Kóvats de los picos detectados en la columna DB-5MS, se analizaron en el espectro de masas, Figura 7, y se los compara el espectro del pico con el los propuestos en la librería WILEY. Por último se realiza la comparación de los índices de Kóvats obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura.

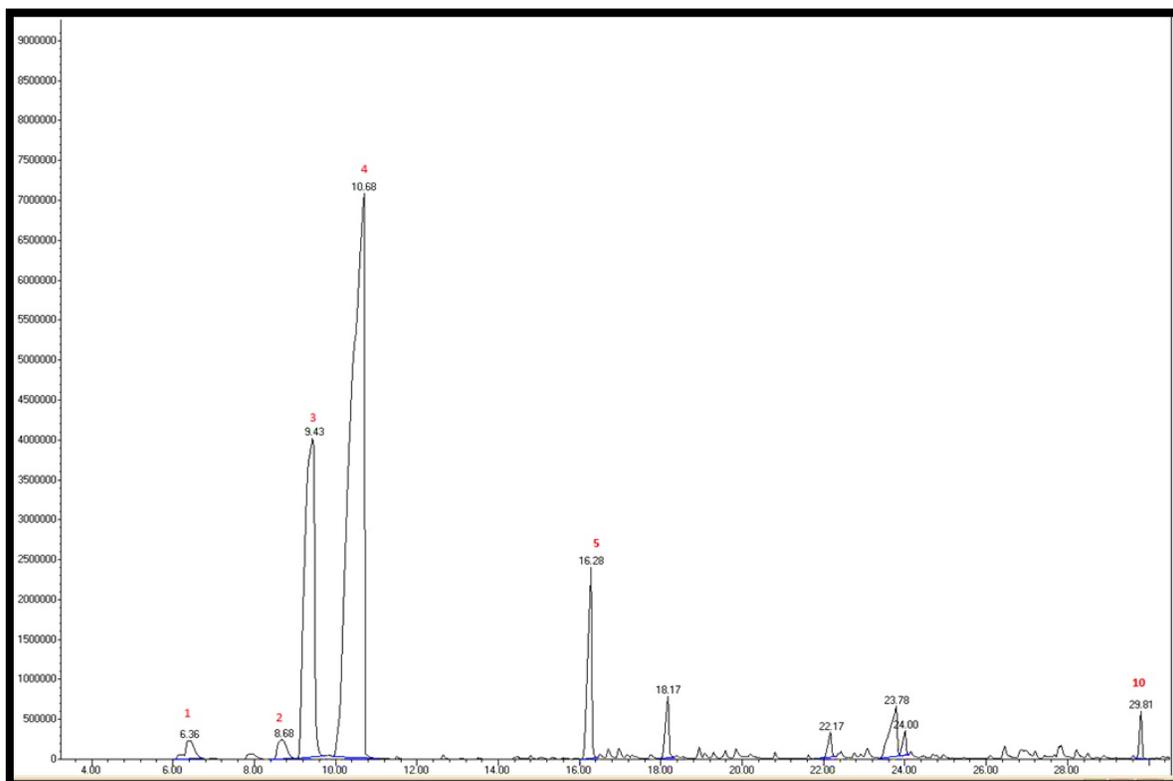


Figura 7. Cromatograma del aceite esencial de palo santo (*Bursera garaveolens*).
Fuente: Bravo, O. (2014)

Tabla 6. Compuestos del aceite esencial de palo santo (*Bursera garaveolens*).

Picos	Componentes	IK	% Cantidad relativa
1	α pineno	934	1,39
2	β mirceno	991	1,38
3	α felandreno	1009	24,66
4	limoneno	1038	59,84
5	mentofurano	1162	5,95
10	germacreno-D	1472	0,91
Total %			94,13

Elaboración: Bravo, O. (2014)

En la Tabla 6 se detalla los principales compuestos identificados en el aceite esencial, los mismo que conformaron un 94,13% del total de la composición siendo el limoneno con un 59.84 % el compuesto mayoritario presente en el aceite. El orden de los compuestos químicos del aceite esencial descritos en la Tabla 6 depende de la elución de la columna DB-5MS.

3.2 Control de calidad del aceite esencial de palo santo (*Bursera. graveolens*)

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de preformulación fueron los siguientes:

- **Apariencia:** Líquido viscoso
- **Color Subjetivo** Incoloro translúcido
- **Olor** Cítrico, especiado y amaderado
- **Densidad (g/cm³):** 0,8544 ± 0.0099
- **Índice de Refracción (20° C):** 1,4768 nD±0.0001

En lo que respecta a la densidad la mayoría de los aceites esenciales al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos tienen una densidad menor que la del agua (densidad menor que 1g/cm³), situación que se aplica al aceite analizado.^[39]

De acuerdo con la investigación realizada por Salas M., y Zaragocín R. (2006) estos valores concuerdan con los rangos de referencia establecidos para el aceite de Palo Santo. Por lo tanto el aceite esencial de Palo Santo (*Bursera. graveolens*) posee una óptima calidad, cumpliendo con las especificaciones establecidas por el Departamento de Química.

3.3 Compatibilidad excipientes - aceite esencial: Diseño factorial Plackett y Burman.

La composición general de las mezclas es:

Principio activo.....	5%
Excipientes.....	95%

En el presente estudio los factores del diseño se describen en la Tabla 7.

Tabla.7 Factores o excipientes usados para el diseño de Plackett y Burman

Factor	Componente	Nivel	Concentración % (p/v)
A	Lauril sulfato de sodio	+	15
	Lauril sulfato de sodio	-	12
B	EDTA	+	0,1
	EDTA	-	0,05
C	Alcohol Etílico96%	+	25
	Alcohol Etílico96%	-	20
D	Fragancia de fresa	+	2
	Fragancia de fresa	-	1
E	Colorante	+	0,001
	Colorante	-	0

Elaboración: Bravo, O. (2014)

En función del nivel de los factores, se estructura la matriz de experimentación que se muestra en la Tabla 8 con la respectiva potencia para cada mezcla.

A partir de los datos de la potencia obtenida para cada formulación se calculó su efecto promedio.

Así el efecto promedio de A (E_A) se calculó sumando y restando las respuestas obtenidas para las diferentes mezclas.

$$E_A = \frac{(\text{Respuestas } +) - (\text{Respuestas } -)}{4}$$

Tabla 8.Matriz de ensayos. Determinación de la respuesta mediante GC/MS

Nº de Mezclas	FACTORES (EXCIPIENTES)					VARIABLES DUMMIES		Potencia o %ID P.A
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	-	-	+	-	+	+	90
2	+	+	-	-	+	-	+	90
3	+	+	+	-	-	+	-	75
4	-	+	+	+	-	-	+	60
5	+	-	+	+	+	-	-	50
6	-	+	-	+	+	+	-	100
7	-	-	+	-	+	+	+	85
8	-	-	-	-	-	-	-	95
SUMA (+)	305	325	270	300	325	350	265	
SUMA (-)	340	320	375	345	320	295	270	
EFFECTO PROMEDIO	-8,75	1,250	-26,250	-11,250	1,250	13,750	-1,250	
					X²	189,063	1,563	

Elaboración: Bravo, O. (2014)

Para averiguar la significancia de los efectos, se calculó la varianza experimental (S_{exp}); esta se considera que es la varianza de los efectos de los factores dummy

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

$$S_{exp}^2 = \frac{190.626}{2}$$

$$S_{exp}^2 = 95.313$$

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

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

$$S = 9.762$$

Para cada efecto se calculó su t experimental " t_E ", así:

$$t_E = \frac{E_i}{S}$$

Los resultados donde se relaciona la potencia del principio activo para cada mezcla se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9. Matriz "Plackett y Burman" (relación de la potencia del principio activo para cada mezcla)

MEZCLA	RESPUESTA	FACTOR	EFECTO	X2	"t"	SIGNIFICANCIA			
						95 p= 0,05	97,5 p= 0,025	99 p= 0,01	99,5 p= 0,005
1	90	1				2,92	4,303	6,965	9,925
2	90	A	8,75		0,896	NS	NS	NS	NS
3	75	B	1,25		0,128	NS	NS	NS	NS
4	60	C	-26,25		-2,689	NS	NS	NS	NS
5	50	D	-11,25		-1,152	NS	NS	NS	NS
6	100	E	1,25		0,128	NS	NS	NS	NS
7	85	F	13,75	189,063	1,408	NS	NS	NS	NS
8	95	G	-1,25	1,563	-0,128	NS	NS	NS	NS

NS: No significativo

Elaboración: Bravo, O. (2014)

Al comparar los valores de “t” con la Tabla de Student que se observa en la Tabla 10 para 2 grados de libertad (dummies) ninguno de los factores estudiados muestra un resultado mayor al t tabulado.

Los grados de libertad (dummies) se obtienen de la siguiente forma:

$$G. L. = M - N - 1$$

M= Número de ensayos

N= Número de variables sin contar las dummies

Tabla 10. Tabla de Student

p	t (G.L.=2)
95%	2,92
97,5%	4,303
99%	6,965
99,5%	9,925

Elaboración: Bravo, O. (2014)

Al no presentar un resultado significativo en el cálculo del t experimental, es decir que no se observa incompatibilidad entre excipientes y principio activo, la fórmula apropiada se escogió examinando el efecto promedio causado por cada excipiente y la potencia dada por la mezcla. Esto permitió determinar que el lauril sulfato de sodio, el alcohol etílico y la fragancia eran los compuesto que más significativamente afectan la formulación puesto que los efectos poco importantes tienden a ser más pequeños y en torno a cero, por lo que se seleccionó la mezcla 6 puesto que presenta la menor proporción de lauril sulfato y alcohol etílico y mejor potencia que el resto de las mezclas. Se decidió disminuir la concentración de los tres excipientes que afectan la formulación por lo que la formula final se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Fórmula escogida para la elaboración del desinfectante

FORMULA 6	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	10
EDTA	0,1
OH 96	10
Fragancia de Fresa	0,5
Colorante	0,001
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s.p

Elaboración: Bravo, O. (2014)

3.4 Elaboración del desinfectante.

El desinfectante ha sido elaborado en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Departamento de Química y presenta las características que se detallan en las Tablas 12 y 13.

3.4.1 Fórmula de composición.

Cada 100mL contiene:
Aceite esencial de palo santo (<i>Bursera graveolens</i>).....5%
Excipientes.....csp

3.5 Pruebas de estabilidad del desinfectante

3.5.1 Análisis organoléptico

Como se puede apreciar en la Tabla 12 el desinfectante presenta un aspecto líquido, opaco, de color rojo y un olor fresa en el tiempo cero, registrándose una variación en el color y olor desde el primer mes de análisis mientras que el aspecto opaco se mantuvo a lo largo de los seis meses. Probablemente la variación en el aroma se deba a la evaporación de la fragancia, mientras que la degradación del colorante (rojo#40, grupo funcional azoico R-N=N-R) podría deberse a factores tales como los cambios en el pH, o la exposición a los fotones de la luz visible y el oxígeno, que pueden romper el enlace azoico (N=N), generándose la decoloración. [26] [27]

Tabla12. Resultados del análisis organoléptico

Análisis	Condiciones	Meses						
		0	1	2	3	4	5	6
Aspecto	Ambiente	LO	LO	LO	LO	LO	LO	LO
	30°C	LO	LO	LO	LO	LO	LO	LO
	40 °C	LO	LO	LO	LO	LO	LO	LO
Color	Ambiente	Rojo	Am-c	Am-c	Am-c	Am-c	Am-c	Am-c
	30°C	Rojo	Nara	Nara	Nara	Nara	Nara	Nara
	40 °C	Rojo	Nara	Nara	Nara	Nara	Nara	Nara
Olor	Ambiente	Fresa	Fresa	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct
	30°C	Fresa	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct
	40 °C	Fresa	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct	Fre-ct

LO= Líquido opaco Am-c= amarillo claro Nara = Naranja Fresa-ct = fresa-cítrico
 Elaboración: Bravo, O. (2014)

3.5.2 Análisis Físico químico.

En la Tabla 13 se indican los resultados de los análisis físico-químicos del desinfectante a 30 °C y 40 °C lo mismo que han sido evaluados durante 6 meses.

Tabla 13. Resultados del análisis físico-químico

Análisis	Condiciones	Meses						
		0	1	2	3	4	5	6
Densidad	Amb	0,94	0,99	0,95	0,98	0,96	0,99	0,98
	30°C	0,94	0,98	0,99	0,92	0,95	0,99	0,98
	40 °C	0,94	0,98	0,95	0,98	0,95	0,98	0,98
pH	Amb	7.5	6.34	6.23	6.20	5.86	5.53	5.76
	30°C	7.5	6.22	6.11	5.97	5.77	5.66	5.63
	40 °C	7.5	6.12	6.00	5.83	5.59	5.47	5.27
%Concentración del aceite esencial	Amb	100	80	85	85	65	50	-
	30°C	100	100	80	70	60	50	-
	40 °C	100	-	-	-	-	-	-

Elaboración: Bravo, O. (2014)

En los resultados expresados en la Tabla 13 se puede observar que la densidad del producto se mantuvo entre 0.94 – 0.98 g/ml a lo largo de los seis meses, los valores de pH disminuyen desde 7 en el tiempo cero hasta 5 en el sexto mes así también los porcentajes de concentración del aceite esencial en relación al tiempo, muestran una considerable disminución desde el primer mes. Esta degradación pudo ocasionarse debido a una interacción con los excipientes y/o a componentes del envase resultando en la disminución del porcentaje del ingrediente activo así como cambios en el pH y la coloración en el producto terminado^[28]

Los parámetros densidad y pH se analizaron estadísticamente mediante el programa XLSTAT (Anova) con el objetivo de determinar diferencias significativas entre los parámetros mencionados y el tiempo, obteniendo los resultados que se observan en las tablas 14 y 15:

Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre pH y tiempo.

Contraste	Diferencia	F calculada	Valor crítico	Significancia
AMB vs 40	0,234	0,648	2,552	*
AMB vs 30	0,080	0,221	2,552	*
30 vs 40	0,154	0,426	2,552	*

(*)No significativa (**) Significante

Elaboración: Bravo, O. (2014)

Tabla 15. Prueba de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre densidad vs tiempo

Contraste	Diferencia	F calculada	Valor crítico	Significancia
AMB vs 30	0,006	0,480	2,552	*
AMB vs 40	0,004	0,360	2,552	*
40 vs 30	0,001	0,120	2,552	*

(*)No significativa (**) Significante

Elaboración: Bravo, O. (2014)

Los resultados en las Tablas 14 y 15 nos indican que no existe una diferencia significativa (con intervalo de confianza del 95%) entre los parámetros evaluados (pH y densidad) a las distintas temperatura durante los 6 meses de estudio, puesto que confrontando el valor de la diferencia estandarizada (F calculada) con el valor crítico, al no superar el valor F al valor crítico, nos indica que la variación de los niveles de los factores no tiene un efecto significativo. Esto significaría que la temperatura no hizo una diferencia en el mantenimiento de la densidad o en el cambio del pH.

3.5.3 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de las muestras, se realizó en el laboratorio de Bioactividad del Departamento de Química de la UTPL, los resultados que se muestran en la Tabla 16 nos indican la ausencia completa del crecimiento de microorganismos contaminantes. En la Figura 8 se puede visualizar la ausencia de crecimiento en los medios de estudio.

Tabla 16. Resultado de análisis microbiológico.

Análisis	Especificaciones USP	Condiciones	Meses						
			0	1	2	3	4	5	6
Bacterias aerobias mesófilos/mL	Máximo 100ufc/g	Ambiente	-	-	-	-	-	-	-
		30°C	-	-	-	-	-	-	-
		40 °C	-	-	-	-	-	-	-
Hongos, mohos y levaduras/mL	Máximo 100ufc/g	Ambiente	-	-	-	-	-	-	-
		30°C	-	-	-	-	-	-	-
		40 °C	-	-	-	-	-	-	-

(+)= presencia (-)= ausencia

Elaboración: Bravo, O. (2014)

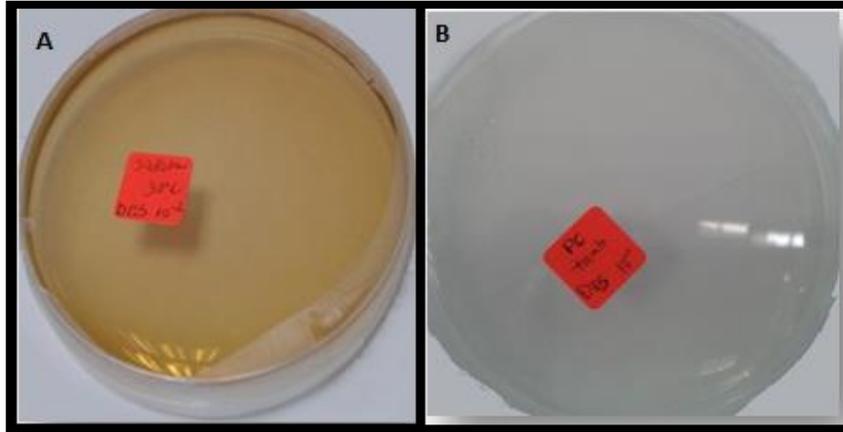


Figura 8. Resultados del análisis microbiológico
A= Agar Sabouraud B= Agar Plate Count
Fuente: Bravo, O. (2014)

3.5.4 Determinación de la vida útil

En la presente investigación la predicción de la vida útil no pudo determinarse dado que el método de Arrhenius presenta varias limitaciones como un tiempo de vida útil muy estricto, es decir que la concentración del principio activo a largo de los meses de análisis no debe ser inferior al 90% o lo que indique las especificación para un determinado producto. [29]

La concentración del principio activo se encuentra por debajo del rango establecido para este método además de claras inconsistencias en el mantenimiento de la concentración a lo largo del tiempo.

3.6 Estudio de actividad antibacteriana y antifúngica del aceite.

En el ensayo de actividad antibacteriana en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* el aceite fue inactivo frente a las bacterias en estudio, es decir no inhibió a ninguno de los microorganismos en las concentraciones máximas evaluadas. En el ensayo de actividad antifúngica del aceite en *Trichophyton rubrum* el aceite inhibió el crecimiento del microorganismo a una concentración de 1000ppm.

Como se observa en el Anexo 2 Se realizó el ensayo actividad antibacteriana y anti fúngica en el producto terminado, el cual mostro actividad tanto antifúngica como antibacteriana incluso en la muestra de excipientes libre de principio activo lo que dicha actividad está dada por uno de los excipientes de la formulación.

Es probable que la actividad antimicrobiana observada en el producto terminado y en los excipientes se deba a la presencia del surfactante aniónico, lauril sulfato de sodio, en el

cual se ha reportado actividad antibacteriana contra *E. coli DH5α*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus* y aislados clínicos multiresistente de *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei* incluyendo *Vibrio cholerae*.^[30] También se ha reportado actividad antifúngica del lauril sulfato de sodio por debajo de 0,008%, contra hongos del género *Curvularia*.^[31]

Hidalgo *et al.* 2012 ^[12]., nos indica que el aceite esencial de la hojas de *B. graveolens* posee actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* a concentraciones de 7.45 mg/mL 9.1 mg/mL y 4.97 mg/mL respectivamente. Estas concentraciones son más elevadas que las probadas en el ensayo de actividad biológica, por lo que la concentración efectiva del aceite esencial puede ser superior a la usada durante la investigación.

Dado que la mayor parte de la actividad antimicrobiana en los aceites esenciales parece estar dada por los terpenoides oxigenados, se podría probar el aceite esencial de *B. graveolens* en combinación con otros aceites para a incrementar sus actividades biológicas. Las interacciones entre estos componentes pueden dar lugar a un efecto antagónico, aditivo o un efecto sinérgico, tal como el descritos por Death, S & Death J^[34] en su patente US6346281 B1, para una composición con un 2- 7 % de volumen de una mezcla de aceites esenciales (tomillo, limón, clavo y eucalipto) la cual se ensayó con éxito contra *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Salmonella*, *Enterococcus faecium*, con una eficiencia en la remoción de estos microorganismos del 90- 100%.^[33] ^[34]

CONCLUSIONES

- ✓ En la valoración del aceite usado como principio activo se identificaron 6 compuestos mayoritarios: α -pineno (1,39%), β -mirceno (1,38%), limoneno (59.84%), germacreno-D (0,91%), α felandreno (24,66%), mentofurano (5,95%)
- ✓ Los estudios de preformulación ayudaron a establecer las condiciones adecuadas del aceite esencial de Palo santo (*Bursera graveolens*) para el posterior diseño y desarrollo del desinfectante.
- ✓ La formulación más estable es aquella en la que se encuentran en menor proporción el lauril sulfato de sodio y el alcohol etílico puesto que, se observó que en aquellas muestras con un porcentaje mayoritario de dichos componentes la potencia del principio activo se degrada sustancialmente.
- ✓ Los resultados obtenidos del análisis microbiológico establece que el producto se encontraba libre de contaminaciones producidas por bacterias, hongos o levaduras o largo de los seis meses de análisis.
- ✓ El ensayo de actividad antibacteriana y antifúngica en el producto terminado, mostro actividad tanto antifúngica como antibacteriana incluso en la muestra de excipientes libre de principio activo.
- ✓ Luego de los análisis aplicados el desinfectante presenta inestabilidad tanto física como química puesto que hay un descenso del pH, así como un cambio del color y una pérdida considerable del principio activo además de claras inconsistencias en el mantenimiento de la concentración a lo largo del tiempo.
- ✓ En la presente investigación la predicción de la vida útil no pudo determinarse dado que el método de Arrhenius presenta varias limitaciones como un tiempo de vida útil muy estricto, es decir que la concentración del principio activo a largo de los meses de análisis no debe ser inferior al 90%.

RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar con el estudio del aceite esencial de palo santo *Bursera graveolens* en combinación con otros aceites esenciales en búsqueda de una mezcla apropiada pueda otorgar un efecto antimicrobiano de mayor eficacia.
- ✓ Al realizar un el estudio de preformulación con aceites esenciales emplear diversos tipos de envases con el fin de determinar el material de acondicionamiento más apto.
- ✓ Se debe reducir al mínimo o eliminar las concentraciones de lauril sulfato de sodio y alcohol 96% en la formulación ya que según el resultado en el análisis de Plackett y Burman se observó que el efecto promedio causado por estos excipientes, era significativo. Para confirmar esto es necesario adicionar un diseño estadístico más fino que fortalezca el diseño de la formulación.
- ✓ Es recomendable la adición de un amortiguador del pH para que este permanezca dentro de los límites requeridos.
- ✓ Se sugiere la aplicación de un diseño factorial adicional, como el diseño estadístico SPSS para ser aplicado previo estudio de Plackett y Burman, centrándose principalmente en el establecimiento de la fórmula de manera que se logre estudiar una fórmula mejor establecida

BIBLIOGRAFÍA

1. Carvajal P., (2009). *Vinculación de la formación académica con la atención comunitaria en la unidad móvil de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad Técnica de Manabí de noviembre 2008- diciembre 2009*. Universidad Técnica de Manabí.
2. Castañeda J. (2005). *Aprovechamiento del raleo y poda del bosque del pinabete (*Abies guatemalensis* Rheder), para la extracción y caracterización del aceite esencial a nivel planta piloto y su escalonamiento industrial, para elaboración un producto de limpieza y una esencia*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
3. Cesario A., Lira M., Hinrichsen S. (2010). *Limpieza y desinfección de superficies hospitalarias*. Brasilia. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
4. Gutierrez L. (2009). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de desinfectante líquido de piso para empresas o negocios en la ciudad de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
5. Romano N., Trano M., Baker K. (2003). *Uso de una combinación de tensioactivos, agentes quelantes y aceites esenciales para desinfección efectiva*. ES 2 196 160 T3. CIA01N 65/00// (A01N 65/00A01N 25:30). 06. May.1999. 96924539.8, 16.Jul.1996
6. Robles J. (2001) "*Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae*". Código 1203-05-10122. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Departamento de Química. Disponible en: www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/gifuj/BURSERACEAE_F.pdf
7. Delgado, E.; Díaz, P. (2006). *Elaboración y documentación del programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del Departamento de Microbiología de la pontificia universidad javeriana*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis281.pdf>
8. Zekaria, D. (s.f). *Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos*. Laboratorios Calier. Disponible en : http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_-_Aceites_esen_como_promotores.pdf

9. Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia Facultad Química Farmacéutica. Medellín.* Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>
10. Martínez, J.; Sulbarán, B.; Ojeda, G.; Ferrer, A.; Nava, R. (2003). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina.* Rev. Fac. Agron., Caracas, v. 20, n. 4, Disponible en <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000400010&lng=es&nrm=iso>.
11. Bailac, P.; Dellacasa, A.; Bernasconi, H.; Firpo, N.M; & Ponzi, M. (2000). *Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de Eupatorium patens.* Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 45(2), 207-211. Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442000000200006&lng=es&tlng=es.10.4067/S0366-16442000000200006.
12. Jardín Botánico Reinado Espinoza. UNL. *Árboles nativos de la provincia de Loja,* Loja, 1992; pp 32-33
13. Salas, M.; Zaragocín, R. (2006). *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*
14. Valarezo, E; Morocho V; Ordoñez, Y. *Aceites esenciales, Plantas aromáticas del sur del Ecuador,* Planta de Productos Naturales. UTPL
15. Manzano, L.; Miranda, M.; Gutiérrez, Y.; García, G.; Orellana, T.; Orellana, A. *Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas1 de B. graveolens Triana & Planch. (Palo santo) de Ecuador.* Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 2009; 14,45-53
16. Manzano, P. (2009) *Potencial fitofármaco de B. graveolens Sp. (palo santo), del bosque seco tropical, Península de Santa Elena, provincia de Guayas.* Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
17. Leyva M., Martínez J., Stashenko E. (2007). *Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de Bursera graveolens (Burseraceae) de Colombia.* Redalyc. 13(33): 201-202
18. Delgado, E.; Díaz P. (2006). *Elaboración y documentación del programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del departamento de microbiología*

- de la Pontificia Universidad Javeriana. Tesis Microbiólogo Industrial). Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana.26p
19. Salager J. (1988). *DETERGENTES Componentes, Fabricación, Formulas. Laboratorio de formulación de interfaces reología y procesos* Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. Disponible en: http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S332A_Detergentes.pdf
 20. Sellés, E. Estabilidad del Medicamento. *En tratado de farmacia galénica*; Faulí, T. C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000; Vol.1, pp 59-61
 21. Ministerio de Salud Pública, Republica de Cuba. (2006). *Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de desinfectantes técnicos para uso hospitalario*. La Habana-Cuba. Disponible en : <http://www.cecmecmed.sld.cu/Docs/RegFarm/DRA/DTUH/Reg/ReqReg%20DTUH.pdf>
 22. Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional USP32-NF27 (2009), pp970.
 23. Cruz, P. (2009). *Elaboración y Control de Calidad del Gel Antimicótico de Manzanilla (Matricaria chamomilla), Matico (Aristiguetia glutinosa) y Marco (Ambrosia arborescens) para Neo-Fármaco*. Tesis (Bioquímico Farmaceutico). Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.54p.
 24. Rosales, J. (2012). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de Baccharis obtusifolia Kunth (Asteraceae) de la provincia de Loja*. (Tesis de grado en Bioquímica y Farmacia), Universidad Técnica Particular de Loja, Loja Ecuador
 25. Vacacela, M. (2012). *Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (Bursera graveolens)*. (Tesis de grado en Bioquímica y Farmacia), Universidad Técnica Particular de Loja, Loja Ecuador.
 26. Sawarbrick, J. (3^{ra} edición) (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. (Vol. 2). Informa healthcare: New York.
 27. Melgoza, R., Buitrón, G. (2005). *Biodegradación del Colorante Azo Azul Disperso 79 en un Reactor Discontinuo Secuencial Bajo Ambientes Anaerobios/Aerobios*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 36, No. Especial
 28. Niazi, S. (2da Edición). (2009). *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Liquid Products* (Vol. 3). Informa healthcare: New York

29. Sellés, E. Estabilidad del Medicamento. *En tratado de farmacia galénica*; Faulí, T. C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000; Vol.1, pp 59-61
30. Lertsatitthanakorn, P., Manwiwattanakun, K., Paengnakorn, N., Khunkitti, W. (2014). *Antibacterial Activity of an Effective Essential Oil Formulated in Liquid Soap Against Skin Bacteria*. Chiang Mai J. Sci.; 41(1) : 71-83
31. Venisetty, R., Keshetty, S., Ciddi, V. (2014). *Optimization of surfactant and polymer concentration to alter the morphology of matt forming fungal cultures*. IJPRBS, 2014; Volume 3(1): 47-53
32. Hidalgo, L., Gutiérrez, M., Venturacansco, M., Dendooven, L., Mendoza, M., Sánchez, S., García, O., Abud, M. (2012). *Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de Bursera graveolens y Taxodium mucronatum de Chiapas, México*. Gayana Bot. 69(Número Especial): 7-14
33. Bassole, I., Juliani, H. (2012). *Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties*. *Molecules*, 17, 3989-4006; doi:10.3390/molecules17043989
34. Death, S., Death, J (2002). *Antimicrobial composition formulated with essential oils*. US 6346281 B1. 12 Feb 2002 US 09/564,282. 5 May 2000
35. ICH. International conference Harmonization. *Stability Testing Of New Drug Substances And Products (Revision 2)*. Datos disponibles en Mayo del 2014: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>
36. Cruz, P. (2009). *Elaboración y Control de Calidad del Gel Antimicótico de Manzanilla (Matricaria chamomilla), Matico (Aristiguetia glutinosa) y Marco (Ambrosia arborescens) para Neo-Fármaco*. Tesis (Bioquímico Farmacéutico). Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.55p.
37. Tropicos. (2014). *Bursera graveolens (Kunth) Triana & Planch*. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/4700223?tab=synonyms>
38. Amela, J., Valero, E. (2001). *Estudios de Preformulación, Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*. Glatt Labortecnin, pp 95-199, España
39. Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Primera edición. Aiyana ediciones. Impreso en España. Págs. 99.

ANEXOS

ANEXO 1

MEZCLAS GENERADAS A PARTIR DE LA MATRIZ DE EXPERIMENTACIÓN

FORMULA 1	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	15
EDTA	0,05
OH 96	20
Fragancia	2
Colorante	0
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

FORMULA 2	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	15
EDTA	0,1
OH 96	20
Fragancia	1
Colorante	0,001
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

FORMULA 3	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	15
EDTA	0,1
OH 96	25
Fragancia	2
Colorante	0
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

FORMULA 4	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	12
EDTA	0,1
OH 96	25
Fragancia	2
Colorante	0
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

FORMULA 5	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	15
EDTA	0,05
OH 96	25
Fragancia	2
Colorante	0,001
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

FORMULA 6	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	12
EDTA	0,1
OH 96	20
Fragancia	2
Colorante	0,001
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

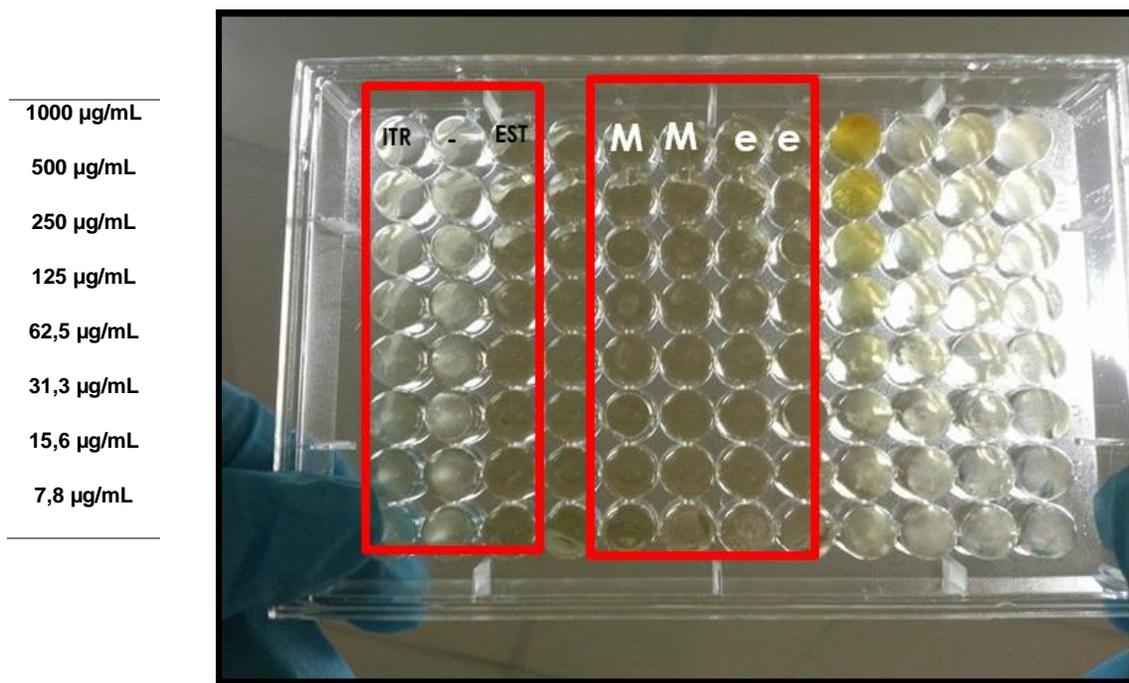
FORMULA 7	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	12
EDTA	0,05
OH 96	0,7
Fragancia	1
Colorante	0,001
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

FORMULA 8	
Componentes	% (p/v)
Aceite	5
Lauril sulfato de sodio	12
EDTA	0,05
OH 96	0,5
Fragancia	1
Colorante	0
Metilparabeno	0,02
Propilparabeno	0,18
Ácido ascórbico	0,1
Agua	c.s

Elaboración: Bravo, O. (2014)

ANEXO 2 RESULTADOS ACTIVIDAD BIOLÓGICA



e = excipientes

M = muestra

EST = Control estéril

- = Control negativo (DMSO)

ITR = Itraconazol