



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

“Diseño y desarrollo de un ambientador líquido a partir del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*)”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA: Jaramillo Gutiérrez, Patricia Katherine

DIRECTOR: Ojeda Riascos, Edgar Santiago, BQF

LOJA - ECUADOR
2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

BQF.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Diseño y desarrollo de un ambientador líquido a partir del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*)”** realizado por el profesional en formación: Jaramillo Gutiérrez Patricia Katherine; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre del 2014

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo **Jaramillo Gutiérrez Patricia Katherine** declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Diseño y desarrollo de un ambientador líquido a partir 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).....
Jaramillo Gutiérrez Patricia Katherine
C.I. 1104186489

DEDICATORIA

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.

A mi querida y recordada abuelita Virginia, fuiste como una madre que me brindo todo su amor, aún tus recuerdos brillan en mi corazón porque a pesar del tiempo que ha pasado desde tu partida, formas parte de mi vida.

A mi padre Víctor y a mi madre Fanny quien dio todo su esfuerzo, apoyo y por la confianza que depositó en mí. Gracias por ser una madre ejemplar y haberme ayudado a cumplir mi gran sueño de ser profesional.

A mis Hermanas, Verónica y Maritza por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por ser ejemplo de arduo trabajo y tenaz lucha en la vida.

A mis adorables sobrinos Joan, Fanny y Valentina con quienes he compartido momentos inolvidables y han sido mi fuente de inspiración. Los amo con mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, porque en sus aulas, recibimos el conocimiento intelectual y humano de cada uno de los docentes de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico. Especial agradecimiento al Director de Tesis el Bq.F. Santiago Ojeda, por sus conocimientos aportados en este proyecto.

Al Dr. Hermel Salinas por toda la colaboración brindada, por sus valiosas aportaciones que hicieron posible este proyecto y por la gran calidad humana que me ha demostrado con su amistad.

A la Bq.F Marisol Vacacela por su valioso asesoramiento y guiarme durante el desarrollo del proyecto.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible la realización de este trabajo de Tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE ANEXOS | x |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| MARCO TEÓRICO | 6 |
| 1.1 Aceites esenciales | 6 |
| 1.2 Ambientador | 6 |
| 1.3 <i>Bursera graveolens</i> (Palo Santo)..... | 8 |
| 1.4 Sustancias que componen un Ambientador líquido..... | 10 |
| 1.5 Control de Calidad | 11 |
| 1.6 Estudios de estabilidad..... | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 2.1 Obtención del aceite esencial..... | 17 |
| 2.2 Estudios de preformulación | 18 |
| 2.3 Estudios de formulación | 24 |
| 2.4 Estudio de estabilidad del producto terminado..... | 26 |
| 2.5 Predicción de vida útil del ambientador líquido mediante el método Arrhenius..... | 27 |
| 2.6 Estudios complementarios..... | 28 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 30 |
| 3.1 Preformulación..... | 30 |
| 3.2 Estudio de compatibilidad aceite esencial- excipientes..... | 32 |
| 3.3 Formulación | 36 |
| 3.4 Estabilidad del ambientador líquido..... | 37 |
| 3.5 Predicción de vida útil del ambientador líquido mediante ecuación de Arrhenius | 43 |
| 3.6 Estudio complementario | 43 |

| | |
|-----------------------|----|
| CONCLUSIONES..... | 45 |
| RECOMENDACIONES:..... | 46 |
| ANEXOS | 47 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 1. | Zonas climáticas en el Mundo..... | 15 |
| Tabla 2. | Solubilidad en términos descriptivos. | 20 |
| Tabla 3. | Solubilidad del aceite esencial de Palo Santo de acuerdo a la USP mediante términos descriptivos. | 20 |
| Tabla 4. | Factores utilizados para el diseño Plackett y Burman..... | 23 |
| Tabla 5. | Distribución y acondicionamiento de las mezclas..... | 23 |
| Tabla 6. | Fórmula que para ambientador líquido. | 24 |
| Tabla 7. | Condiciones generales de estudios sugeridos por ICH..... | 27 |
| Tabla 8. | Parámetros evaluados en el estudio de estabilidad..... | 27 |
| Tabla 9. | Compuestos principales identificados del aceite esencial de Palo Santo..... | 31 |
| Tabla 10. | Parámetros organolépticos y físico-químicos del aceite esencial de Palo Santo. | 31 |
| Tabla 11. | Factores utilizados para el diseño factorial de Plackett y Burman..... | 32 |
| Tabla 12. | Matriz “Plackett y Burman”, relacionada con la potencia del principio activo. | 33 |
| Tabla 13. | Significancia de los efectos en función de su respuesta en Matriz “Plackett y Burman”. | 35 |
| Tabla 14. | Mezcla final seleccionada de la Matriz “Plackett y Burman”. | 36 |
| Tabla 15. | Parámetros organolépticos del ambientador líquido durante los 6 meses de estabilidad, | 37 |
| Tabla 16. | Control del pH durante los seis meses de estudio de estabilidad. | 38 |
| Tabla 17. | Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre pH vs Tiempo..... | 38 |
| Tabla 18. | Control de densidad (g/ml) durante los seis meses de estudio de estabilidad. | 39 |
| Tabla 19. | Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Densidad vs Tiempo..... | 39 |
| Tabla 20. | Resultados del porcentaje de concentración de aceite esencial mediante CG/MS de durante los seis meses de estudio de estabilidad. | 40 |
| Tabla 21. | Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre % concentración de aceite vs Tiempo..... | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Árbol de Palo Santo | 8 |
| Figura 2. | Mapa de recolección de <i>B. graveolens</i> | 17 |
| Figura 3. | Cromatógrafo de gases Agilent 6890N | 18 |
| Figura 4. | Condiciones de Operación del GC/MS en la columna DB-5MS. | 19 |
| Figura 5. | Refractómetro ABBE | 21 |
| Figura 6. | Proceso General de fabricación de soluciones líquidas..... | 25 |
| Figura 7. | Proceso de elaboración del ambientador líquido | 26 |
| Figura 8. | Cromatograma del aceite esencial de Palo Santo mediante (GC-MS)..... | 30 |
| Figura 9. | Resultados de los análisis microbiológicos en agar plate count para aerobios mesófilos. | 41 |
| Figura 10. | Resultados de los análisis microbiológicos en agar sabouraud para hongos, mohos y levaduras..... | 42 |
| Figura 11. | Duración del aroma del producto terminado según la escala de intensidad..... | 43 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|-----------|
| ANEXO 1 | 49 |
| MEZCLAS GENERADAS A PARTIR DE LA MATRIZ DE EXPERIMENTACIÓN | 49 |
| ANEXO 2 | 51 |
| REFERENCIA DE GAMMA DE VERDES DEL AMBIENTADOR LÍQUIDO SOMETIDO A ESTABILIDAD | 51 |
| ANEXO 3 | 52 |
| FICHA DE EVALUACIÓN | 52 |

RESUMEN

En el presente estudio se elaboró un ambientador líquido usando como ingrediente activo el aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*). Se realizaron estudios de preformulación como la valoración del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS), donde se observó que los componentes mayoritarios del aceite fueron Limoneno (59,84 %) y α -Felandreno (24,66 %). Además se realizó estudios de formulación en base al diseño factorial de Plackett y Burman, con el fin de determinar la compatibilidad entre principio activo – excipientes y seleccionar la mezcla final, que será sometida a estudios de estabilidad. (Seis meses).

Se realizó el estudio de los parámetros físico-químicos como pH, densidad y concentración del principio activo. Además se llevó a cabo el estudio de parámetros microbiológicos frente a: aerobios mesófilos, mohos, hongos y levaduras, mostrando inhibición de crecimiento durante los seis meses de estudio de estabilidad

Finalmente no se pudo determinar la predicción de la vida útil del ambientador líquido por el método de Arrhenius.

Palabras clave: Palo Santo, *Bursera graveolens*, estabilidad, ambientador líquido, Plackett y Burman.

ABSTRACT

In the present study, a liquid air freshener as the active ingredient using the essential oil of Palo Santo (*Bursera graveolens*) was developed. Studies were conducted of preformulation as the valuation of the essential oil by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), where it was noted that the major components of the oil were limonene (59.84 %) and α -phellandrene (24.66 %). He also did studies of formulation based on the factorial design of and Plackett Burman, in order to determine the compatibility between active principle - excipients and select the final mix, which will be subjected to stability studies. (Six months).

The study of physico-chemical parameters such as pH, density and concentration of the active ingredient was performed. He also conducted the study against microbiological parameters: aerobic mesophilic bacteria, molds, fungi and yeasts, showing growth inhibition during the six-month stability study

Finally he could not determine the prediction of the lifetime of the liquid air freshener by the method of Arrhenius.

Key Words: Palo Santo, *Bursera graveolens*, stability, liquid air freshener, and Plackett Burman.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en diseñar y desarrollar un ambientador líquido a partir del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*). Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte 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.

El presente trabajo investigativo busca desarrollar un ambientador líquido a partir del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*), no solo con el fin cognoscible, académico y utilitarista sino también con la finalidad de prestar un servicio que brinde un bien a la comunidad en general, dando un producto eficaz y seguro, y así contribuir con el avance en la Industria Farmacéutica.

El objetivo general es diseñar y desarrollar un ambientador líquido que desempeñe la función de aromatizar un lugar específico, que cumpla con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y así garantizar un producto eficaz y seguro para los seres humanos; los componentes del proyecto desarrollados son: Valorar e identificar cualitativamente y cuantitativamente la composición del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), así como también evaluar diferentes excipientes para establecer la compatibilidad con el principio activo y determinar los más adecuados e idóneos para la formulación, mediante el diseño factorial Plackett y Burman; Desarrollar la fórmula para obtener el ambientador en base al resultado del modelo aplicado para compatibilidad de excipiente – principio activo; Evaluar la estabilidad y vida útil del ambientador líquido mediante pruebas físicas, químicas y microbiológicas.

El uso de ambientadores ha ido tomando a lo largo de los años más importancia, ya que las crecientes ventas en este producto son inmejorables. Obviamente, a causa de la evolución de este producto, cada vez son más los modelos de ambientadores que hay en el mercado. Los formatos líderes que más destacan son los ambientadores líquidos eléctricos con más del 50% del total del mercado. Su funcionamiento es muy sencillo se basa en la expulsión de una alta concentración de esencias específicamente para aromatizar un espacio definido.¹

Los ambientadores desprenden varios olores diferentes, los mismos que consiguen despertar los sentidos del ser humano tranquilizando y relajando su mente, permitiendo la claridad y la inspiración de este.²

Para desarrollar esta investigación se aplicó la siguiente metodología: primero se realizó la identificación de los componentes del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*) mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS). Luego se desarrolló estudios de preformulación del aceite esencial como densidad, índice de refracción y estudios de formulación mediante el diseño factorial de Plackett y Burman para determinar la fórmula final que fue sometida a estabilidad acelerada durante los seis meses en estudio. En los ensayos de estabilidad acelerada se llevó a cabo pruebas organolépticas, físico-químicas y microbiológicas del producto terminado. Para la predicción de vida útil se utilizó la ecuación de Arrhenius.

MARCO TEÓRICO

1.1 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 y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).⁶

Los aceites esenciales 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.⁶

1.2 Ambientador

El ambientador es una sustancia que sirve para desodorizar y perfumar locales. La función del ambientador es de aromatizar el ambiente, introducir fragancia en el aire de los espacios interiores. La fragancia se difunde en el aire para enmascarar otros olores o para introducir un olor específico.⁷

Hay que destacar que la clave y la esencia del ambientador es el aroma, es decir, el ambientador nace como consecuencia del perfume. El ambientador desprende varios tipos de olores y estos consiguen despertar los sentidos del ser humano tranquilizando y relajando su mente, permitiendo la claridad y la inspiración de este.²

Los modelos que más destacan son los ambientadores líquidos, su funcionamiento es muy sencillo y se basa en la expulsión de una alta concentración de esencias fundamentalmente para aromatizar, tienen una duración prolongada, ya que su consumo es mínimo y su rendimiento es máximo. En una estancia cerrada podemos decir que este tipo de ambientador puede durar 12 horas aproximadamente.²

Todos los ambientadores están constituidos principalmente por varios tipos de aceites esenciales y esencias aromáticas. También hay que decir que los ambientadores pueden ser de varios tamaños y diferentes colores pero todos siempre con el mismo objetivo, aromatizar el ambiente.²

1.2.1. Ambientador líquido.

Son preparaciones líquidas que se caracterizan por impregnar los ambientes con aromas agradables. Su acción aromática se debe a que en su composición contienen esencias debidamente emulsionadas impregnadas disueltas en vehículos excipientes.²

1.2.2. Ambientador y aceites esenciales.

Un ambientador formulado con aceites esenciales naturales proporciona un aroma mucho más agradable y delicado que cualquiera de los aromas sintéticos que despiden los productos de limpieza cotidianos.⁸

Algunos aceites esenciales que son algo irritantes para ser utilizados en los perfumes o que no se utilizan en aquellos en excesiva concentración, encuentran mayor aplicación en la elaboración de ambientadores de calidad.⁸

El método más fácil para ambientar un recinto es mediante pulverización de la disolución. Este método produce un aroma fresco que rápidamente se extiende a todo el volumen del recinto.⁸

1.2.3. Otras funciones de los ambientadores.

Independientemente de la función principal de un ambientador, que básicamente consiste en aromatizar una estancia o recinto definido, dependiendo de los aceites esenciales que incorporen, pueden tener otras aplicaciones. Así es posible formular un ambientador que al mismo tiempo que aromatiza una habitación mantenga alejadas a las moscas o bien elimine los parásitos de las plantas domésticas.⁸

1.3 *Bursera graveolens* (Palo Santo)

En la figura 1 se muestra el árbol de Palo Santo.



Figura 1. Árbol de Palo Santo

Fuente: Cortesía de Ph.D Vladimir Morocho. Departamento de Química de la U.T.P.L

1.3.1. Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica de *B. graveolens* es la siguiente:

| | |
|---------------------------|---|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Sapindales |
| Familia: | Burseraceae |
| Género: | Bursera |
| Especie: | Graveolens |
| Nombre científico: | <i>Bursera graveolens</i> (Kunth) Triana & Planch |
| Nombre común: | Palo Santo ⁵ |

1.3.2. Descripción botánica.

El Palo Santo (*B. graveolens*) 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 liza de color morado grisáceo, fuste cilíndrico y copa globosa.⁹

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.⁹

1.3.3. 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.¹⁰

1.3.4. 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 msnm, en lugares como el archipiélago de Galápagos, Guayas, Imbabura, Manabí y en la provincia de Loja.⁴

1.3.5. Parte utilizada.

El aceite esencial de *B. graveolens* se extrae generalmente de las hojas, tallos y frutos. Tradicionalmente se ha utilizado el tronco para la obtención de aceite esencial, sin embargo el Departamento de Química de la U.T.P.L ha tenido la iniciativa de utilizar el fruto como materia prima para extraer el aceite esencial obteniendo resultados favorables.

1.3.6. Composición química.

En la determinación cualitativa realizada 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 extracto alcohólico: resinas, sustancias reductoras, fenoles y taninos; en el extracto acuoso la presencia de fenoles y taninos, flavonoides, sustancias reductoras, saponinas y aminoácidos.¹¹

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).⁴

1.3.7. Usos.

B. graveolens, ha sido utilizado desde épocas remotas como remedio para curar dolores estomacales, sudoríficos y como linimento para reumatismos y dolores en todo el cuerpo.¹²

La madera seca se utiliza para sahumarla y para espantar mosquitos para hacer objetos a mano, para producir los palillos ardientes, al quemar el leño seco se obtiene una fragancia cítrica, fresca, muy similar a la aroma de las flores de la naranja, el limón, etc.¹²

Se encontraron trabajos que describen las propiedades, fundamentalmente de los triterpenos, Lupeol y epi-lupeol y aceites esenciales presentes en los extractos metabólicos de la planta. Estos incluyen la acción antiinflamatoria, antirreumática, antibacteriana y antineoplásica. *B. graveolens* es usada en perfumería y en medicamentos.¹²

1.4 Sustancias que componen un Ambientador líquido

Dentro de las sustancias básicas que componen un ambientador líquido tenemos las siguientes:

- **Disolventes:** Una mezcla de disolventes volátiles podría resultar mejor desde distintos puntos de vista que la utilización de un único disolvente como el alcohol etílico, pero dado que cualquier otro disolvente volátil como la acetona, etil metil cetona. Es más irritante que el alcohol, es aconsejable descartarlos directamente.⁸
- **Conservantes:** Una pequeña proporción (0.1%) de un conservante químico, como puede ser el benzoato de sodio, sorbato potásico o cualquier derivado de estos, que son de amplio uso en cosmética, farmacia y alimentación. De esta forma eliminaremos la proliferación de microorganismos en el producto y alteración de su aroma.⁸
- **Antioxidantes:** Evitar la oxidación de los terpenos de los aceites esenciales, disminuyendo la posibilidad de aparición de aromas oxidados durante el tiempo de vida del producto.⁸
- **Fragancia:** Tienen su origen en la formación de pequeñas cantidades de aceites volátiles por alteración de los aceites esenciales contenidos en las partes de la

materia viva, pero también se pueden obtener distintas sustancias por medio de la sintonización de aromas artificiales en un laboratorio.¹³

- **Fijador de fragancia:** Sustancia que sirve para prolongar más tiempo el olor de una sustancia en particular, utilizado con mayor frecuencia en la industria de la perfumería.¹³
- **Colorante:** Los colorantes se han usado desde los tiempos más remotos, empleándose para ello diversas materias procedentes de vegetales (cúrcuma, índigo natural, etc.) y de animales (cochinilla, moluscos, etc.) así como distintos minerales.¹³
- **Regulador de pH:** ácido cítrico, citrato de sodio, fosfatos para mantener el pH del ambientador.¹³

1.5 Control de Calidad

1.5.1. Buenas prácticas de Manufactura.

Las Buenas Prácticas de Manufactura. (BPM) o Good Manufacturing Practices (GMP): Es un conjunto de normas que cada laboratorio Farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique, debiendo para ello tomar todas las medidas oportunas para garantizar que los productos posean la calidad necesaria según el uso a que se destinen.¹⁴

1.5.2. Parámetros organolépticos.

Son el resultado de un conjunto de análisis sensoriales (visual, olfativo, táctil) que califican los atributos organolépticos, es decir nos ayudan a describir el olor, color, y aspecto del producto terminado de tal forma que contribuyen a la definición de la calidad del mismo.¹⁵

1.5.3. Parámetros Físico-químicos.

Los parámetros Físico-químicos estudiados son: pH y densidad relativa.

pH: El pH es un índice numérico que se emplea para expresar el grado de acidez o alcalinidad de una solución. La determinación del pH se realiza empleando un medidor del pH, calibrado y capaz de reproducir valor es de pH con variaciones menores a 0,02 unidades de pH, empleando un electrodo indicador sensible a la actividad del ión hidrógeno, como el electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, como por ej., calomel o plata -cloruro de plata.¹⁶

Densidad relativa: cuando no se indique lo contrario, la densidad relativa se calculará como la relación entre el peso de un volumen determinado de una sustancia en el aire a 25°C y el peso de un volumen igual de agua a esa misma temperatura.¹⁶

1.5.4. Parámetros Microbiológicos.

Los criterios de aceptación para el producto terminado de acuerdo a la actividad de contenido de agua establecido en la USP (Farmacopea de los estados Unidos) son: RTMA (Recuento total de Microorganismos Aerobios) y RTCLH (Recuento total combinado de Hongos filamentosos y Levaduras).¹⁷

1.6 Estudios de estabilidad

1.6.1. Definición.

1.6.1.1 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.¹⁸

En el estudio de estabilidad se efectúan pruebas a un medicamento para determinar el período 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 tripartidas de la International Conference Harmonization (ICH).¹⁹

1.6.1.2 Período de validez.

Es el periodo de tiempo durante el cual el producto farmacéutico cumple especificaciones físicas, químicas y biológicas y no existe modificación significativa de toxicidad del degradante.¹⁷

1.6.1.3 Tiempo de vida útil de un p.a. (Principio activo).

Expresa o mide la estabilidad química de p.a. en formas farmacéuticas. $T_{90\%}$ es el periodo de tiempo durante el cual el p.a. se degrada un 10% de su cantidad inicial ó lo que señale en la especificación de la monografía del producto.¹⁷

1.6.2. Tipos de estudios de estabilidad.

Las Normas ICH (International Conference On Harmonization) consideran como principales factores para el estudio: Humedad, temperatura y Luz.²⁰

1.6.2.1 Estudios acelerados.

Los estudios de estabilidad en condiciones de stress o degradación acelerada tienen carácter predictivo o establecen una fecha predictiva de vencimiento del producto.

Los estudios acelerados, se realizan con el principio activo y con la forma de dosificación a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, normalmente hasta los 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:¹⁹

- Acelerar el proceso de degradación del principio activo y/o de la forma de dosificación, por lo cual en un proceso relativamente corto por ejemplo de 1-3 meses, tendremos resultados de la inestabilidad del principio activo o de la forma farmacéutica, pudiendo así comparar los resultados del efecto de distintos envases y distintas formulaciones.¹⁹
- Establecer un tiempo de validez inicial que posteriormente tendrá que ser confirmado a través de estudios de estabilidad en las condiciones de almacenamiento adecuadas dadas para el producto.²⁰
- En algunos casos predecir en poco tiempo (máximo 6 meses), la velocidad de degradación a temperatura ambiente, aplicando la ley de Arrhenius. Esto servirá para conocer mejor los mecanismos de degradación y por consiguiente aplicar mejor las medidas correctoras a esta inestabilidad. Se ha de recordar, que oficialmente, estos estudios no pueden sustituir a los estudios a tiempo real.¹⁹

1.6.2.2 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.²¹

1.6.3. Predicción de vida útil del Ambientador líquido: Estudio de estabilidad acelerada por el método de Arrhenius.

Para la predicción de vida útil se utiliza cámaras termostatzadas y con humedad relativa determinada. Tomando en cuenta orden de reacción (k) y ecuación de Arrhenius (K).²⁰

Método de Arrhenius: es muy utilizado en estudios de estabilidad, se basa: en una reacción química donde las moléculas que tienen energía en exceso sobre un determinado nivel de energía denominado energía de activación; son las que intervienen en la reacción química y la magnitud de dicha energía depende de la naturaleza del proceso y el número de moléculas activadas varía de una reacción a otra, para que una molécula pueda adquirir energía adicional para reaccionar necesita de choque o intercambios entre las mismas.²¹

La posibilidad de que una molécula tenga energía en exceso está dada por el factor de Boltzman:

$$K = A e^{-E/RT}$$

En donde:

K= Constante de velocidad

A= Frecuencia de colisión entre las moléculas.

E= Energía de activación.

R= Constante de los gases.

T= Temperatura absoluta en grados Kelvin.

Este sistema consiste en someter a la muestra en estudio a diferentes condiciones de temperatura y Humedad relativa; por lo general tres temperaturas y se determina periódicamente la degradación del principio activo de la formula. Se calcula la constante de velocidad cada temperatura. Se procede a graficar la ecuación de Arrhenius $\ln K$ vs. $1/T \times 10000$, y se calcula la constante K25 de degradación en el caso de Ecuador (Tabla 1) ya que se encuentra ubicado en Zona Climática IV para estudio de estabilidad.²¹

A partir de la constante K25 se calcula el periodo de vida útil y la fecha de caducidad del producto.

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: 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>

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención del aceite esencial

2.1.1. Zona de recolección.

En la figura 2 se muestra la zona de recolección de los frutos de *Bursera graveolens*, los mismos que se encuentran 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.⁴

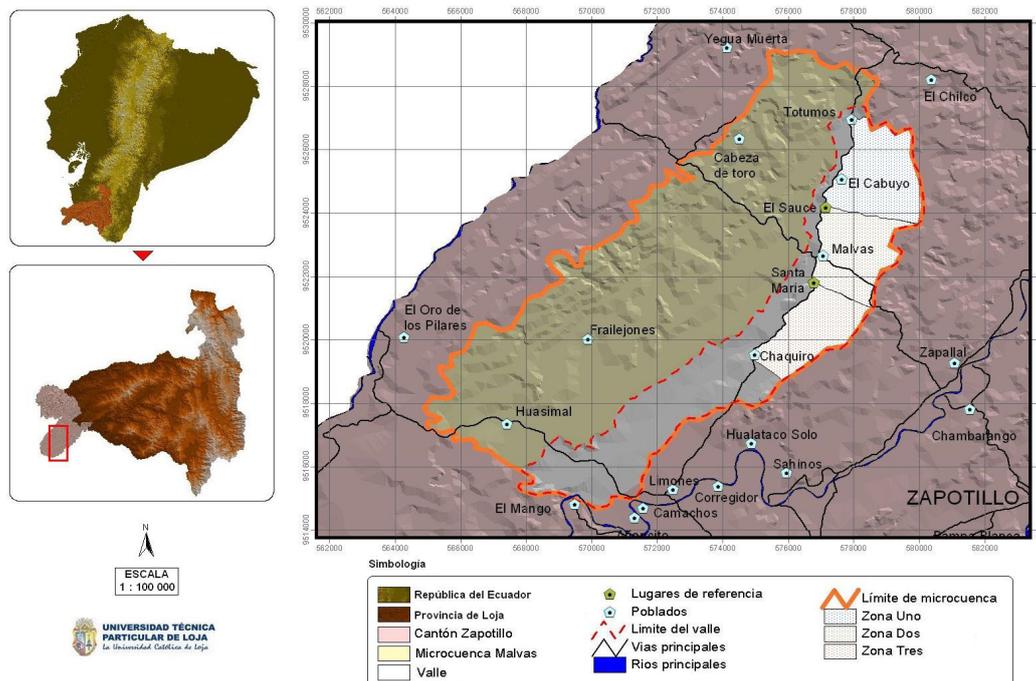


Figura 2. Mapa de recolección de *B. graveolens*.

Fuente: Cortesía de Ph.D Vladimir Morocho. Departamento de Química de la U.T.P.L

2.1.2. Extracción del aceite esencial.

El método de extracción empleado fue mediante destilación por arrastre de vapor en un equipo de destilación tipo Clevenger con capacidad de carga de 1000 g de muestra. En la parte inferior del cilindro se añadieron 1.5 litros de agua destilada aproximadamente, sobre la rejilla del mismo recipiente se colocó 1000 g de la muestra (frutos de Palo Santo).⁴

El vapor formado pasa por un condensador donde 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. La destilación del aceite por arrastre de vapor duró alrededor de 2 horas, tiempo en el cual ya no se observó aumento en el volumen.

Una vez obtenido el aceite esencial se realiza el control de calidad que está relacionado con los estudios de preformulación.³

2.2 Estudios de preformulación

2.2.1. Valoración del aceite esencial (Principio activo).

La identificación de los compuestos del aceite esencial de *B.graveolens*, se obtuvo mediante cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas. (GC-MS). El equipo utilizado para los respectivos análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert (Figura 3), dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1. Además este equipo cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683.



Figura 3. Cromatógrafo de gases Agilent 6890N

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

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 preparación de las mezclas se realizó disolviendo 10 μL de aceite esencial con 990 μL de diclorometano grado HPLC colocado en un vial para cromatografía de capacidad de 1,5 mL. También se inyectó una muestra de hidrocarburos (C10-C25) conocida comercialmente con el nombre de TPH-6RPM de CHEM SERVICE, que contiene el mismo método empleado para el análisis de aceite esencial con el fin de utilizarlos para el cálculo de los índices de Kovats.

La identificación de los compuestos químicos del aceite esencial se determina mediante comparación computarizada de sus espectros de masas con los de la base de datos del equipo utilizado y con ayuda de los índices de Kovats.

En la figura 4, se detalla las condiciones de operación del cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

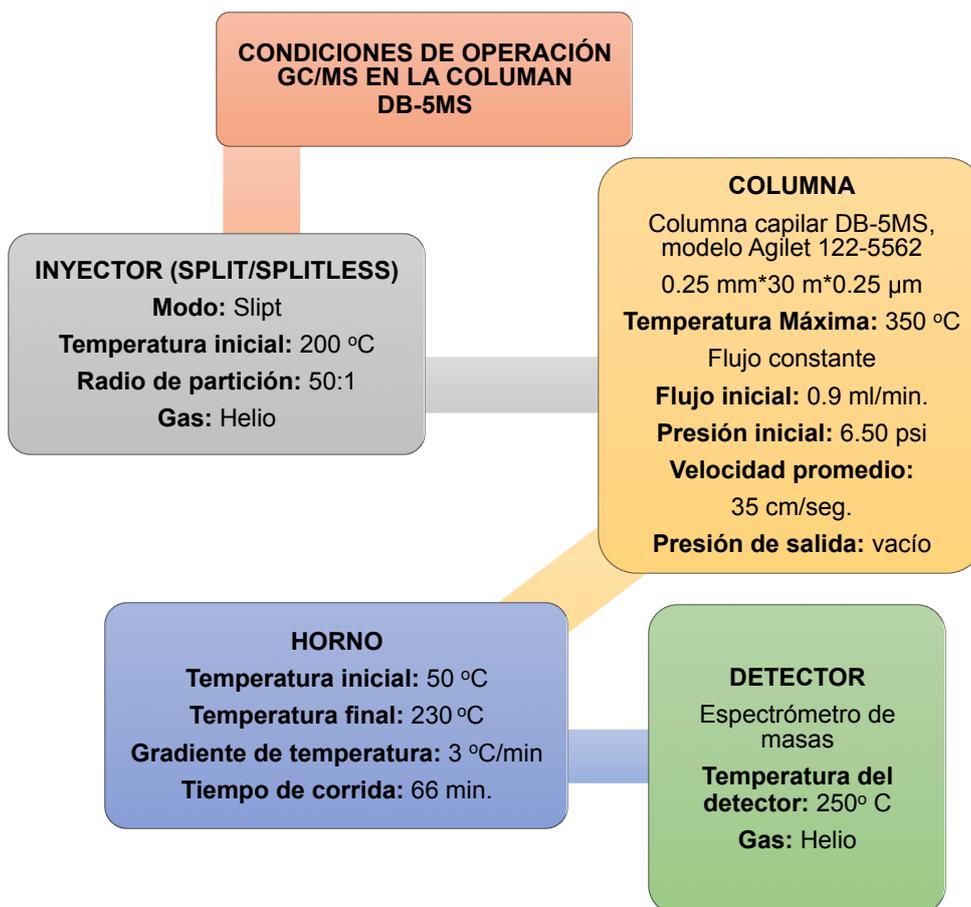


Figura 4. Condiciones de Operación del GC/MS en la columna DB-5MS.

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

2.2.2. Evaluación de las propiedades físico-químicas.

2.2.2.1 Solubilidad.

La determinación de la solubilidad se realiza 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 solubilidad.¹⁹

De acuerdo a la USP – NF32 ¹⁷, las solubilidades se indica mediante términos descriptivos en la siguiente tabla:

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. USP-NF32. 2009; Vol. 1, pp 970

En el trabajo realizado por Vacacela (2012)³, muestra la solubilidad del aceite esencial de Palo Santo de acuerdo a la USP mediante términos descriptivos (Tabla 3), cuyos resultados fueron la base de esta investigación.

Tabla 3. Solubilidad del aceite esencial de Palo Santo de acuerdo a la USP mediante términos descriptivos.

| Solvente | Resultado |
|----------------|--------------------|
| Propilenglicol | insoluble |
| Glicerina | fácilmente soluble |
| Alcohol 70% | insoluble |

Fuente: Vacacela M. 2012. Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie Palo Santo (*Bursera graveolens*). Tesis (Bioquímico-Farmacéutico). Loja, Ecuador, Universidad Técnica Particular de Loja. 33p

2.2.2.2 Densidad relativa.

La densidad del aceite esencial 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.

Para esto se pesa el picnómetro vacío con el tapón en su sitio y luego se registra el peso.

Se llena el picnómetro con agua destilada a una temperatura de 20 °C, y se registra el peso del picnómetro lleno.

2.2.3. Estudio de compatibilidad aceite esencial- excipientes.

El estudio se basa en mezclar el principio activo con los excipientes más comunes para el ambientador líquido 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.¹⁹

Se suele 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 Plackett y Burman.¹⁹

2.2.3.1 Estudio de compatibilidad aceite esencial – excipientes: Diseño factorial de Plackett y Burman.

Este tipo de diseño conduce a la obtención de la máxima información cuando se estudia la estabilidad de un número mínimo de mezclas. El tratamiento estadístico de los resultados permite conocer la compatibilidad de un determinado excipiente con el principio activo.¹⁸

En el diseño utilizado se emplea 7 factores a dos niveles diferentes señalados por los signos (+) y (-), donde el número de experimentos fue 8. En nuestro caso los factores son excipientes. Dos de los factores son variables dummy (grados de libertad) y no contienen excipientes a ninguno de los dos niveles. Se deben incluir para poder realizar el tratamiento estadístico.¹⁸

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

I. Composición de las mezclas

La composición general de cada mezcla es la siguiente:

| | |
|------------------------------------|-----|
| Principio activo – Aceite esencial | 12% |
| Excipientes | 88% |

En la tabla 4 se muestra los factores utilizados en la composición de mezclas.

Tabla 4. Factores utilizados para el diseño Plackett y Burman.

| FACTORES | | NIVELES | |
|----------|----------------------|---------|-----|
| | | (-) | (+) |
| A | Alcohol al 96° | 62 | 60 |
| B | Alcohol isopropílico | 2 | 1,5 |
| C | Tween 80 | 15 | 12 |
| D | Glicerina | 3 | 0 |
| E | Fragancia | 8 | 6 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

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 al cual se introducen todos con signo menos (-). A partir de la matriz se originan las mezclas (Anexo 1), las mezclas contienen otros componentes que conforman la fórmula farmacéutica líquida como conservantes antimicrobianos, regulador del pH.

II. Elaboración y Acondicionamiento de las mezclas

Se preparan las mezclas combinando porciones sucesivas del principio activo con los excipientes. Una vez preparadas las mezclas, se reparten en viales de vidrio de tipo II, de 10 ml de capacidad. Se coloca 2 g de mezcla por duplicado y se someten a temperatura ambiente y a 30 °C. Así mismo se coloca 3 g de mezcla por duplicado y se somete a temperatura de 40 °C. La distribución es como se muestra en la siguiente tabla 5.

Tabla 5. 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 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Las muestras se conservarán a las condiciones citadas durante 8 semanas.

III. Análisis de las mezclas.

Transcurridas las 8 semanas, se extraen los viales del armario y de las estufas. 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 en principio activo y detectar y cuantificar posibles impurezas y productos de degradación dentro de la forma farmacéutica líquida.

IV. 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 $p= 0.005$.²³

2.3 Estudios de formulación

2.3.1. Planteamiento de la Fórmula.

Una vez obtenidos los resultados en el diseño factorial de Plackett y Burman se escogerán los excipientes más adecuados, es decir, aquellos que tienen compatibilidad con el principio activo, para que formen parte de la fórmula del ambientador de Palo Santo (*Bursera graveolens*).

La fórmula para la elaboración del ambientador estará compuesta por los siguientes excipientes descritos en la tabla 6.

Tabla 6. Fórmula que para ambientador líquido.

| Ambientador líquido | |
|----------------------------|----------------------------|
| Función | Excipientes |
| Principio activo | Aceite esencial |
| Cosolvente | Alcohol al 96 ° |
| Cosolvente | Alcohol isopropílico |
| Tensoactivo | Tween 80 |
| Antioxidante | Ácido ascórbico |
| Fragancia | Manzana |
| Fijador de fragancia | Glicerina |
| Conservante antimicrobiano | Metilparabeno |
| Conservante antimicrobiano | Propilparabeno |
| Regulador de pH | Ácido cítrico |
| Colorante | Verde |
| | Agua destilada para aforar |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

2.3.2. Diagrama de procesos.

2.3.2.1 *Proceso general de fabricación de soluciones líquidas.*

En el Figura 6 muestra el proceso de manufactura general para soluciones líquidas.

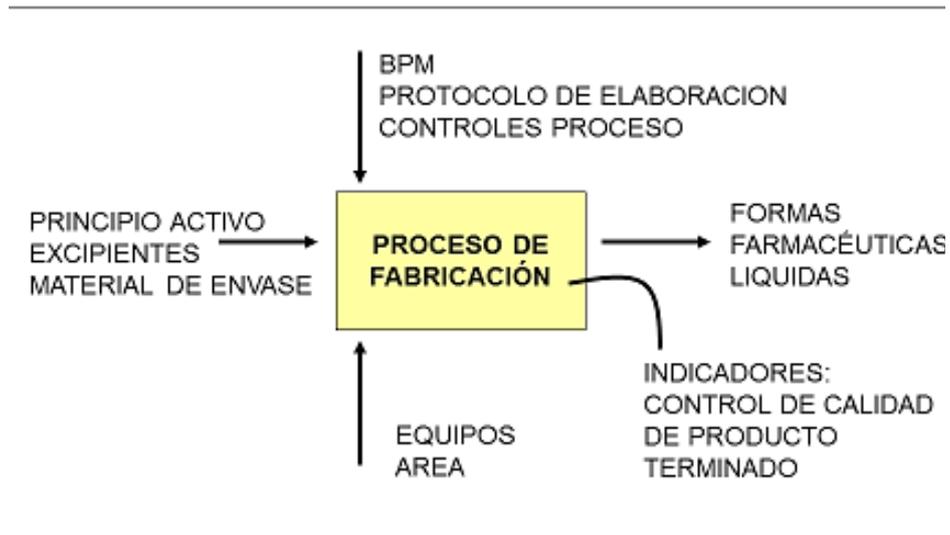


Figura 6. Proceso General de fabricación de soluciones líquidas

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional. USP-NF32. 2009; Vol. 1

2.3.2.2 *Proceso de manufactura del ambientador líquido.*

En la figura 7 se detalla el proceso de manufactura del producto terminado.



Figura 7. Proceso de elaboración del ambientador líquido
 Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

2.4 Estudio de estabilidad del producto terminado

El Ambientador líquido fue sometido a estabilidad acelerada (6 meses) siguiendo condiciones generales como se indica en la tabla 7, establecidas en las **Normas ICH** (Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) que son a: Temperatura ambiente (21°C Aprox), Temperatura a 30 ° C ± 2°C y Temperatura a 40 °C ± 2°C con una humedad relativa del 75% ± 5%.

Para estudios de registro (ICH) comprende 3 lotes sometidos a estabilidad acelerada.

Tabla 7. Condiciones generales de estudios sugeridos por ICH

| ESTUDIO | CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO | TIEMPO DE ESTUDIO (meses) |
|----------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Largo plazo | 25 °C +/- 2°C // 60% +/- 5% HR | 12 |
| Intermedio | 30 °C +/- 2°C // >60% +/- 5% HR | 6 |
| Acelerado | 40 °C +/- 2°C // 75% +/- 5% HR | 6 |

Fuente: Normas ICH (Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

Se elaboró del producto terminado 3 Lotes piloto de una unidad, cada mes se los monitoreo al azar y se realizó ensayos organolépticos, físico-químicos y microbiológicos, durante 6 meses. En la tabla 8, se describe los parámetros evaluados para la estabilidad del ambientador líquido.

Tabla 8. Parámetros evaluados en el estudio de estabilidad.

| ACTIVIDAD | MÉTODO |
|--------------------------|---|
| Análisis Organoléptico | Aspecto, olor y color. |
| Análisis Físico- químico | pH, densidad, GC/MS |
| Análisis Microbiológico | <i>Aerobios Mesófilos</i> (USP 32) Hongos- Levaduras. (USP 32) |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

2.5 Predicción de vida útil del ambientador líquido mediante el método Arrhenius

Para el método de Arrhenius se utiliza cámaras termostatazadas y con humedad relativa determinada.

Para llevar a cabo la ecuación de Arrhenius es muy importante tomar en cuenta lo siguiente:

1. El contenido del principio activo (aceite esencial de *Bursera graveolens*) mediante cromatografía de gases acoplado a Espectrofotometría de Masas (GC/MS), a las temperaturas en las que fueron sometidas (temperatura

ambiente, 30°C y 40°C) con tiempos periódicos de muestreo durante todo el estudio de estabilidad acelerada (0, 1, 2, 3, 4, 5,6 meses).

2. El orden de reacción (K), para esto se construye la gráfica con las pendientes respectivas en función del tiempo vs temperatura.
3. Una vez obtenido la ecuación de Arrhenius se procede a determinar T90% (o la mínima especificación de la farmacopea), tiempo en que el principio activo llega a degradarse en un 10%, a la temperatura de 30 °C, Zona IV, que corresponde a la ubicación del Ecuador según las normas ICH.

2.6 Estudios complementarios

2.6.1. Evaluación sensorial para determinar la duración del aroma del ambientador líquido.

La determinación del aroma del producto terminado se realizó mediante la evaluación sensorial. Para este estudio se necesitó de 10 personas pertenecientes al décimo ciclo de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, a cada uno de ellos se les entregó una muestra del ambientador líquido y la ficha de evaluación a completar (Anexo 3), diseñada en base a lo descrito por Sancho (2002).²⁴

Se les hizo las indicaciones respectivas como: Pulverizar oprimiendo con el spray en el ambiente y luego realizar la evaluación de duración del aroma durante 0, 1, 3,6 ,9 y 12 horas.

La ficha de evaluación permite determinar la duración del aroma del ambientador a través de una escala de intensidad descrita a continuación:

| Escala de intensidad | |
|----------------------|----------|
| 1 | Leve |
| 2 | Moderado |
| 3 | Mucho |
| 4 | Extremo |

Luego de haber culminado el estudio se realizó la tabulación de los resultados con el programa estadístico XLSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Preformulación

3.1.1. Valoración del aceite esencial de Palo Santo (*B. graveolens*)

Los estudios de preformulación incluyen la valoración del aceite esencial de *B. graveolens*, el cual se realizó mediante GC-MS. Para la identificación de los compuestos químicos del aceite se hizo comparación computarizada de sus espectros de masas con los espectros de masas de la base de datos Wiley 7n.1 del Cromatógrafo.

En la figura 8 se observa el cromatograma obtenido una vez analizado el aceite esencial con la columna DB-5MS.

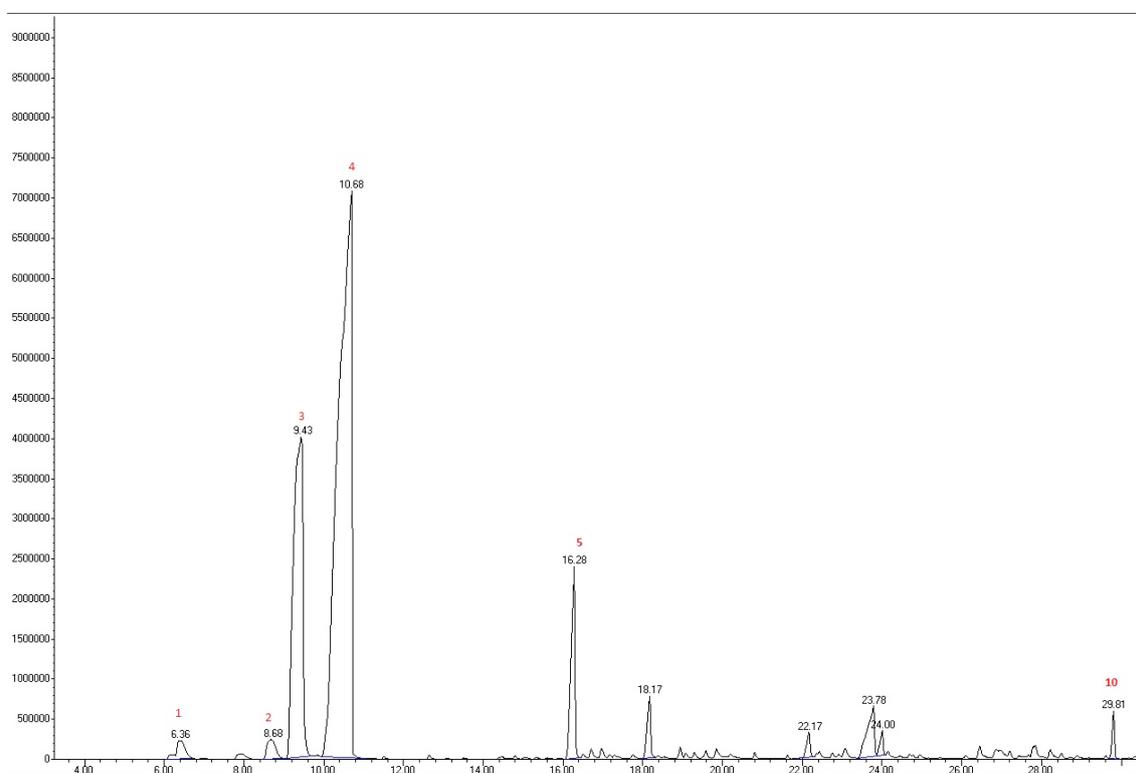


Figura 8. Cromatograma del aceite esencial de Palo Santo mediante (GC-MS).

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

En la tabla 9 se detalla los compuestos principales que forman parte de la composición química del aceite esencial cuyo porcentaje total corresponde un 94,13%. El orden de los compuestos químicos del aceite esencial descritos en la tabla 9 depende de la elución de la columna DB-5MS.

Tabla 9. Compuestos principales identificados del aceite esencial de Palo Santo.

| PICOS | COMPUESTOS | ÍNDICES DE RETENCIÓN | % CANTIDAD RELATIVA |
|-------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | | RI ^a | DB-5MS |
| 1 | α -Pinoeno | 934 | 1,39 |
| 2 | β -Mirreno | 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 |

RI: Índice de retención en la columna no polar (DB-5MS)

a= Componentes ordenados según el orden de detección de la columna DB-5MS

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Los resultados obtenidos en la Tabla 9 coinciden con los del trabajo realizado por Salas M. *et al* 2006 ⁴, por lo que el aceite esencial de esta investigación es adecuado para iniciar el proceso de diseño.

3.1.2. Evaluación de las propiedades organolépticas y físico- químicas.

La tabla 10 muestra los resultados organolépticos y físico-químicos obtenidos al realizar el análisis del aceite esencial de *B. graveolens*, donde se pudo evidenciar claramente que el color, olor, apariencia, densidad e índice de refracción están dentro de las especificaciones establecidas por el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja (U.T.P.L).

Tabla 10. Parámetros organolépticos y físico-químicos del aceite esencial de Palo Santo.

| ANÁLISIS | ESPECIFICACIONES | ANÁLISIS |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Apariencia | Líquido viscoso | Conforme Patrón |
| Color Subjetivo | Incoloro a amarillo translúcido | Conforme Patrón |
| Olor | Cítrico, especiado y amaderado | Conforme Patrón |
| Densidad (g/cm ³) | 0,8300 – 0,8900 | 0,8544 ± 0.0099 |
| Índice de Refracción (nD) | 1,4200 - 1,4900 | 1,4768 ± 0.0001 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Según los resultados obtenidos en los estudios de preformulación, el aceite esencial de Palo Santo presentó condiciones apropiadas para realizar el diseño experimental de Plackett y Burman.

3.2 Estudio de compatibilidad aceite esencial- excipientes

3.2.1. Diseño factorial Plackett y Burman.

En la presente investigación los factores o excipientes empleados en el diseño factorial se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Factores utilizados para el diseño factorial de Plackett y Burman.

| FACTORES | COMPONENTE | NIVEL | CONCENTRACIÓN % |
|----------|----------------------|-------|-----------------|
| A | Alcohol al 96° | + | 62 |
| | Alcohol al 96° | - | 60 |
| B | Alcohol isopropílico | + | 2 |
| | Alcohol isopropílico | - | 1,5 |
| C | Tween 80 | + | 15 |
| | Tween 80 | - | 12 |
| D | Glicerina | + | 3 |
| | Glicerina | - | 0 |
| E | Fragancia | + | 8 |
| | Fragancia | - | 6 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

La matriz de experimentación de Plackett y Burman es obtenida en función del nivel de los factores y la potencia para cada una de las mezclas, descritas en la Tabla 12.

Tabla 12. Matriz “Plackett y Burman”, relacionada con la potencia del principio activo.

| N° DE MEZCLAS | FACTORES (EXCIPIENTES) | | | | | DUMMIES | | POTENCIA |
|---------------|------------------------|----------------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| | Alcohol al 96° | Alcohol isopropílico | Tween 80 | Glicerina | Fragancia | DUMMIE 1 | DUMMIE 2 | |
| 1 | + | - | - | + | - | + | + | 90 |
| 2 | + | + | - | - | + | - | + | 90 |
| 3 | + | + | + | - | - | + | - | 100 |
| 4 | - | + | + | + | - | - | + | 85 |
| 5 | + | - | + | + | + | - | - | 100 |
| 6 | - | + | - | + | + | + | - | 90 |
| 7 | - | - | + | - | + | + | + | 100 |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | 90 |

| | | | | | | | |
|------------------|-------|--------|-------|---------|--------|--------|--------|
| SUMA (+) | 380 | 365 | 385 | 365 | 380 | 380 | 365 |
| SUMA (-) | 365 | 380 | 360 | 290 | 365 | 365 | 380 |
| EFFECTO PROMEDIO | 3,750 | -3,750 | 6,250 | 18,750 | 3,750 | 3,750 | -3,750 |
| | | | | E_d^2 | 14,063 | 14,063 | |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

A través de los datos de la potencia obtenida para cada una de las mezclas se calculó el efecto promedio.

Por lo tanto, para obtener el efecto promedio de A (E_A) lo calculamos sumando y restando las respuestas obtenidas para las distintas mezclas. Los signos vienen marcados por la columna “A” de la matriz:

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

Para la significancia de los efectos se calcula la varianza experimental (S^2_{exp}) y la desviación estándar experimental.

La varianza experimental (S^2_{exp}): varianza de los efectos de los factores “Dummy” (F y G):

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

$$S^2_{exp} = \frac{28,125}{2}$$

$$S^2_{exp} = 14,063$$

Donde E_d representa el efecto de las variables "Dummy" y n es el número de estas variables

La desviación estándar experimental (S): Raíz cuadrada de la varianza experimental. Entonces:

$$S = \sqrt{S^2_{\text{exp}}}$$

$$S = \sqrt{14,063}$$

$$S = 3,75$$

Para cada efecto se calcula su t experimental (t_E) de la siguiente forma:

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

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 "Dummy"

En este caso hay 2 grados de libertad.

Por lo tanto se mira en la tabla de Student el valor de t para 2 grados de libertad y las diferentes probabilidades 90%, 95%, 99% y 99,5%:

| P | t (G.L.=2) |
|------|------------|
| 95 | 9,9249 |
| 97,5 | 4,3026 |
| 99 | 6,9645 |
| 99,5 | 9,9249 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Un factor es significativo, para una determinada probabilidad, si el valor absoluto de "t", calculado para su efecto, es mayor que el valor "t" tabulado. En caso contrario, no será significativo. De tal forma que los valores de t experimental nos permiten darnos cuenta que mientras estos más se alejen de cero, los factores o excipientes utilizados en la matriz influyen de manera directa o indirecta en la potencia del principio activo (aceite esencial de Palo Santo).

Los resultados de la significancia de los efectos en función a su t experimental se detallan en la tabla 13, donde se observa que los factores o excipientes utilizados no

es significativo, es decir, que hay compatibilidad entre excipientes y principio activo, pero sin embargo al analizar la tabla 12 (Matriz de experimentación) donde los factores se encuentran en función a su efecto promedio y potencia, se observa que el factor D (glicerina) se encuentra en un nivel (+) e influye en el porcentaje final de la potencia de las mezclas.

Tabla 13. Significancia de los efectos en función de su respuesta en Matriz “Plackett y Burman”.

| MEZCLA | RES-PUESTA | FACTOR | EFECTO | E _d ² | “t” | SIGNIFICANCIA | | | |
|--------|------------|--------|--------|-----------------------------|--------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | | | 95 | 97,5 | 99 | 99,5 |
| | | | | | | p= 0,05 | p= 0,025 | p= 0,01 | p= 0,005 |
| 1 | 90 | 1 | | | | 2,92 | 4,303 | 6,965 | 9,925 |
| 2 | 90 | A | 3,75 | | 0,267 | * | * | * | * |
| 3 | 100 | B | -3,75 | | -0,267 | * | * | * | * |
| 4 | 85 | C | 6,25 | | 0,444 | * | * | * | * |
| 5 | 100 | D | 18,75 | | 1,333 | * | * | * | * |
| 6 | 90 | E | 3,75 | | 0,267 | * | * | * | * |
| 7 | 100 | F | 3,75 | 14,0625 | 0,267 | * | * | * | * |
| 8 | 90 | G | -3,75 | 14,0625 | -0,267 | * | * | * | * |

(*) No significativo, (**) Significativo

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Es por ello, que la fórmula seleccionada para someterla a estabilidad acelerada debe ser aquella que contenga la glicerina en un nivel (-) y que su potencia final sea del 100%.

Según los resultados de la matriz de experimentación (tabla 12), tenemos dos mezclas que son aptas para estabilidad, la mezcla 3 y 7, debido a que en estas, la glicerina está en un nivel (-) y que su potencia final es del 100%. Por lo tanto cualquiera de las dos mezclas puede ser elegida.

Finalmente la fórmula escogida es la número 7, garantizándonos de esta manera la compatibilidad entre aceite esencial de Palo Santo (*B. graveolens*) y sus excipientes.

3.3 Formulación

3.3.1. Establecimiento de la fórmula.

Una vez culminado y obtenidos los resultados del diseño factorial experimental de Plackett y Burman, la mezcla final seleccionada fue la mezcla número 7 (fórmula 7), que

se muestra en la Tabla 14, debido a su mayor cantidad de potencia y a la compatibilidad entre los excipientes y el principio activo.

Tabla 14. Mezcla final seleccionada de la Matriz “Plackett y Burman”.

| FÓRMULA 7 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 60 |
| Alcohol isopropílico | 1,5 |
| Tween 80 | 15 |
| Fragancia de Manzana | 8 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

La Fórmula 7 fue elaborada en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Departamento de Química (DQ) y utilizada para los estudios de estabilidad acelerada.

3.3.2. Fórmula de composición.

Cada 100 ml de Ambientador líquido contiene:

Principio activo (Aceite esencial *B. graveolens*).....12%
 Excipientes..... c.s.p. 100ml

3.4 Estabilidad del ambientador líquido

3.4.1. Parámetros organolépticos.

Las características organolépticas del ambientador líquido durante la estabilidad se muestran en la tabla 15, donde observamos que parámetros como el olor y aspecto no cambiaron durante los seis meses de estudio, ya que se mantuvo el olor a manzana verde y aspecto líquido. Sin embargo es evidente el cambio de color entre temperaturas al transcurrir los meses, de tal forma que, en el tiempo cero todas presentan un color

verde manzana pero a partir del primer mes hasta finalizar el estudio se origina una variación de color, dando como resultados que para la temperatura ambiente el color sea verde primavera, la de 30 °C sea verde lima y la de 40 °C sea de verde oliva. Para determinar la gama de colores verdes antes indicados se utilizó una carta de colores expuesta en el Anexo 2.

Tabla 15. Parámetros organolépticos del ambientador líquido durante los 6 meses de estabilidad,

| MESES | CONDICIONES | COLOR | OLOR | ASPECTO |
|----------------|-------------|-----------------|---------|---------|
| Tiempo cero | Ambiente | Verde manzana | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde manzana | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde manzana | Manzana | Líquido |
| MES 1 | Ambiente | Verde primavera | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde lima | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde oliva | Manzana | Líquido |
| MES 2 | Ambiente | Verde primavera | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde lima | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde oliva | Manzana | Líquido |
| MES 3 | Ambiente | Verde primavera | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde lima | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde oliva | Manzana | Líquido |
| MES 4 | Ambiente | Verde primavera | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde lima | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde oliva | Manzana | Líquido |
| MES 5 | Ambiente | Verde primavera | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde lima | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde oliva | Manzana | Líquido |
| MES 6 | Ambiente | Verde primavera | Manzana | Líquido |
| | 30 °C | Verde lima | Manzana | Líquido |
| | 40°C | Verde oliva | Manzana | Líquido |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

En cuanto a la variación de color ocurrida durante este estudio, es posible que se deba al efecto de luz, a la degradación térmica o al colorante utilizado sensible a reacciones de degradación (Ordoñez G, 2006).²⁵

3.4.2. Parámetros físico-químicos

En las siguientes tablas se muestran los parámetros físico-químicos del ambientador líquido como el pH, densidad y la concentración del aceite esencial de Palo Santo (*B. graveolens*) durante los 6 meses de estabilidad. Conjuntamente a ello se analizaron los

resultados estadísticamente mediante el programa XLSTAT (ANOVA), aplicando el test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey para efectuar comparaciones múltiples; Así como para determinar diferencias significativas entre los 3 parámetros vs el tiempo.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los parámetros pH, densidad y concentración del principio activo se debe tomar en cuenta que si el valor de F calculado (diferencia estandarizada) es mayor que el F crítico (valor crítico), esto significa que los cambios entre los factores en los ensayos tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los resultados analizados

En la tabla 16 se aprecia una variación del pH entre temperaturas durante los meses de ensayos de estabilidad, de tal forma que, al tiempo cero todas las temperaturas presentan un pH 6 pero al terminar el estudio, la temperatura ambiente presenta un pH de 4,35; la temperatura de 30 °C un pH de 4,53 y la de 40 °C un pH de 4,66. Esto es debido a que el ácido ascórbico presente en la formulación es fácilmente oxidable. Se debe tener en cuenta que dentro de los procesos oxidativos se estarían cediendo protones al medio, lo que podría generar una disminución del pH. Además pudieron haber existido reacciones de degradación del principio activo (Bernal, 2012).²⁶

Tabla 16. Control del pH durante los seis meses de estudio de estabilidad.

| CONDICIONES | MESES | | | | | | |
|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | TIEMPO 0 | MES 1 | MES 2 | MES 3 | MES 4 | MES 5 | MES 6 |
| Ambiente | 6 | 5.6 | 5.22 | 5.05 | 4.60 | 4,58 | 4,35 |
| 30 °C | 6 | 5.5 | 5.18 | 5.00 | 4,86 | 4,68 | 4,54 |
| 40°C | 6 | 5.3 | 5.23 | 5.00 | 4.96 | 4,67 | 4,66 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

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

| Contraste | Diferencia | Diferencia estandarizada | Valor crítico | Significativo |
|-------------------|------------|--------------------------|---------------|---------------|
| 40 °C vs Ambiente | 0,060 | 0,214 | 2,552 | * |
| 40 °C vs 30°C | 0,009 | 0,031 | 2,552 | * |
| 30°C vs Ambiente | 0,051 | 0,183 | 2,552 | * |

(*) No significativo, (**) Significativo

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

En la tabla 18 observamos una ligera variación de densidad durante los seis meses de estabilidad, donde al tiempo cero la densidad es de 0,84 g/ml para todas las temperaturas pero se aprecia que al tercer mes existe una densidad de 0,87 g/ml para la temperatura ambiente; 0,91 g/ml para la temperatura de 30 °C y 0,82 g/ml para la temperatura de 40 °C. Así mismo ocurre al finalizar el estudio ya que existe una densidad de 0,86 g/ml para la temperatura ambiente; 0,85 g/ml para la temperatura de 30 °C y 0,87 g/ml para la

temperatura de 40°C. Esta variación de densidad puede ser debido al alto contenido de etanol en la formulación produciéndose evaporación del mismo y a las condiciones de estrés a las que fueron sometidas (Bernal, 2012).²⁶

Tabla 18. Control de densidad (g/ml) durante los seis meses de estudio de estabilidad.

| CONDICIONES | MESES | | | | | | |
|-----------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | TIEMPO 0 | MES 1 | MES 2 | MES 3 | MES 4 | MES 5 | MES 6 |
| Ambiente | 0,84 | 0,86 | 0,86 | 0,87 | 0,88 | 0,93 | 0,86 |
| 30 °C | 0,84 | 0,86 | 0,86 | 0,91 | 0,94 | 0,81 | 0,85 |
| 40°C | 0,84 | 0,87 | 0,89 | 0,82 | 0,87 | 0,88 | 0,87 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Tabla 19. Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre Densidad vs Tiempo.

| Contraste | Diferencia | Diferencia estandarizada | Valor crítico | Significativo |
|--------------------------|------------|--------------------------|---------------|---------------|
| Ambiente vs 40 °C | 0,009 | 0,573 | 2,552 | * |
| Ambiente vs 30°C | 0,003 | 0,191 | 2,552 | * |
| 30°C vs 40 °C | 0,006 | 0,382 | 2,552 | * |

(*) No significativo, (**) Significativo

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

En la tabla 20 se expone los porcentajes de concentración del aceite esencial de Palo Santo, donde es evidente su disminución durante el ensayo de estabilidad acelerada, ya que en el tiempo cero existe un porcentaje de 95 % del principio activo (p.a.) en todas las temperaturas, en cambio a partir del tercer mes existe una disminución del mismo presentado un porcentaje de 90 % en todas las temperaturas pero ya en el sexto mes es notable la disminución de concentración del p.a. presentando un porcentaje de 60 % tanto para la temperatura de ambiente como para la de 40°C y un porcentaje de 65 % en la de temperatura de 30 °C. Esto se debe a que en condiciones de estrés por temperatura se pueden acelerar reacciones de descomposición de tipo enzimático y de tipo químico, generando diversos compuestos de descomposición más rápidamente (Bernal, 2012).²⁶

Y otro factor que pudo haber influido en la disminución de la concentración del principio activo es el material de acondicionamiento utilizado (PET), que según estudios realizados en la Universidad de Heidelberg en Canadá, afirman que se utiliza un catalizador de antimonio para la fabricación de los envases PET (polietilen tereftalato), lo que podría terminar produciendo una interacción entre el envase y la formulación líquida, es decir, una lixiviación continua de antimonio en el líquido.²⁷

Tabla 20. Resultados del porcentaje de concentración de aceite esencial mediante CG/MS de durante los seis meses de estudio de estabilidad.

| CONDICIONES | MESES | | | | | | |
|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | TIEMPO 0 | MES 1 | MES 2 | MES 3 | MES 4 | MES 5 | MES 6 |
| Ambiente | 95 | 80 | 90 | 90 | 65 | 60 | 60 |
| 30 °C | 95 | 85 | 90 | 90 | 65 | 65 | 65 |
| 40°C | 95 | 85 | 90 | 90 | 60 | 60 | 60 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Tabla 21. Pruebas de comparación múltiple de Tukey (HSD) entre % concentración de aceite vs Tiempo.

| Contraste | Diferencia | Diferencia estandarizada | Valor crítico | Significativo |
|------------------|------------|--------------------------|---------------|---------------|
| 30°C vs 40°C | 2,143 | 0,238 | 2,552 | * |
| 30°C vs Ambiente | 2,143 | 0,238 | 2,552 | * |
| Ambiente vs 40°C | 0,000 | 0,000 | 2,552 | * |

(*) No significativo, (**) Significativo

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Los resultados en las tablas 17,19 y 21 revelan que los parámetros evaluados como, pH, densidad y concentración del principio activo respectivamente, no presentan diferencias significativas al emplear un límite de confianza del 95% porque la F calculada obtenida al analizar los 3 parámetros a distintas temperaturas durante los estudios de estabilidad es menor al valor crítico

3.4.3. Parámetros microbiológicos

En la tabla 22 se detallan los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos para determinar bacterias aerobias mesófilas, hongos, mohos y levaduras, durante el ensayo de estabilidad acelerada del ambientador líquido sometido a distintas condiciones.

Tabla 22. Control microbiológico durante los seis meses de estudio de estabilidad.

| ANÁLISIS | ESPECIFICACIONES USP | CONDICIONES | MESES | | | | | | |
|---------------------------|----------------------|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | TIEMPO 0 | MES 1 | MES 2 | MES 3 | MES 4 | MES 5 | MES 6 |
| Aerobios Mesófilos | Máximo 100 ufc/g | Ambiente | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 30 °C | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 40°C | - | - | - | - | - | - | - |
| Hongos, mohos y levaduras | Máximo 100 ufc/g | Ambiente | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 30 °C | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 40°C | - | - | - | - | - | - | - |

(+) Presencia (-) Ausencia

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Una vez realizado el control microbiológico del ambientador líquido, no se observó

crecimiento bacteriano, ni antifúngico como se muestra en las figuras 9 y 10 garantizando de esta manera la calidad final del producto terminado. También podemos atribuir la inhibición de microorganismos al principio activo del ambientador líquido ya que según Manzano, P. (2009) ⁵, el Palo Santo tiene acción antibacteriana y antifúngica.

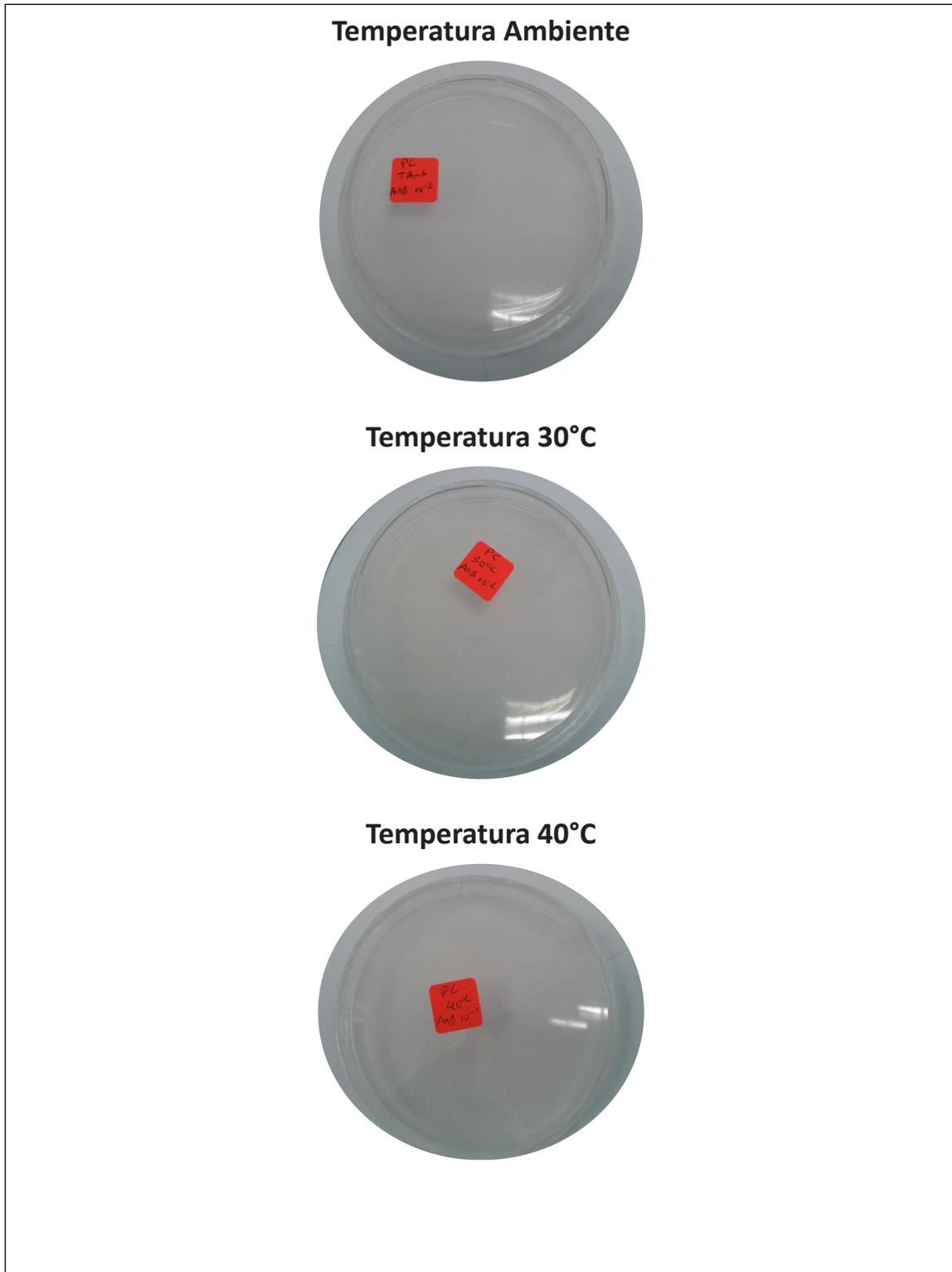
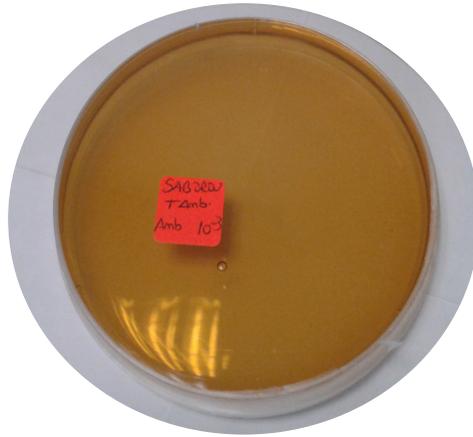


Figura 9. Resultados de los análisis microbiológicos en agar plate count para aerobios mesófilos.

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

Temperatura Ambiente



Temperatura 30°C



Temperatura 40°C



Figura 10. Resultados de los análisis microbiológicos en agar sabouraud para hongos, mohos y levaduras.

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

3.5 Predicción de vida útil del ambientador líquido mediante ecuación de Arrhenius

Luego de obtener los resultados del porcentaje de la concentración del principio activo durante la estabilidad deducimos que no se puede llevar a cabo la Ecuación de Arrhenius debido a que:

- En el primer mes de estabilidad la concentración de principio activo es del 80 % y en cambio en adelante la concentración del p.a. es mayor o igual al 90%.
- Por lo tanto no se puede hacer la predicción de vida útil ya que la ecuación de Arrhenius es un método muy riguroso que debe cumplir con ciertas especificaciones según la Farmacopea de los Estados Unidos, donde establece que la degradación del principio activo debe ser del 10% y en esta investigación existe más del 10% de degradación en el primer mes de estabilidad.

3.6 Estudio complementario

3.6.1. Evaluación sensorial para determinar la duración del aroma del ambientador líquido.

Para este estudio se utilizó la ficha de evaluación (Anexo 3) y los resultados obtenidos se muestran en la figura 11.

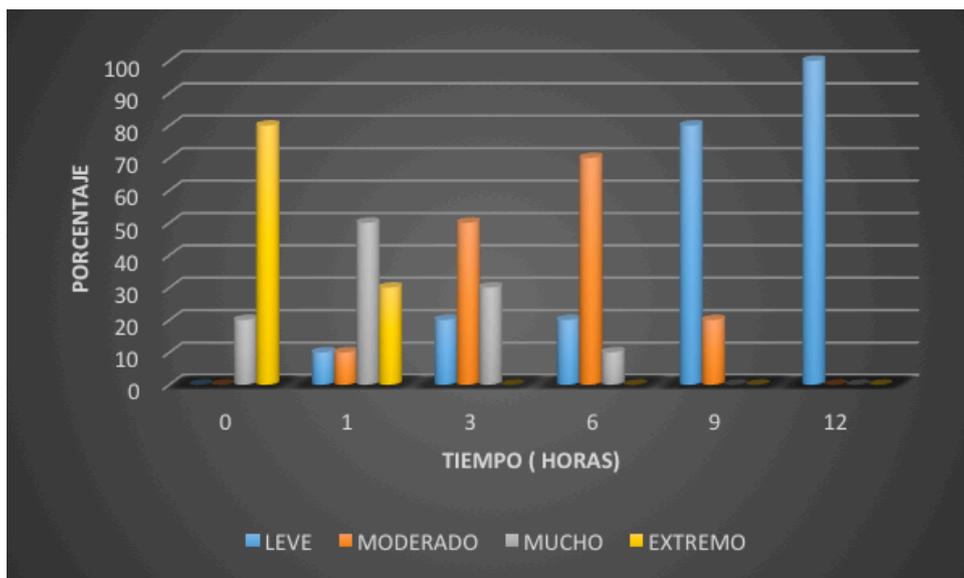


Figura 11. Duración del aroma del producto terminado según la escala de intensidad.

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

En la figura 11, las encuestas establecen que en el tiempo cero el aroma del ambientador líquido según la escala utilizada se encuentra en un 80 % (correspondiente a 8 personas) en una intensidad extrema y mucho en un 20 % (correspondiente a dos personas). A las tres horas el tiempo de duración del aroma para desodorizar ambientes según las personas encuestadas es moderado en un 50% (correspondiente a 5 personas) mientras que el resto afirma que el aroma esta entre mucho (30 %) y leve (20 %). Entre el 80 al 100% (correspondiente de 8 a 10 personas) de las personas encuestadas opinan que la duración del aroma es leve entre las 9 y 12 horas.

CONCLUSIONES.

- En la valoración del aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*) 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%)
- Según los resultados del diseño factorial de Plackett y Burman la mezcla más estable que posterior fue sometida a estabilidad es la fórmula 7, donde se encuentra el factor D (glicerina), en un nivel (-) porque este factor influye directamente en el porcentaje final de la potencia del principio activo.
- Durante los meses de estudio de estabilidad acelerada que incluyen parámetros organolépticos y físicos- químicos, es evidente una variación en cuanto al color, pH, densidad y una disminución del porcentaje de concentración del principio activo a partir de cuarto mes.
- Después de la utilización de los métodos de control microbiológico para el recuento total de Mesófilos aerobios, mohos, hongos y levaduras, no se observó ningún tipo de crecimiento microbiológico en el producto terminado (ambientador líquido), por lo tanto esto indica el correcto uso de buenas prácticas de manufactura durante todo el estudio y que el ambientador líquido cumple con las especificaciones establecidas en la USP.
- Al terminar el estudio de estabilidad acelerada se decidió no aplicar la ecuación de Arrhenius debido a que existió una degradación del principio activo (aceite esencial de *Bursera graveolens*) superior al 10 %.

RECOMENDACIONES:

- Realizar los estudios de estabilidad del ambientador líquido con otros tipos de envase, con la finalidad de asegurar la completa estabilidad del producto elaborado.
- Para garantizar que el producto sea de calidad se recomienda cumplir con buenas prácticas de manufactura, así como realizar los controles microbiológicos establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos (USP).
- Realizar estudios de estabilidad acelerada para la predicción de vida útil del producto.
- Se sugiere diseñar y elaborar nuevas formas farmacéuticas utilizando no solo el aceite esencial de Palo Santo (*Bursera Graveolens*) sino incluyendo otros tipos de aceites esenciales con el fin de potenciar su efecto.
- Además del diseño factorial de Placket y Burman se debe incluir otro tipo de diseño como el SPSS, con la finalidad de lograr mejores resultados al momento de seleccionar la fórmula que será sometida a estabilidad acelerada.

ANEXOS

ANEXO 1

Mezclas generadas a partir de la matriz de experimentación

| FÓRMULA 1 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 62 |
| Alcohol isopropílico | 1,5 |
| Tween 80 | 12 |
| Glicerina | 3 |
| Fragancia de Manzana | 6 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 3 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 62 |
| Alcohol isopropílico | 2 |
| Tween 80 | 15 |
| Glicerina | 0 |
| Fragancia de Manzana | 6 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 2 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 62 |
| Alcohol isopropílico | 2 |
| Tween 80 | 12 |
| Glicerina | 0 |
| Fragancia de Manzana | 8 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 4 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 60 |
| Alcohol isopropílico | 2 |
| Tween 80 | 15 |
| Glicerina | 3 |
| Fragancia de Manzana | 6 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 5 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 62 |
| Alcohol isopropílico | 1,5 |
| Tween 80 | 15 |
| Glicerina | 3 |
| Fragancia de Manzana | 6 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 7 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 60 |
| Alcohol isopropílico | 1,5 |
| Tween 80 | 15 |
| Glicerina | 0 |
| Fragancia de Manzana | 8 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 6 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 60 |
| Alcohol isopropílico | 2 |
| Tween 80 | 12 |
| Glicerina | 3 |
| Fragancia de Manzana | 8 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

| FÓRMULA 8 | |
|----------------------|---------|
| Componentes | % (p/v) |
| Aceite | 12 |
| Alcohol al 96° | 60 |
| Alcohol isopropílico | 1,5 |
| Tween 80 | 12 |
| Glicerina | 3 |
| Fragancia de Manzana | 6 |
| Metilparabeno | 0,18 |
| Propilparabeno | 0,02 |
| Ácido ascórbico | 0,1 |
| Ácido cítrico | 0,02 |
| Colorante 0,01 % | 2 |

Elaboración: Jaramillo, P. (2014)

ANEXO 2

Referencia de gamma de verdes del ambientador líquido sometido a estabilidad

| | GAMMA DE VERDES |
|-----------------|--|
| Verde primavera |  |
| Verde oliva |  |
| Verde lima |  |

Fuente: WEBUSABLE. Carta de colores. Datos disponibles en Junio del 2014:
<http://www.webusable.com/coloursChart.htm>

ANEXO 3

Ficha de evaluación

FECHA:

INDICACIONES:

Usted ayudará a evaluar la duración del aroma del ambientador líquido a base de Palo Santo (*Bursera graveolens*), según la siguiente escala:

| | Escala de intensidad |
|---|----------------------|
| 1 | Leve |
| 2 | Moderado |
| 3 | Mucho |
| 4 | Extremo |

Para esto usted deberá pulverizar oprimiendo con el spray en el ambiente.

En el momento en que lo coloca es el tiempo cero, luego realizará la evaluación de duración del aroma durante 1, 3,6 ,9 y 12 horas.

| TIEMPO (horas) | ESCALA DE INTENSIDAD | | | |
|--------------------|----------------------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | | | | |
| 1 | | | | |
| 3 | | | | |
| 6 | | | | |
| 9 | | | | |
| 12 | | | | |

BIBLIOGRAFÍA

1. Salcedo, A. (2010). "Elaboración de ambientadores, taller de elaboración de productos industriales". Datos disponibles en agosto del 2013. [http:// www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/)
2. Ambientador. (s.f.). Recuperado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Ambientador>
3. Vacacela, M. (2012). *Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie Palo santo (Bursera graveolens)*. Tesis (Bioquímico-Farmacéutico). Loja, Ecuador, Universidad Técnica Particular de Loja. 32p.
4. Salas, M. y 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*. Loja- Ecuador.
5. Manzano, P. (2009). "Potencial fitofármaco de bursera graveolens sp (Palo Santo), del bosque seco tropical, península de Santa Elena, provincia del Guayas". Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales. Escuela Superior Politécnica del litoral (ESPOL); Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral. Pág. 6
6. Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Recuperado del sitio Web de la Facultad Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, de: [http:// farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf](http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf).
7. Ambientador, Principios básicos, Ingredientes, Toxicidad, El mantenimiento de la calidad del aire, Historia. (s.f.). Recuperado de http://centrodeartigos.com/articulos-para-saber-mas/article_43017.html
8. Ortuño, M. (2006). "Manual práctico de aceites esenciales aromas y perfumes".
9. Jardín Botánico Reinado Espinoza. UNL. *Árboles nativos de la provincia de Loja*, Loja, 1992; pp 32-33
10. Tropicos. (2014). *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/4700223?tab=synonyms>
11. Manzano, L.; Miranda, M.; Gutiérrez, Y.; García, G.; Orellana, T.; Orellana, A. *Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de B. graveolens Triana & Planch. (Palo santo) de Ecuador*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 2009; 14,45-53
12. 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)
13. Restrepo, A., Guerrero, F., Lozano, F., Ramírez J. (2008). *Elaboración de un ambientador desinfectante*. Institución Educativa Integrado Carrasquilla industrial. Ciencias. Quibdó – Chocó. Pag. 11
14. Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica. Registro Oficial No. 486. Órgano del Gobierno del Ecuador. 19 de Julio de 1994

15. SENA. *Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas*. Datos disponibles en Mayo del 2014: http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21_1/alephe/www_f_spa/icon/53722/index.html#
16. ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y tecnología médica. *Farmacopea Argentina*. Datos disponibles en Mayo del 2014: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava_edicion/Primer_Volumen.pdf
17. Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-NF. Vol 1. Compendios de Normas Oficiales
18. Sellés, E. *Estabilidad del Medicamento*. En tratado de farmacia galénica; Faulí, T. C., Eds.; Copyright: Madrid, 2000; Vol.1, pp 59-61.
19. 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.
20. 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>
21. 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.
22. Manual de Procesos, Palo Santo (*Bursera graveolens*), Área Aceites Esenciales, Instituto de Química Aplicada, UTPL
23. Torres, K. (2012). *Diseño y desarrollo de una crema repelente a partir del aceite esencial de la especie Bursera graveolens (Palo Santo)*. Tesis (Bioquímico-Farmacéutico). Loja, Ecuador, Universidad Técnica Particular de Loja. 26 p.
24. Sancho, J., Bota E., Castro J. (2002) . *Introducción al análisis sensorial de alimentos*. Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona- España. Pag 127.
25. Ordoñez, G. (2006). *Evaluación de la degradación de colorantes, asociado a candelas de Mezcla de parafina, por exposición de la luz ultravioleta y luz blanca visible a una temperatura constante*. Tesis (Ingeniero Químico). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 29p.
26. Bernal, C. (2012). *Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de Physalis peruviana L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico*. Tesis (Magister en Ciencias Farmacéuticas). Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 68p.
27. UVA. Universidad de Valladolid. *Peligros de la producción del PET*. Datos publicados en julio del 2014: http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/pet/peligros_produccion.htm