UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Uso de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido.

TRABAJO DE FÍN DE TITULACIÓN

AUTORA: Silva Carrera, Madeleine Katherine

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph. D.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph.D.
Benito Eduardo Valarezo Valdez

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FÍN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fín de titulación: **“Uso de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido”** realizado por: Silva Carrera Madeleine Katherine; ha sido orientado y revisado durante su ejecución por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2015

f) ……

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

"Yo, **Silva Carrera Madeleine Katherine** declaro ser autora del presente trabajo de fín de titulación: "Uso de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido", de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez 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. 88 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) ……
Silva Carrera Madeleine Katherine
1104906688

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi tía Marlene, a quien quiero como a una madre por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi mami Mónica que a pesar de nuestra distancia física siempre ha estado ahí cuando la he necesitado porque ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles, es por eso que ambas significan mucho para mí, por siempre estar conmigo y por enseñarme a crecer personalmente.

A Daniela y Micaela porque las amo infinitamente hermanitas, que no importa los obstáculos que se nos presenten porque lo superaremos uno a uno siempre mirando hacia adelante, por creer en mí y por su apoyo a lo largo de mi carrera.

A mis primas Salomé, Mabel y primos Sebastián, Juan Pablo y familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Madeleine Silva

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi mami Mónica que más que una buena madre ha sido mi mejor amiga, me ha consentido y apoyado en lo que me he propuesto. A mi tía Marlene la que siempre ha estado ahí y me ha criado casi toda mi vida, que me ha dado su confianza y su amor eternamente. Ustedes mis madres son lo más bello que Dios ha puesto en mi camino y por quienes estoy inmensamente agradecida.

Mi agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja que a través de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, Departamento de Química y Laboratorio de Química, me brindaron todos los medios tecnológicos y los saberes científicos para la elaboración de este trabajo de investigación.

Del mismo modo quiero agradecer a mis amigas con las que he tenido la suerte de encontrarme a lo largo de mi vida, especialmente aquellos que los hice en la etapa colegial y universitaria: Alejandra, Salomé, Ivanova, Paola R, Gabriela, Fernanda, Lisbeth, Paola F. por los agradables momentos que compartimos y me brindaron su apoyo durante este trayecto.

Al Ph. D Eduardo Valarezo, director de tesis, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a sus conocimientos y experiencia en un ambiente de confianza.

Madeleine Silva

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA…… i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN……..…… ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS…… iii
DEDICATORÍA…….. iv
AGRADECIMIENTO……..... v
INDICE DE CONTENIDOS…… vi
INDICE DE TABLAS…… ix
INDICE DE FIGURAS…….. x
RESUMEN…….. 1
ABSTRACT…… 2
INTRODUCCIÓN…… 3
HIPÓTESIS…….. 4
CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO……..……..... 5
1.1. Antecedentes históricos de los detergentes…….. 6
1.1.1. Definición...……... 7
1.1.2. Detergencia…….. 7
1.1.3. Clasificación química de los detergentes…… 8
1.1.3.1. Detergentes alcalinos……..…….. 8
1.1.3.2. Detergentes ácidos……..……. 8
1.1.4. Clasificación ecológica de los detergentes...……..…….. 9
1.1.4.1. Detergentes blandos……..... 9
1.1.4.2. Detergentes duros……..…….. 9
1.1.4.3. Detergentes biodegradables……..…… 9
1.1.5. Características del detergente líquido…….. 10
1.1.6. Propiedades del detergente…… 10
1.1.7. Espumaciones…….. 11
1.1.8. Composición del detergente……... 11
1.2. Control de calidad……..…….. 13
1.2.1. Pruebas de control de calidad...……. 13
1.2.2. Pruebas microbiológicas……..…… 13
1.3. Aceites esenciales…….……... 13

1.3.1. Obtención de los aceites esenciales…….…..……. 14
1.3.2. Clasificación……...…….. 14
1.3.3. Caracterización de los aceites esenciales……... 14
1.3.4. Propiedades de los aceites esenciales……. 15
1.3.5. Aplicaciones y uso de aceites esenciales….……... 16
1.3.6. Detergente líquido y aceites esenciales……...……... 16
1.4. Especies aromáticas…… 16
1.4.1. Especie *B. graveolens* (Palo santo)……..……. 17
1.4.1.1. Clasificación taxonómica…… 17
1.4.1.2. Descripción botánica……..……... 17
1.4.1.3. Sinónimos…….……. 18
1.4.1.4. Hábitat……...……. 18
1.4.1.5. Parte utilizada……..…….…… 18
1.4.1.6. Usos……..……... 18
1.4.2. Especie *C. citratus* (hierba luisa)……...……. 19
1.4.2.1. Clasificación taxonómica…….……. 19
1.4.2.2. Descripción botánica……. 19
1.4.2.3. Sinónimos…… 20
1.4.2.4. Hábitat……. 20
1.4.2.5. Parte utilizada……. 20
1.4.2.6. Usos……... 20
1.5. Formulaciones en base al aceite de *B. graveolens* y *C. citratus*…… 20
CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS……. 21
2.1. Selección de los aceites esenciales……... 22
2.1.1. Recolección de la materia vegetal……..…….. 22
2.1.2. Extracción del aceite esencial de *C. citratus*……...…… 22
2.2. Estudios de preformulación….……. 23
2.2.1. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales….…… 23
2.2.1.1. Determinación de la densidad relativa…….. 23
2.2.1.2. Determinación del Índice de refracción…… 24
2.2.1.3. Solubilidad…… 24
2.2.1.4. Determinación de la composición química de los aceites……. 25

2.3. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y *Bursera graveolens*…….. 26
2.4. Estudios de formulación…….. 26
2.4.1. Proceso general de fabricación de soluciones líquidas…….. 26
2.4.2. Diagrama de elaboración del detergente líquido…….. 27
2.5. Desarrollo de la optimización de la formulación…….. 29
2.6. Ensayos organolépticos y físico-químicos de la fórmula detergente…… 30
2.7. Estudio de la actividad antimicrobiana de la fórmula detergente…… 30
CAPÍTULO III
RESULTADO Y DISCUSIÓN…….. 32
3.1. Combinación de los aceites esenciales para el detergente…… 33
3.2. Evaluación de las propiedades organolépticas y físico-químicas de los aceites esenciales……... 33
3.3. Composición química de los aceites esenciales de *B. graveolens* y *C. citratus*…. 34
3.4. Actividad biológica de los aceites esenciales…… 35
3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana…… 35
3.4.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica…….. 37
3.5. Optimización de la formulación para la elaboración del detergente líquido……. 38
3.6. Formulación del detergente líquido……. 44
3.6.1. Establecimiento de la fórmula……... 44
3.7. Parámetros de la fórmula detergente……. 44
3.7.1 Parámetros organolépticos y físico-químicos de la fórmula detergente……..… 44
3.8. Actividad antimicrobiana de la fórmula detergente…….……. 45
CONCLUSIONES…….. 47
RECOMENDACIONES……..…….. 48
BIBLIOGRAFÍA……..……. 49
ANEXOS…….…… 52
Anexo 1. Determinación de densidad relativa…….. 53
Anexo 2. Determinación del índice de refracción……. 55
Anexo 3. Determinación de la actividad microbiológica de los aceites esenciales……. 57
Anexo 4. Pruebas experimentales para la optimización de la fórmula detergente……. 61
Anexo 5. Tabla de Fischer……. 62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de la especie *B. graveolens*……..……..... 17
Tabla 2. Descripción taxonómica de la especie *C. citratus*…….. 19
Tabla 3. Concentraciones de la mezcla de aceite hierba luisa-palo santo…….. 22
Tabla 4. Solubilidad en términos descriptivos…….. 25
Tabla 5. Formulación base del detergente líquido……..... 27
Tabla 6. Criterios de aceptabilidad del detergente…….. 29
Tabla 7. Ensayos evaluados de la fórmula detergente……... 30
Tabla 8.Parametros organolépticos y físico-químicos del aceite esencial de palo santo y hierba luisa…… 33
Tabla 9. Composición química del aceite esencial extraído del fruto de (*B. graveolens*) y aceite esencial extraído de las hojas (*C. citratus*) por CG-MS……. 34
Tabla 10. CMI de los aceites esenciales de *B. graveolens* y *C. citratus*……..……. 36
Tabla 11. CMI de los aceites esenciales de *B. graveolens* y C. citratus…….. 37
Tabla 12. Factores a evaluar para la optimización de la formulación del detergente……. 38
Tabla 13. Parámetros de evaluación del detergente líquido con sus resultados…… 39
Tabla 14. Análisis de varianza ANOVA para los factores a evaluar…….. 40
Tabla 15. Fórmula seleccionada para la elaboración del detergente……... 44
Tabla 16. Resultados del análisis organoléptico y físico-químico de la fórmula detergente…. 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición de los detergentes…….. 9
Figura 2. Clasificación de los aceites esenciales…… 14
Figura 3. Árbol de Palo santo……. 17
Figura 4. Planta de Hierba luisa…… 19
Figura 5. Destilador para extraer el aceite esencial de la materia vegetal…..……. 23
Figura 6. Determinación de la densidad……... 24
Figura 7. Lectura del índice de refracción…… 24
Figura 8. Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N……. 25
Figura 9. Muestra del aceite diluido en diclorometano…….. 26
Figura 10. Proceso general de elaboración de soluciones líquidas……..… 26
Figura 11. Diagrama de elaboración del detergente líquido…….. 28
Figura 12. Hisopado de los pisos…….. 30
Figura 13. Gráfica de probabilidad normal de los efectos…….. 40
Figura 14. Gráfica del factor principal……... 43
Figura 15. Gráfica de cubos……... 43
Figura 16. Análisis microbiológicos de los medios de cultivo.....…….. 45

RESUMEN

El presente estudio está encaminado a generar alternativas de aplicabilidad de aceites esenciales naturales como aromatizantes en el diseño y desarrollo para la formulación de un detergente líquido. Para esta investigación se efectuó diversas combinaciones de aceites esenciales de las cuales resultó la combinación más idónea la del aceite extraído del fruto de *Bursera graveolens* (Palo santo) al 4% y de las hojas de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) al 6%. Se realizaron estudios de preformulación como valorización de los aceites mediante CG-MS. La actividad biológica de los aceites fue evaluada por el método de microdilución en caldo expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se optimizó la formulación del detergente utilizando una mezcla entre el aceite de palo santo/hierba luisa al 10%, y para responder los requerimientos como baja consistencia espumosa, pH ácido y aroma agradable se emplearon el ácido dodecilbenceno sulfónico (5.5%) y ácido cítrico (0,05%), otorgando así una aceptabilidad del 100%.

PALABRAS CLAVES: Palo santo, *Bursera graveolens*, Hierba luisa, *Cymbopogon citratus*, CMI, detergente líquido, CG-MS.

ABSTRACT

The aim of the present study was development applicability alternatives by essentials oils, which will be used as a flavoring in the formulation of a liquid detergent. In this research were selected several combinations of essentials oils and the most accepted combination was between *Bursera graveolens* (Palo santo) 4% and *Cymbopogon citratus* (lemongrass) 6% oils. The chemical composition of the essential oil was determined by GC-MS. The biological activity was evaluated by the broth microdilution method and was expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC). The detergent formulation was optimized using a mix between palo santo/hierba luisa essentials oils (10%) and by responding to requirements such as low foam, acid pH and pleasant smell was employ dodecilbenceno sulphonyl acid (5.5%) and citric acid (0.05%) obtaining thus 100% of acceptability.

KEYWORDS: Palo Santo, *Bursera graveolens*, Hierba Luisa, *Cymbopogon citratus*, liquid detergent, MIC, GC/MS.

INTRODUCCIÓN

Actualmente en la industria farmacéutica se desarrolla la calidad de los productos de tal manera que cumplan con las características esperadas para satisfacer las necesidades al consumidor proporcionando seguridad y eficacia. Es por eso que el presente trabajo de fin de titulación (TFT) está orientado al diseño y desarrollo de un producto innovador y a la vez contribuir con la sanitización de espacios públicos, domésticos mediante la elaboración de una fórmula para un detergente líquido cuyo concepto lo define como una mezcla acuosa que posea en su composición un efecto de limpieza sobre las superficies a las cuales se aplique, con el uso de aceites esenciales, los mismos que serán incorporados proporcionando un aroma agradable y delicado.

En la presente investigación, se desarrolla en 3 capítulos, en el primer capítulo se expone el marco teórico que trata sobre el estado del arte, en el segundo capítulo se da a conocer los materiales y métodos empleados para conseguir la optimización de la formulación del detergente y en el capítulo tres se expone y analiza los resultados obtenidos durante la formulación del detergente. Finalmente, se exponen las conclusiones del estudio y las recomendaciones que han surgido del desarrollo de este proyecto.

Una de las actividades de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) es la ejecución de proyectos que estén vinculados a la sociedad, con el fin de contribuir con conocimiento y desarrollo de la misma. Es así, como se intenta aportar con la implementación de un diseño de formulación encaminado a elaborar un detergente líquido formulado con el uso de aceites esenciales naturales como aromatizantes. El objetivo general de esta investigación fue la utilización de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido y los objetivos específicos son:

- Determinar la mejor fragancia utilizando dos aceites esenciales.
- Optimizar una formulación para el desarrollo del detergente líquido que en su formulación contenga aceites esenciales.

Por tales razones, el presente trabajo investigativo tuvo como base el aprovechamiento de aceites esenciales que servirán para diseñar una formulación de un detergente líquido, con el fin de establecer un precedente con miras a desarrollar un producto seguro y eficaz.

HIPÓTESIS

Considerando que en la calidad de los productos de limpieza, se evalúan tres aspectos importantes fundamentales y de forma simultánea en el detergente: **la consistencia, pH ácido y aroma**, se plantea las hipótesis que se detallan a continuación:

Ho: El ácido dodecilbenceno sulfónico **no influye** en la variación de la calidad del detergente.
H1: El ácido dodecilbenceno sulfónico **influye** en la variación de la calidad del detergente.

Ho: EL pH **no influye** en la variación de la calidad del detergente.
H1: El pH **influye** en la variación de la calidad del detergente.

Ho: El aceite esencial **no influye** en la calidad del detergente.
H1: El aceite esencial **influye** en la calidad del detergente.

Ho: La interacción entre el ácido dodecilbenceno sulfónico, ácido cítrico y el aceite esencial **no influyen** en la calidad del detergente.
H1: La interacción entre el ácido dodecilbenceno sulfónico, ácido cítrico y el aceite esencial **influyen** en la calidad del detergente.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes históricos de los detergentes.

El primer agente limpiador fabricado por el hombre fue el jabón. La importancia del jabón para el lavado y limpieza general no fue reconocida hasta el siglo II de nuestra era, por el médico griego Galeno, que recomendaba su uso no solo por la capacidad de limpieza del cuerpo y ropas, sino también por sus efectos curativos (Dorado, 1996).

La industria del jabón y detergente ha tenido gran cambio en los últimos años, que obliga a responder de mejor modo a las preferencias de los consumidores, las peticiones de la sostenibilidad, la disponibilidad, el coste de las materias primas y energía (Dorado, 1996).

En 1907 se elabora el primer detergente formulado con sulfatos de alcoholes grasos siendo introducido al mercado con otros compuestos semejantes de mayor volumen de producción por lo que aparecieron los alquibencenos sulfonatos y más específicamente el tetrapropilbenceno sulfonato que satisfacía el 65% de la demanda de detergentes en el mercado mundial (Jakobi & Lohr, 1987).

En 1917, descubrieron una clase de substancias equiparables a los jabones, capaces de acumularse en las superficies conocidas como tensioactivos. Sin embargo, numerosas investigaciones mostraron que la biodegradación de los tensioactivos se hacía muy lenta y como consecuencia los ríos y lagos empezaban a exhibir espumas persistentes, por lo que la industria de los detergentes desarrollo procesos de producción de alquilatos lineales que conducen a los llamados las biodegradables (Jakobi & Lohr, 1987).

Tras la segunda guerra mundial, también se introdujeron nuevos componentes al detergente que ayudaron a aumentar la eficacia del lavado, como fueron las enzimas, los controladores de espuma, los agentes antirredeposición y los activadores de blanqueo.

La tecnología de los detergentes creció paralela a la de las máquinas de lavar y de los tipos de sustratos, cuyo desarrollo exigió una potenciación de las propiedades de los detergentes. Los sustratos varían ampliamente en composición química y estructura superficial, pudiendo pertenecer a la clase de las superficies duras (vidrios, cerámicas, metales, etc.), tejidos y materiales fibrosos (Bailon, 2003).

Hoy en día los detergentes están basados en la incorporación de coadyuvantes que además exige al detergente una serie de requisitos tales como: desarrollo de su función en corto tiempo, acción a bajas temperaturas, baja toxicidad, biodegradabilidad, baja irritabilidad de la piel, buen precio, etc. (Dominguez, 1986).

En la actualidad suscitan gran preocupación los aspectos relativos a la seguridad, sanidad e impacto medioambiental de las formulaciones detergentes siendo un requisito imprescindible que los componentes sean fácilmente degradados en condiciones naturales. En este sentido, se considera que los tensioactivos son biodegradables si existe un nivel mínimo de degradación del 80% cuando se emplea el ensayo continuo (Wilhelm & Fisher, 1987).

1.1.1. Definición.

Un detergente es un producto formado por una o varios tensioactivos y una serie de componentes que complementa la acción tales como aditivos de superficie activa, coadyuvantes y auxiliares, desarrollados con el fin de reducir la tensión superficial además de producir una limpieza eficiente, que ejerce un efecto de protección sobre las superficies a las cuales se aplica, proporcionando al objeto lavado una serie de características deseadas en cuanto al olor, color, etc. (Swaco, 2004).

1.1.2. Detergencia.

Se conoce bajo el término de detergencia al proceso de eliminación de las sustancias indeseadas adheridas a objetos o a la piel de los seres vivos. El efecto de limpieza que se logra mediante la aplicación de un detergente no se debe tan solo a la acción del tensioactivo, sino a la adecuada combinación de distintos efectos que actúan sinérgicamente sobre el sustrato sucio (Dominguez, 1986).

Tres son los elementos esenciales que intervienen en un proceso detersivo típico (Wildebrett, 2000).

- El sustrato: material solido que se debe limpiar.
- La suciedad: materias extrañas a eliminar de la superficie del sustrato.
- El baño de lavado: medio líquido que actúa sobre el sustrato para eliminar la suciedad.

De acuerdo con Dominguez (1986), debido a las casi infinitas posibilidades de variación que se pueden plantear con los elementos sustrato-suciedad-baño lavado, los mecanismos de detergencia no son los únicos, sin embargo también existen distintas grasas, tintas que constituyen formas clásicas de suciedad. Con relación al baño del lavado, se diferencian dos componentes fundamentales: el agua (ingrediente mayoritario) y los ingredientes de la formulación detergente. El agua ocupa un papel importante en el proceso detersivo, ya que actúa como disolvente para el detergente y para las sales contenida en la suciedad (Dominguez, 1986).

Por otro lado, la dureza del agua puede llevar a la formación de sales insolubles con los componentes del detergente, impidiendo que cumplan su función. Los tensioactivos facilitan la eliminación de la suciedad adherida al sustrato a través de distintos mecanismos (Carroll, 1993).

La acción del baño de lavado no solamente se limita a la eliminación de la suciedad adherida a la superficie del sustrato: sino que también estabiliza la suciedad suspendida en el baño para que no vuelva a depositarse sobre las superficies.

1.1.3. Clasificación química de los detergentes.

La naturaleza del trabajo y la limpieza a efectuarse deben servir como guía para la elección del agente limpiador que se debe utilizar.

1.1.3.1. Detergentes alcalinos.

Estos son los más comúnmente utilizados en la industria. La alta alcalinidad de estos detergentes ayuda a abrir la fibra, permitiendo una mejor humectación de la misma, además saponifica las grasas y las hace fácilmente solubles en el medio acuoso, permitiendo de esta manera la remoción de manchas difíciles.

El uso de este tipo de detergente permite una limpieza rápida acción combinada con un desinfectante, su acción puede ser mejorada mediante la adición de otros surfactantes como agentes secuestrantes o inhibidores de corrosión como: silicatos.

1.1.3.2. Detergentes ácidos.

Se considera una excelente práctica sanitaria en la limpieza de tanques de almacenamiento, clarificadores, tanques de pesaje y otros equipos y utensilios. El uso de limpiadores ácidos, alternados con soluciones alcalinas logra la eliminación de olores indeseables y disminución de la cuenta microbiana (Seoanez, 1996).

Los ácidos que se usan con más frecuencia como limpiadores generales son: Ácido glucónico, ácido sulfónico.

Un detergente debe estar cualificado para obtener una limpieza eficaz. La composición química influirá directamente en la elección del detergente (figura 1).

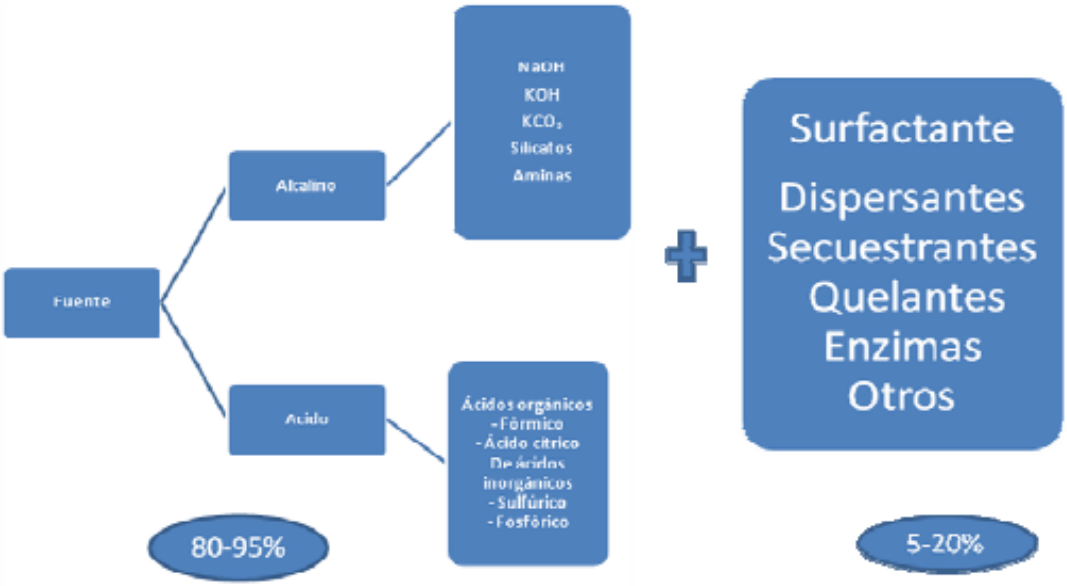


Figura 1. Composición de los detergentes
Fuente:(Kluger, 1981)

1.1.4. Clasificación ecológica de los detergentes.

1.1.4.1. Detergentes blandos.

Llamados detergentes biodegradables ya que se degradan mucho más rápido, eso quiere decir que son biológicamente suaves. Estos detergentes fueron introducidos en reemplazo a los detergentes duros, ya que tienen menor incidencia ambiental sobre las aguas, lo componen los aquilbencenos de cadena lineal o recta; los materiales duros basados en el propileno tetrámero han sido ya reemplazados por los ABS (aquilbencenosulfonatos) suaves en la mayoría de los mercados mundiales (Dominguez, 1986).

1.1.4.2. Detergentes duros.

Llamados detergentes no biodegradables ya que no son descompuestos fácilmente por la acción bacteriana, lo que quiere decir que tienen una lenta degradación biológica, debido al grupo alquilo altamente ramificado, basado en el propileno tetrámero. Esto quiere decir que una significativa proporción de ABS (alquibencenosulfonatos) sódico que va a los desagües domésticos sobrevive al tratamiento de aguas residuales y en los ríos, un ejemplo de esos detergentes son los aquilbencenosulfonatos de cadena ramificada.

1.1.4.3. Detergentes biodegradables.

Los detergentes biodegradables son los que se descomponen o desintegran a productos inocuos más o menos rápidamente por la acción de los microorganismos, generalmente aerobios y

anaerobios. La biodegradabilidad de los detergentes depende de su estructura química, que generalmente lo compone el tensioactivo (Dominguez, 1986).

1.1.5. Características del detergente líquido.

Los detergentes líquidos presentan las siguientes características:

- Mantener la integridad de las superficies.
- Toxicidad: un detergente debe ser el menos tóxico posible para el personal sino también más ecológico posible.
- Tienen una parte afín a las grasas.
- Acción humectante.
- Fácil eliminación.
- Capaces de eliminar manchas.
- Excelente propiedad de enjuague.
- Tienen olor o se agregan esencias que no los hagan desagradables.

Los detergentes tienen la ventaja, sobre los jabones, de formar sales de calcio y de magnesio solubles en agua, por lo que no forman coágulos al usarlos con aguas duras. Además como el ácido correspondiente de los sulfatos ácidos de alquilo es fuerte, sus sales (detergentes) son neutras en agua. Los detergentes sintéticos contienen sustancias surfactantes que ayudan en la penetración, remojo, emulsificación, dispersión, solubilizacion y formación de espuma. La mayoría de los detergentes sintéticos son contaminantes persistentes debido a que no son descompuestos fácilmente por la acción bacteriana (Seoanez, 1996).

1.1.6. Propiedades del detergente.

Según Bailon (2003), la eficiencia de un tensioactivo posee propiedades que radican en el comportamiento de las moléculas por lo que las más importantes de un detergente son:

- Humectación: capacidad de mojar más, es decir una misma gota de agua es capaz de abarcar una mayor cantidad de superficie de contacto.
- Penetración: capacidad de penetrar o introducirse en las superficies porosas sucias o en la suciedad.
- Emulsión: es la dispersión o suspensión de finas partículas de uno o más líquidos en otro líquido.
- Suspensión: consiste en dejar la suciedad o partículas de suciedad en solución evitando que estas se vuelvan a depositar.

1.1.7. Espumaciones.

El agua pura no forma espuma estable cuando es sometida a agitación, el aire que se introduce en ella se escapa rápidamente, sin embargo, si alguna contiene ciertos tensoactivos disueltos o dispersos, el aire introducido en ella no saldrá tan fácil por lo que dará lugar a la formación de espuma, definido como un sistema heterogéneo formado por un gas disperso en el líquido. Existen agentes que promueven la formación de espuma y otros que controlan o inhiben totalmente la espuma que pueden ser solubles o insolubles en el líquido. Sus principales características son baja volatilidad, alto punto de ebullición, poder de difusión, facilidad de dispersión y atracción superficial (Salager, 2004).

1.1.8. Composición del detergente.

La materia activa de un detergente está constituida por tensioactivos o surfactantes y una serie de componentes, cada uno de los cuales realiza una función específica.

A continuación se describe algunos de los excipientes utilizados para la formulación:

- **Tensoactivos:** Al fin de garantizar un reparto homogéneo, debido a que se trabaja con un componente notablemente hidrófobo como lo es el aceite se debe recurrir a una solubilizacion micelar. Los tensioactivos según el poder de disociación del mismo, en presencia de un electrolito y de sus propiedades fisicoquímicas pueden ser: iónicos o no iónicos: y dentro de los iónicos según la carga que posea la parte que presenta la actividad de superficie son: aniónicos, catiónicos y anfóteros.

Los tensoactivos aniónicos son si lugar a duda, los agentes de superficie más utilizados en composiciones detergentes. Entre los aniónicos, se destaca el ácido dodecilbenceno sulfónico usado como principio activo pues este ácido se neutraliza con NaOH y se forma dodecilbencenosulfonato de sodio, que posee una zona hidrofílica, y otra hidrofóbica comprende más del 40% de todos los tensioactivos utilizados (Scott & Jones, 2000).

Sin embargo, se usó con el lauril éter sulfato de sodio para obtener mejor consistencia.

- **Surfactantes:** Aparte de su actividad limpiadora, pueden agregarse a las fórmulas de los detergentes para aumentar los efectos humectantes o espumantes.

Los tipos de surfactantes más usados en las preparaciones de detergentes es: la Dietanolamida de ácidos grasos de coco, esteres ácidos de cadena larga derivados del polietilenglicol.

- **Sales, ácidos y bases inorgánicas:** Estos compuestos se llaman coadyuvantes si contribuyen significativamente a la obtención de la detergencia de la mezcla. Los componentes inorgánicos más importantes de los detergentes pueden agruparse en seis categorías: álcalis,

fosfatos, silicatos, sales neutras solubles, ácidas y coadyuvantes inorgánicas insolubles (Salager, 2004).

• **Fosfatos:** El pirofosfato tetrasódico es uno de los coadyuvantes y detergentes primarios más importantes para limpiar telas y objetos de superficie dura. Posee gran actividad de secuestración, suspensión y limpieza.

Según Scott and Jones (2000), los fosfatos de potasio particularmente el pirofosfato tetra potásico, son considerablemente más solubles que los fosfatos análogos del sodio. Se usan como coadyuvantes en detergentes líquidos (Scott & Jones, 2000).

• **Silicatos:** Mucho antes de la era de los detergentes sintéticos, se usaban mucho los silicatos sódicos como coadyuvantes en las fórmulas de jabones para lavanderías. Son de mayor utilidad en las preparaciones basadas en detergentes distintos del jabón.

• **Sales neutras solubles:** Las sales neutras solubles sulfato de sodio y cloruro de sodio se comportan como coadyuvantes que interviene en la hidrolisis de grasas, y aceites vegetales y animales y ayuda a mantener una espuma estable aumentando la detergencia en los detergentes basados en surfactantes no iónicos o aniónicos que se usan para desengrasar la lana (Sachdev & Krishnan, 1997).

• **Ácidos:** Los ácidos son utilizados para controlar el pH, se agregan en los detergentes con el fin de disolver por acción química la suciedad, que de otra manera sería muy difícil de desprender, usado en pequeñas cantidades sin embargo los limpiadores ácidos alterados con soluciones alcalinas logra la eliminación de la posibilidad de existencia microbiana (Sachdev & Krishnan, 1997).

• **Reforzados Orgánicos:** Aditivos que aumentan la detergencia, el poder espumante, el poder emulsivo o el efecto dispersor de la composición sobre partículas de suciedad (Salager, 2004).

• **Aditivos:** Como sustancia de blanqueo, sustancias que dan brillo, bactericidas, emoliente, sustancias que modifican o mejoran la forma física o la estabilidad del detergente, se suelen usar en bajas concentraciones (Scott & Jones, 2000).

• **Conservantes:** El metilparabeno y propilparabeno son aditivos solubles en agua usados para mantener la estabilidad del producto y evitar su contaminación bacteriana (Sachdev & Krishnan, 1997)

• **Colorante:** Al final del producto es importante para proporcionar un aspecto atractivo. 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 (Restrepo et al., 2008).

• **Fijador de aceite:** Sustancia que sirve para prolongar más tiempo el aceite en particular**.**

• **Aroma**: El aroma a utilizar es la combinación de aceite extraído del fruto de *B. graveolens* y el aceite esencial de *C. citratus* (hierba luisa). Esta relación tiene como precedente su aceptación en un emprendimiento previo, el cual se basó en estudio de aceptación de mercado (Jumbo, 2012).

1.2. Control de calidad.

1.2.1. Pruebas de control de calidad.

Las propiedades fisicoquímicas y sus caracteres organolépticos condicionarán la naturaleza del vehículo a emplear y la cantidad de los otros aditivos de la fórmula. Control en proceso:

- Características organolépticas: color, olor.
- Densidad relativa o peso específico.
- Determinación de pH.

1.2.2. Pruebas microbiológicas.

Dentro de las normativas de control de calidad se incluye un control microbiológico ambiental y de superficies que se hacen prácticamente imprescindibles en actividades relacionadas con productos destinados a sanidad (Ancalmo, 2001).

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) (USP, 2010).

1.3. Aceites esenciales.

Son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales distribuidas en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Briga, 1962).

La composición química de cada especie posee diferentes compuestos presentes en la esencia, pudiendo ser derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales o hasta por componentes difícilmente relacionables con las esencias, como alcaloides y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, sulfuros, aminas, etc. (Bandoni, 2002).

La característica de las esencias se debe a la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos, que pueden estar asociados o no a otros componentes (Moreno et al., 2009).

De los millones de plantas existentes en el mundo se conocen aproximadamente 4000 distintos aceites esenciales (Pozo & Naranjo, 2006).

1.3.1. Obtención de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se extraen de las partes vegetales en función de la calidad del aceite, se realiza mediante métodos oficiales como destilación por arrastre de vapor, métodos mecánicos y métodos no oficiales como extracción con disolventes orgánicos, extracción con grasas y extracción con gases licuados. Sin embargo se considera principalmente el método de destilación por arrastre con vapor de agua, debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada, razón por la cual es empleada en la mayoría de investigaciones e industrias (Martinez 2003).

1.3.2. Clasificación.

La clasificación de aceites esenciales se basa en diferentes criterios: de acuerdo a su consistencia (esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas), de acuerdo a su origen (naturales, artificiales y sintéticos) y desde el punto de vista químico (esencias monoterpénicas, sequiterpénicas y fenilpropánicos) (Carhuapoma, 2006).

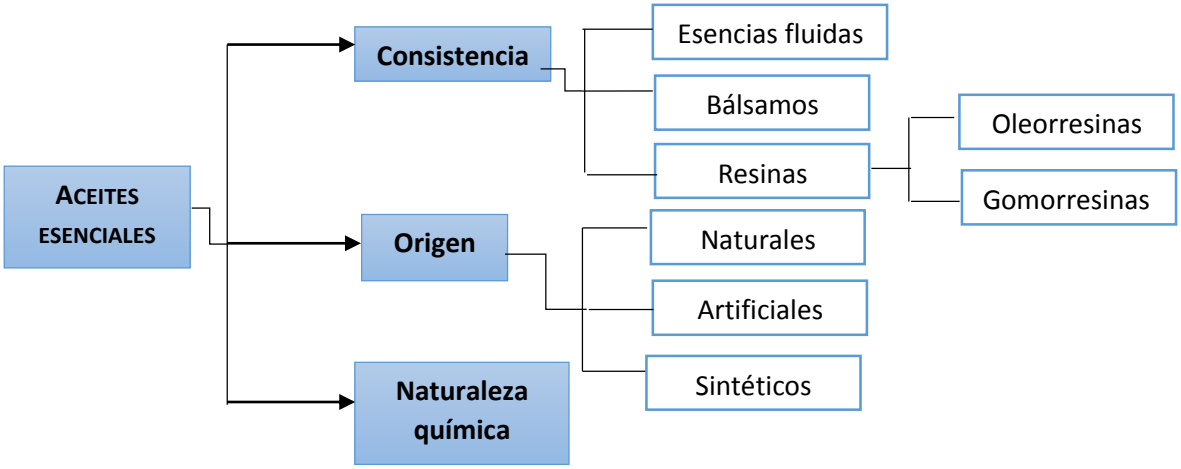


Figura 2. Clasificación de los aceites esenciales
Fuente: Silva, M. (2015)

1.3.3. Caracterización de los aceites esenciales.

La caracterización física de los aceites esenciales es muy importante para determinar el rendimiento del aceite esencial de cada recolección usando la relación entre el volumen de aceite

esencial obtenido y la masa de la muestra vegetal. También se determina el índice de refracción, densidad y propiedades sensoriales como olor, color y sabor (Bandoni, 2002).

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Su densidad es inferior a la del agua. Casi siempre dotados de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alta gradación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrestables por el vapor de agua (Cerpa et al., 2007).

La caracterización química de los aceites esenciales se lleva a cabo por la técnica cromatografica de gases (CG). Dado que los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica. Generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular.
- Monoterpenos.
- Sexquiterpenos.
- Fenilpropanos.

1.3.4. Propiedades de los aceites esenciales.

Las propiedades que presentan los aceites esenciales son beneficiosas para el ser humano y por lo tanto son cotizados en el mundo cuando son de origen natural. Dependiendo de la procedencia del aceite, de la forma de extracción y de sus componentes serán las propiedades del mismo, sin embargo todos los aceites esenciales presentan ciertas propiedades a diferentes niveles, los cuales darán el uso que tendrá el mismo (Berger, 2007).

La gran mayoría de aceites esenciales tienen acción antiséptica, que se manifiesta frente a un gran número de bacterias patógenas. Algunos aceites son también activos frente a hongos inferiores responsables de micosis e incluso frente a levaduras. Los compuestos como el citral, geraniol, linalol o timol muestran un poder antiséptico muy superior al del fenol (Arteche & Vanaclocha, 1998).

1.3.5. Aplicaciones y uso de aceites esenciales.

En la actualidad los aceites esenciales tienen una enorme cantidad de usos, se estima que existen alrededor de 3000 aceites esenciales conocidos a nivel mundial, de los cuales aproximadamente el 10% tiene importancia comercial. (Cuaspud, 2004).

Los aceites esenciales son utilizados en la elaboración de varios productos industriales:

- ✓ Industria de alimentos: se usan para dar sabor y aroma en caramelos, gomitas, bombones, jugos, mermeladas, etc.
- ✓ Industria farmacéutica: Pasta de dientes, preparaciones dentales, medicinas patentadas, preparaciones medicadas para el cabello, aplicaciones para el cuerpo, productos hierbales, etc.
- ✓ Textiles: Materiales de tapicería, tintes y preparaciones de pigmentos.
- ✓ Debido a sus características antisépticas se los utiliza productos de limpieza como fragancias para jabones, detergentes, desinfectantes, productos de uso hospitalario etc.(Buchbauer, 2000).

1.3.6. Detergente líquido y aceites esenciales.

Un detergente líquido formulado con aceites esenciales naturales proporciona un aroma mucho más agradable y delicado que cualquiera de los aromas sintéticos que despiden de los productos de limpieza cotidiano (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales ionizan y armonizan nuestro aire y medio ambiente, generando una atmósfera fresca. El aprovechamiento de aceites esenciales reúne las propiedades más adecuadas para conseguir el efecto deseado y se los utiliza solos o mezclados que hace que desprenda un aroma exquisito debido a sus características antisépticas de muchos aceites o esencias por lo que son utilizados en la elaboración de varios productos farmacéuticos.

El aceite esencial posee olor característico bastante fuerte, es volátil y comúnmente es menos denso que el agua (Berger, 2007).

1.4. Especies aromáticas.

Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias y por tanto constituyen la materia prima.

1.4.1. Especie *B. graveolens* (Palo santo).

Figura 3. Árbol de Palo Santo
Fuente: Cortesía de Ph.D Vladimir Morocho.
Departamento de Química de la U.T.P.L

1.4.1.1. Clasificación taxonómica.

Tabla 1. Descripción taxonómica de la especie *B. graveolens*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Burseraceae
Genero:	Bursera
Especie:	Graveolens
Nombre científico:	*Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch
Nombre común :	Palo Santo

Fuente: (Manzano, 2009)

1.4.1.2. Descripción botánica.

B. graveolens Triana & Planch, especie comúnmente llamada “palo santo”. Son árboles de 12 hasta 15 m de alto, aromáticos, con tronco desde 25 cm hasta 80 cm de diámetro, corteza gris, lisa y ramas rojizas (Manzano et al., 2009).

Esta especie presenta características de ser caducifolia, es decir, pierde sus hojas en períodos desfavorables de su desarrollo.

La corteza y las ramas exudan una resina amarilla con olor alcanforado o incienso, posee hojas alternas con borde crenado y flores en panículas. 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. (Rzedowski & Calderon 1996).

1.4.1.3. 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.

1.4.1.4. 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 (Salas & Zaragocin, 2006).

1.4.1.5. 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 (Valarezo et al., 2008).

1.4.1.6. 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. 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. 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 (Manzano et al., 2009).

1.4.2. Especie *C. citratus* (Hierba luisa).

Figura 4. Planta de Hierba luisa
Fuente: Silva, M. (2015)

1.4.2.1. Clasificación taxonómica.

Tabla 2. Descripción taxonómica de la especie *C. citratus*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Genero:	Cymbopogon
Especie:	Citratus
Nombre científico:	*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf
Nombre común :	Hierba Luisa

Fuente: (Soto, 2002)

1.4.2.2. Descripción botánica.

Es una hierba terrestre perenne de tamaño mediano es de 1.50m hasta 2m, aromática con ligero olor a limón, sus hojas son largas como listones, su borde es cortante, su inflorescencia es en forma de panícula y raramente florece (Jimenez & Fonnegra, 2007).

1.4.2.3. Sinónimos.

Andropogon citratus DC (Soto, 2002).

1.4.2.4. Hábitat.

Nativa de la India y Sur de Asia, crece en climas tropicales, húmedos y soleados hasta los 1500 msnm, actualmente se cultiva en Asia, Centro y Sudamérica.

En Ecuador es cultivada en las provincias de Azuay, Bolívar, Galápagos, Guayas, Los Ríos, Morona Santiago, Napo, Pichincha y Loja, encontrándose en ésta última en Catamayo, Alamor, Amaluza, Malacatos, Vilcabamba y Loja (White, 1981).

1.4.2.5. Parte utilizada.

El aceite esencial de hierba luisa está presente en las hojas en una proporción de 0.25% a 0.35% (Romero, 2004).

1.4.2.6. Usos.

El aceite de hierba luisa es rico en compuestos aromáticos con propiedades bactericidas la principal acción del aceite es sobre el aparato digestivo, popularmente usada en infusión para casos de gripe, fiebre, tos, espasmos digestivos, diarrea, cuadros respiratorios, nervios, insomnio e hipertensión arterial. También se utiliza en la preparación de alimentos, en perfumería, en desinfectantes y como bebidas tonificantes. Sin embargo el principal constituyente del aceite es el citral, el cual es un importante material para la confitería, licores y se emplea como materia prima en la síntesis de sustancias aromáticas con fuertes olor a violetas y en la síntesis de la vitamina A (Cuaspud, 2004).

1.5. Formulaciones en base al aceite de *B. graveolens y C. citratus.*

La implementación de aceites esenciales cada vez es más amplia ya sea de forma individual o mezclados en pequeñas cantidades, debido a la presencia de principios activos conocidos en sus esencias.

El desarrollo de productos en los que se han utilizados como aromatizantes ha sido en la elaboración de incienso en base al aceite esencial del fruto de *B. graveolens* y en la determinación de una formulación para la fabricación de velas con acción repelente (Jumbo, 2012).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de los aceites esenciales.

Para la selección del aroma de la fórmula detergente se tomó como base un estudio previo sobre la producción de velas antimosquitos a partir de aceite esencial de palo santo (Jumbo, 2012).

Como se puede observar en la tabla 3, se indica las formulaciones de la mezcla de aceites seleccionada para esta investigación.

Tabla 3. Concentraciones de la mezcla de aceite hierba luisa-palo santo

MEZCLAS	VOLÚMEN (mL)		VALORIZACIÓN
	Hierba Luisa	Palo santo	
1	1.5	1.5	A
2	1.5	1	B
3	1.5	0.5	A
4	1	1.5	B
5	0.5	2	C
6	1	1	B

Fuente: Silva, M. (2015)
A: Muy agradable, **B**: Poco agradable y **C:** Desagradable

2.1.1. Recolección de la materia vegetal.

La recolección del aceite de la especie *B. graveolens* (palo santo) correspondió a los frutos que se encuentran al suroeste de la provincia de Loja, cantón Zapotillo el mismo que fue proporcionado por el Departamento de Química de la UTPL y la recolección de la especie de *C. citratus* (hierba luisa) se realizó en un huerto medicinal localizado en el cantón Malacatos perteneciente a la provincia Loja.

2.1.2. Extracción del aceite esencial de *C. citratus*.

El método empleado para la extracción de los aceites fue la destilación por arrastre de vapor de agua. La obtención del aceite de *C .citratus* se efectuó en un destilador tipo Clevenger con capacidad de carga de 1000 g de muestra, consta de un tanque de acero inoxidable (Figura 5), en el cual se colocó la muestra vegetal fresca (hojas de hierba luisa). En la parte inferior del cilindro se añadieron 1.5 litros de agua destilada, la esencia fue arrastrada por la corriente de vapor y posteriormente condensada, recolectada en un florentino y separada de la fracción acuosa. La destilación por arrastre con vapor de agua toma alrededor de 2 horas. Una vez

obtenido el aceite fue protegido de exposición a la luz en frascos de vidrios herméticos oscuros porque tienden a degradarse.

Figura 5. Destilador para extraer el aceite esencial
Fuente: Silva, M. (2015)

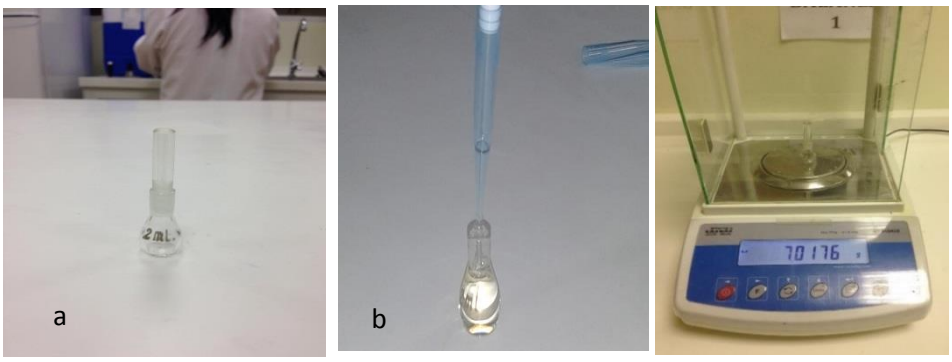
2.2. Estudios de preformulación.

2.2.1. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.

Las propiedades físicas que se determinaron fueron densidad relativa según la norma AFNOR NFT75-111 (ver Anexo 1) y el índice de refracción que se determinó según la norma AFNOR NF 75-112 25 (ver Anexo 2).

2.2.1.1. Determinación de la densidad relativa.

La densidad relativa de los aceites esenciales se determinó mediante la norma AFNOR NF T75-111 (ver Anexo 1). La figura 6 muestra el procedimiento.



a) Picnómetro vacío **b)** Picnómetro con agua **c)** Picnómetro con aceite
Figura 6. Determinación de la densidad
Fuente: Silva, M. (2015)

2.2.1.2. Determinación del Índice de refracción.

El índice de refracción de los aceites esenciales se determinó según la norma ANFOR NF 75-112 25 (ver Anexo 2), en el cual se utilizó el refractómetro ABBE, marca BOECO GERMANY (Figura 7) disponible en el laboratorio de Ingeniera de Procesos.

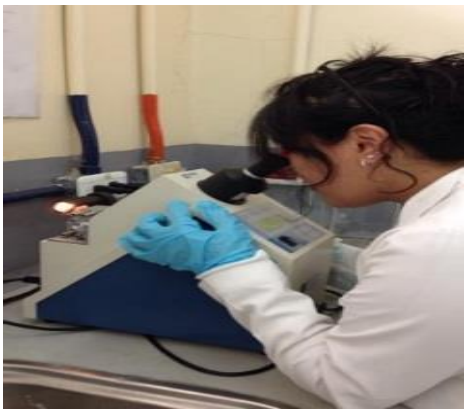


Figura 7. Lectura del índice de refracción
Fuente: Silva, M. (2015)

2.2.1.3. Solubilidad.

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

De acuerdo a la USP – NF33, las solubilidades se indica mediante términos descriptivos en la tabla 4:

Tabla 4. Solubilidad en términos descriptivos.

Término Descriptivo	Partes disolvente Requeridas para 1 parte de soluto
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-NF33. 2010

2.2.1.4 Determinación de la composición química de los aceites.

La identificación de los compuestos de los aceites esenciales de *B. graveolens* y *C. citratus* se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrofotometría de Masas. (GC/MS). El equipo utilizado para los perspectivos análisis fue un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert (Figura 8), dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el equipo cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683.

Figura 8. Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N.
Fuente: Silva, M. (2015)

Las corridas se realizaron en la columna DB-5MS. Para esto, la preparación de las mezclas se realizó disolviendo 10*µL* del aceite esencial con 990*µL* de diclorometano. (Figura 9).

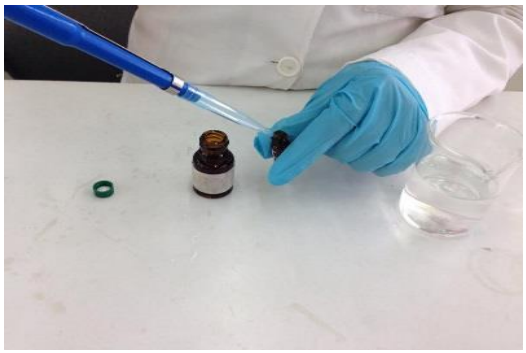


Figura 9. Muestra del aceite diluido en diclorometano
Fuente: Silva, M. (2015)

La identificación de los compuestos químicos del aceite esencial se ejecutó 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.

2.3. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y *Bursera graveolens.*

La actividad biológica de los aceites fue evaluada frente a cepas bacterianas y fúngicas mediante el método de microdilución en caldo. Este análisis se basó en la inhibición del crecimiento de microorganismos, mediante diluciones a diferentes concentraciones, reportándose finalmente la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y *Bursera graveolens* (ver Anexo 3).

2.4. Estudios de formulación.

2.4.1. Proceso general de fabricación de soluciones líquidas.

A continuación se muestra el proceso de manufactura general para soluciones líquidas.

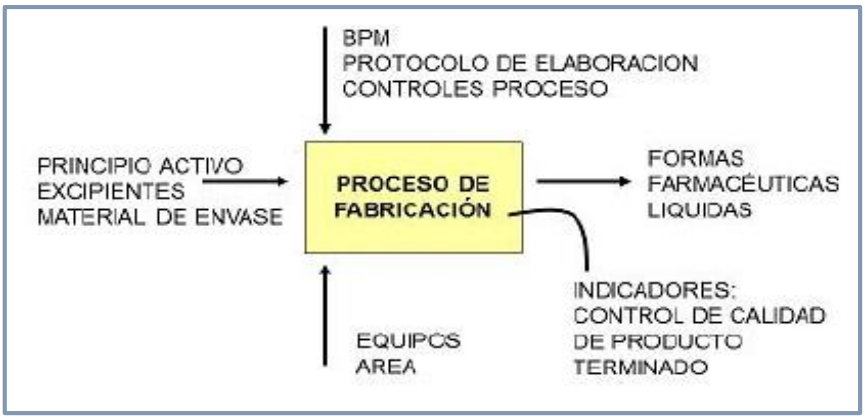


Figura 10. Proceso General de elaboración de soluciones líquidas.
Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional. USP-NF33. 2010; Vol. 1

Una vez obtenido los aceites esenciales, se procedió a la elaboración del detergente líquido en el cual las materias primas involucradas se detallan en la tabla 5 respectivamente.

Tabla 5. Formulación base del detergente líquido

EXCIPIENTES	FUNCIÓN
Ácido dodecilbenceno sulfónico	Detergente
Lauril éter sulfato de sodio	Detergente
Dietanolamida de ácidos grasos de coco	Aditivo
Cloruro de sodio (NaCl)	Antiespumante
Urea	Clarificante
Ácido cítrico	Regulador de pH
Metilparabeno	Preservante
Propilparabeno	Preservante
Aceite de palo santo y hierba luisa	Aromatizante
Galaxolide	Fijador de aceite
Verde #C-OO8	Colorante
Agua	c.s.

Fuente: Silva, M. (2015)

2.4.2. Diagrama de elaboración del detergente.

La Figura 11 describe los pasos para el proceso de elaboración del detergente líquido.

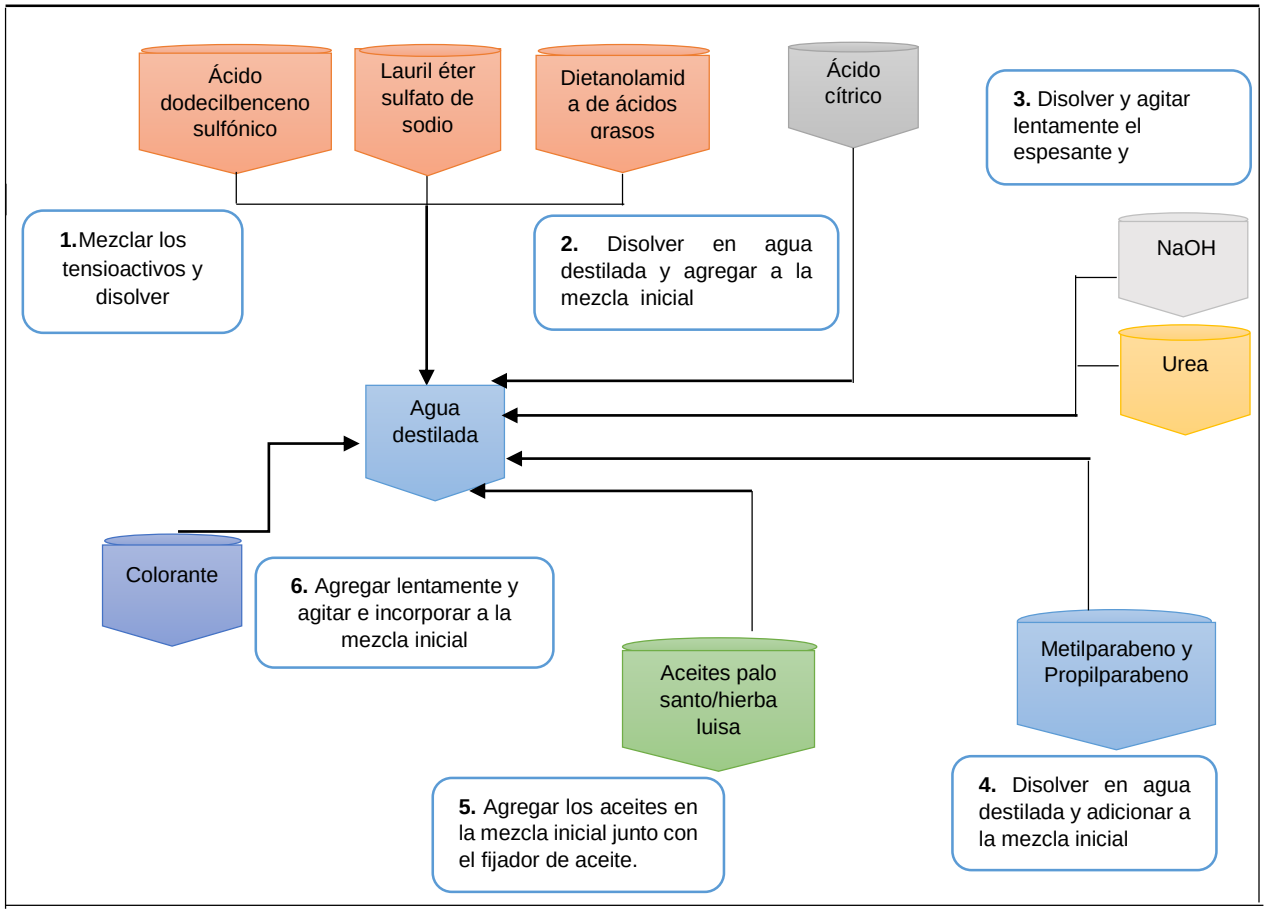


Figura 11. Diagrama de elaboración del detergente líquido.
Fuente: Silva, M. (2015)

Procedimiento:

1. En 10mL de agua destilada mezclar el ácido dodecilbenceno sulfónico, el lauril éter sulfato de sodio con la Dietanolamida de ácidos grasos de coco, agitando suavemente hasta obtener una muestra homogénea.
2. Disolver el ácido cítrico en 10mL de agua destilada y colocar en la mezcla anterior.
3. Adicionar el cloruro de sodio (NaCl) lentamente disueltos en 5mL y también la urea en 5mL sin detener la agitación.
4. Agregar los conservantes disueltos en 5mL de agua destilada y agitar hasta total disolución y agregar a la mezcla inicial.
5. Luego se agrega los aceites de palo santo (1mL) y hierba luisa (1.5mL), junto con 2mL del fijador de aceite, hasta total disolución. Por último se agrega lo restante de agua hasta llegar a 50mL y se coloca el colorante al detergente ya terminado. La cantidad de colorante dependerá del color deseado

2.5. Desarrollo de la optimización de la formulación.

Previo a la optimización de la fórmula de detergente las variables de respuesta evaluadas de manera simultánea fueron la consistencia liquida espumosa, variación de pH y aroma del detergente. Los cuales se cree dependerán de la composición en ácido dodecilbenceno sulfónico, ácido cítrico y aceite esencial, respectivamente.

Para cada experimento se prepararon formulaciones en base a 50 mL disueltas en agua destilada dejándolas reposar 24h con el fin de comprobar características de aspecto y aroma (ver Anexo 4); por lo tanto se realizaron pruebas de lavado aplicada sobre el piso que mostrara un fácil enjuague. También se evaluó el pH, con el fin de controlar que se mantenga ácido, utilizando un potenciómetro, marca OAKTON modelo PH-700. Y, en cuanto al aroma se realizó la mezcla de los aceites palo santo-hierba luisa, los cuales proporcionaran un olor fresco, natural y agradable. La tabla 6 muestra los criterios de aceptabilidad planteados para evaluar las distintas formulaciones del detergente.

El diseño experimental utilizado fue un diseño factorial 2^3, que consiste en estimar valores en concentraciones bajas y altas de las tres variables a evaluar (consistencia espumosa, pH y aroma) que influyen en la calidad del detergente. Se efectuaron ocho experimentos de forma aleatoria con una réplica, dando en total 16 experimentos (Riba, 2002). Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA utilizando el software MINITAB15 que permitió contrastar las hipótesis planteadas (Diaz, 2009).

Tabla 6. Criterios de aceptabilidad del detergente.

CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD DEL DETERGENTE		
Consistencia líquida	Aceptación (A)	Baja espuma
	Rechazo (R)	Alta espuma
Variación de pH	Aceptación (A)	pH (5.0 - 7.0)
	Rechazo (R)	pH (menor de 5.0)
Olor	Aceptación (A)	Dulce: Genera más olor el Hierba luisa que Palo Santo
	Rechazo (R)	Agridulce: Genera más olor el Palo Santo que Hierba luisa

Fuente: Silva, M. (2015)

Criterios de evaluación del detergente
Aceptación: (A) 100% Si cumple
Rechazo: (R) 0% No cumple

2.6. Ensayos organolépticos y físico-químicos de la fórmula detergente.

Una vez seleccionada la fórmula detergente se realizaron los ensayos organolépticos, físico-químico, los mismos que se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Ensayos evaluados de la fórmula detergente

Ensayos	Parámetros
Organolépticos	Aspecto, olor, color
Físico- químicos	pH, densidad

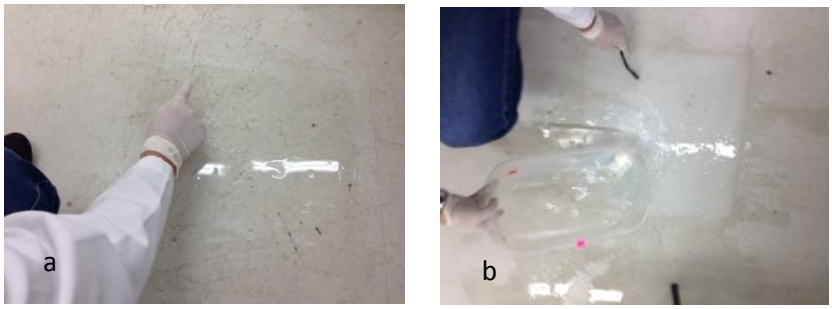
Fuente: Silva, M. (2015)

2.7. Estudio de la actividad antimicrobiana de la fórmula detergente.

Se evaluó la eficacia antimicrobiana de la fórmula detergente por medio de cultivos expuestos en medios nutritivos para la determinación de la actividad bactericida de la fórmula detergente en estudio.

Como las condiciones ambientales influyen en la sedimentación de los microorganismos fue necesario que, cuando se realizan los medios de cultivo, se expongan las placas en el mismo lugar y bajo las mismas condiciones de asepsia para poder comparar los resultados obtenidos.

Para la ejecución de la metodología, se tomó la muestra con hisopos con medios de transporte (stuart agar gel) con el cual se efectuó el hisopado del piso sucio y luego del piso limpio aplicando la fórmula detergente dejando 10-15 minutos en exposición que se realizó en el laboratorio de Ingeniera de Procesos realizando el frotis de manera uniforme en direcciones diferentes de arriba hacia abajo y luego de un lado al otro para luego colocarlo en medios líquidos y sembrarlo en placas con agar (Figura 12).



a) Piso sucio; **b)** Piso limpio
Figura 12. Hisopado de la muestra
Fuente: Silva, M. (2015)

Se utilizaron cajas Petri para la investigación de microorganismos existentes en el piso esto se preparó en agar SANGRE, y agar MACCONKEY, se sembró la muestra en el medio selectivo y se incubo por 48h a 37°C. Luego se realizaron las respectivas pruebas con el fin de determinar la presencia de las bacterias existentes en la zona de estudio.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentración de los aceites esenciales para el detergente.

Utilizando los valores de la tabla 3, se realizó una evaluación sensorial del aroma con un panel de 10 personas pertenecientes al Departamento de Ingeniería de Procesos, obteniendo como mejor resultado la segunda combinación para aromatizar la fórmula del detergente.

La proporción a utilizar fue hierba luisa (1.5mL) y de palo santo (1mL).

3.2. Evaluación de las propiedades organolépticas y físico-químicas de los aceites esenciales.

La tabla 8 muestra los resultados organolépticos y físico-químicos obtenidos al realizar el análisis del aceite esencial de *B. graveolens y C. citratus* 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 8. Parámetros organolépticos y físico-químicos del aceite esencial de palo santo y hierba luisa

Aceites esenciales	Apariencia	Color Subjetivo	Olor	Densidad (g/cm^3)	Índice de refracción
B. graveolens	Líquido viscoso	Incoloro a amarillo translucido	Cítrico, especiado y amaderado	0.8544	1.4768
C. citratus	Líquido viscoso	Amarillo pálido	Dulce especiado	0.8773	1.4782

Fuente: Silva, M. (2015)

Según los datos obtenidos de los estudios de preformulación los aceites esenciales poseen características organolépticas dependiendo del tipo de planta del cual se extrae. (Pozo & Naranjo, 2006).

En lo que respecta la densidad del aceite esencial de *B. graveolens* (palo santo) y *C. citratus* (hierba luisa) a 20°C muestran un valor menor que la densidad del agua (1.00 g/cm^3), como es de esperarse la mayoría de los aceites esenciales de plantas y especies, están compuestas fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos (Pino et al., 1996).

En cuanto al indice de refracción de las muestras de aceite de palo santo fue de 1.4768 y la de hierba luisa de 1.4782. Esta variación mínima entre los dos aceites depende de la temperatura en la cual se la midió ya que cuando la temperatura es menor el índice de refracción es mayor y cuando la temperatura es más elevada el valor del índice de refracción va disminuyendo. Por

tanto el índice de refracción es una propiedad utilizada para controlar la pureza y calidad de los aceites tanto a nivel laboratorio como industria (Cano et al., 2008).

De acuerdo con la investigación realizada por Salas y Zaragocin (2006) estos valores concuerdan con los rangos de referencia establecidos para el aceite de palo santo y hierba luisa, mostrando que poseen una óptima calidad, cumpiendo con las especificaciones establecidas por el Departamento de Quimica (Salas y Zaragocin, 2006).

3.3. Composición química de los aceites esenciales de *B. graveolens* y *C. citratus.*

La composición química de los aceites de *B. graveolens* y *C. citratus* se determinó mediante CG/MS. En la tabla 9 se observa los componentes de los aceites esenciales que se identificaron mediante los índices de Kovats detectados mediante la técnica de CG-MS acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

Tabla 9. Composición química del aceite esencial extraído del fruto de (*B. graveolens*) y aceite esencial extraídos de las hojas de (*C. citratus*) por CG-MS.

ANÁLISIS CG/MS- ACEITE ESENCIAL EXTRAIDO DEL FRUTO DE *B. graveolens* *		**ANÁLISIS CG/MS- ACEITE ESENCIAL EXTRAIDO DE LAS HOJAS DE *C. citratus***	
Limonene	48.48%	Geranial	41.22%
α phellandrene	36.59%	Neral	32.09%
α-thujene	5.97%	Myrcene	18.01%
Germacrene D	1.22%	Geraniol	2.40%
α-pinene	0.96%	6-methyl-5-hepten-2-one	0.98%
p-cymene	0.88%	Linalool	0.97%
Sabinene	0.35%	cis-ocimene	0.82%
α-thujene	0.28%	Undecanone	0.58%

Fuente: * (Valarezo et al., 2008)

Cabe recalcar que los compuestos químicos identificados de los aceites extraídos están organizados de mayor a menor porcentaje de acuerdo al compuesto identificado del palo santo como de la hierba luisa. Refiriéndose primeramente a los componentes mayoritarios del aceite *B. graveolens* (palo santo) extraídos del fruto están marcados por el Limonene y α-phellandrene 48.48% y 36.59% respectivamente. El Limonene es uno de los terpenos más comunes en la naturaleza y es uno de los componentes más importantes de los aceites cítricos. Se considera de baja toxicidad y ciertos estudios demuestran que no presenta ningún tipo de riesgo mutagénico, carcinogénico o nefrotóxicos en los seres humano. Es un excelente disolvente de

colesterol y se lo ha utilizado clínicamente para disolver cálculos biliares que contiene colesterol (Sun, 2007).

El α-phellandrene, es un fitoquímico de tipo terpenoide, abundante en los aceites esenciales y tiene propiedades potentes de ser insecticida y fungicida. Se considera que tiene muy baja toxicidad. Así mismo, el rendimiento promedio reportado del aceite esencial extraído de fruto de *B. graveolens* es de 2.5% (UTPL, 2012).

Por el contrario los componentes mayoritarios para el aceite esencial extraído de las hojas de *C. citratus* (hierba luisa) están marcados por el Geranial y Neral 41.22% y 32.09% respectivamente, cuya importancia se centra en la obtención de aceite esencial, el cual es rico en citral mezcla de los (isómeros geranial y neral), que presentan varias propiedades entre ellas que es antibacteriano, antihistamínico, fungicida y anticancerígeno, así como también el geraniol, linalool los cuales poseen propiedades tales como antiséptico, antiespasmódico. Asimismo, el rendimiento promedio reportado del aceite esencial extraído de las hojas de *C. citratus* es del 0.01 al 10% (Soto, 2002).

Es así que se demuestra la confiabilidad y seguridad de desarrollar productos en base al aceite esencial extraído del fruto de *B. graveolens,* y de las hojas de *C. citratus,* tomando en cuenta que es una alternativa innovadora, eficiente, sustentable y segura saludablemente.

3.4. Actividad biológica de los aceites esenciales.

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permitieron medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos, determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas.

3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la Tabla 10, se observa la CMI antibacteriana de los aceites esenciales que se usaron como aromatizantes en la elaboración de la fórmula del detergente líquido.

Tabla 10. CMI de los aceites esenciales de *B. graveolens y C. citratus*

Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales µg/mL							
Gram-negativas						Gram-positivas	
Aceite esencial	*Escherichia coli* *ATCC 25922*	*Klebsiella pneumoniae* *ATCC 9997*	*Proteus vulgaris* *ATCC 8427*	*Pseudomonas aeruginosa* *ATCC 27853*	*Salmonella typhimurium*	*Enterococcus faecalis* *ATCC 29212*	*Staphylococcus aureus* *ATCC 25923*
Cymbopogon citratus	> 10000 µg/mL	> 5000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 5000 µg/mL
Bursera graveolens	> 10000 µg/mL	> 5000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL

Fuente: Silva, M. (2015)

Como se puede observar *Cymbopogon citratus* presenta actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* (5000 µg/mL) y *Klebsiella pneumoniae* (5000 µg/mL). Según estudios realizados en una crema preparada a base de aceite esencial de *Cymbopogon* citratus se ha encontrado valores de CMI oscilaron en un rango de 0.100 a 5.000 µg/mL (Guerra et al., 2004).

Las bacterias Gram positivas fueron más sensibles, similar a lo informado por Lemos et al. (1990), se conoce que diferencias genéticas entre algunas cepas de *Cymbopogon* ejercen una gran influencia en la actividad antibacteriana del aceite esencial (Lemos et al., 1990).

Esta acción se atribuye al citral, particularmente al geraniol (alfa citral) y al nerol (beta citral), incluso se plantea que el mirceno, aunque solo no muestra tal actividad, como la parte del aceite, incrementa la acción cuando se mezcla con los anteriores.

Como puede observarse en la tabla 10 *Bursera graveolens* presenta actividad biológica únicamente para *Klebsiella pneumoniae* (5000 µg/mL). En un estudio reportado de *B. graveolens* presentaron efecto inhibitorio frente *S. aureus* una concentración de 150 mg/mL y *B. subtilis* 180 mg/mL. Este no mostraron efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram (-). Según el estudio realizado por Provan et al. (1987) encontraron que el aceite esencial de *Boswellia neglecta*, una *Burseraceae*, es rica en α-pineno, α-tujeno, p-cimeno y limoneno, de los cuales, el limoneno y α-pineno son constituyentes de *Bursera graveolens*, estos son responsables de la actividad biológica (Provan et al., 1987).

3.4.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.

Para determinar si las muestras de aceite esencial de *B. graveolens* y *C. citratus*, presentan actividad inhibitoria frente a cepas fúngicas se utilizó dos tipos de hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

En la tabla 11, se indica los valores obtenidos de los ensayos de la concentración mínima inhibitoria antifúngica para cada aceite.

Tabla 11. CMI de los aceites esenciales de *B. graveolens y C. citratus.*

Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales µg/mL		
Aceite esencial	*Trichophyton rubrum* *ATCC 28188*	*Trichophyton mentagrophytes* *ATCC 28185*
C. citratus	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
B. graveolens	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL

Fuente: Silva, M. (2015)

Los aceites esenciales de hierba luisa y palo santo obtenido del material vegetal presentaron actividad débil frente a los hongos utilizados en este análisis, ya que presentaron una CMI mayor a 10000 µg/mL (Zapata et al., 2010).

En varios estudios realizados sobre el aceite esencial de la hierba luisa se ha demostrado que detiene el crecimiento de ciertos dermatofitos: *Epidermophyton floceosum, Microsporum canis* e incluso actúa sobre el *Aspergillum flavus*, siendo más potente que los fungicidas sintéticos (Soto, 2002).

El aceite de hierba luisa es un potente antimicótico ya que inhibe el desarrollo de hongos y levaduras en muy corto tiempo en comparación con la actividad antibacteriana que inhibe en un tiempo más largo.

Sin embargo de la especie de *Burseraceae* se han publicado ciertas variedades que presentan resistencia a diferentes tipos de compuestos con actividad antifúngica debido a que estas presentan compuestos fenólicos, aunque el componente mayoritario del aceite esencial de *B. graveolens* es el limonene. Ciertos estudios demuestran que no presenta ningún tipo de riesgo mutagénico, carcinogénico o nefrotóxicos en los seres humano (Sun, 2007).

De acuerdo con la clasificación de la actividad antimicótica para aceites esenciales, citado por Zapata et al. (2010) clasifica el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la siguiente manera: si la CMI es igual o menor a 1000 µg/mL se considera buena, si la CMI está entre 1000 – 5000 µg/mL se considera como moderada y si la CMI está entre 5000 – 10000 µg/mL se considera como débil (Zapata et al., 2010).

3.5. Optimización de la formulación para la elaboración del detergente líquido

En la tabla 12, se indican los factores a evaluar con los niveles de variación y en la tabla 13, se muestran los resultados obtenidos de las muestras ensayadas en el diseño. La valoración que se le asignó a cada experimento es un promedio de los tres factores en porcentaje según la aceptación o rechazo de cada uno de los factores. Es así que se considera aceptada a aquella formulación que cumple con los tres criterios de aceptabilidad de forma simultánea.

Tabla 12. Factores a evaluar para la optimización de la formulación del detergente.

Factor	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
Ácido Dodecilbenceno sulfónico (A)	5,5 %	6,5%
Ácido cítrico (B)	0,05 %	0,15%
Aceite *B. graveolens* - *C. citratus* (C)	5%	10%

Fuente: Silva, M. (2015)

Tabla 13. Parámetros de evaluación del detergente líquido con sus resultados

N° de experimento	Ácido dodecilbenceno sulfónico	Ácido Cítrico	Aceite Esencial	Consistencia	pH	Aroma	Aceptación (%)
1	5,5	0,15	5	A	A	R	67
5	5,5	0,05	10	A	A	A	100
12	6,5	0,15	5	R	R	R	0
6	6,5	0,05	10	R	A	A	67
14	6,5	0,05	10	R	R	A	33
7	5,5	0,15	10	A	R	R	67
15	5,5	0,15	10	R	R	A	33
4	6,5	0,15	5	R	R	R	0
16	6,5	0,15	10	A	R	A	67
10	6,5	0,05	5	A	A	R	67
9	5,5	0,05	5	A	A	R	67
11	5,5	0,15	5	R	A	R	33
13	5,5	0,15	10	R	A	A	67
2	6,5	0,05	5	R	R	R	0
3	5,5	0,15	5	A	A	R	67
8	6,5	0,15	10	R	R	A	33

Fuente: Silva, M. (2015)

Primeramente, con objeto de determinar aquellos efectos poco significativos sobre la variable de respuesta; se tienen en cuenta todos los efectos simples e interacciones posibles. Es así que, en la Figura 13 se puede apreciar la gráfica de probabilística normal, la cual nos indica que los efectos de los factores A (Ácido dodecilbenceno sulfónico), factor B (ácido cítrico) y factor C (aceite esencial) son significativos, ya que los efectos más significativos A, B, C se alejan de la recta representada, mientras que los menos significativos se sitúan sobre ella. Así mismo, las interacciones AC (Ácido dodecilbenceno sulfónico– aceite esencial), BC (ácido cítrico-aceite esencial), AB (Ácido dodecilbenceno sulfónico –ácido cítrico) y ABC (Ácido dodecilbenceno sulfónico- ácido cítrico- aceite esencial) no son significativas dentro de los parámetros de aceptabilidad de la fórmula detergente.

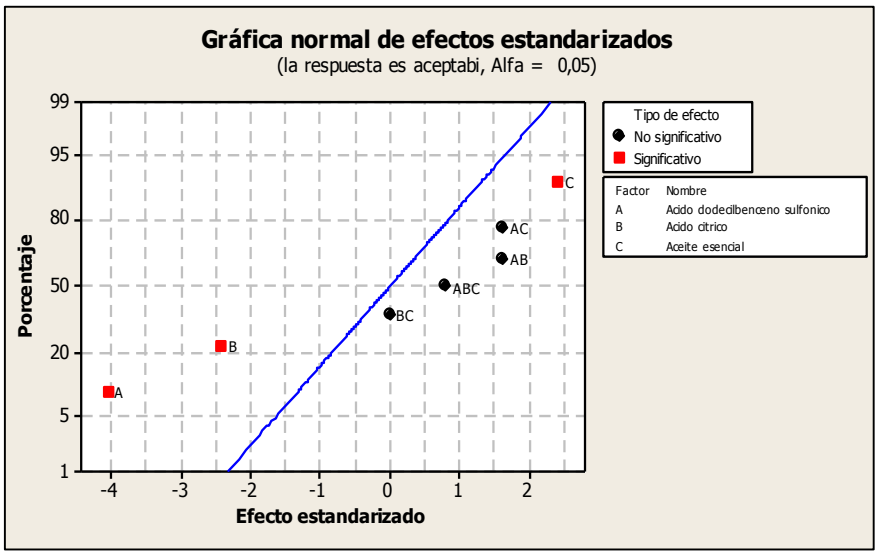


Figura 13. Gráfica de probabilidad normal de los efectos
Fuente: Análisis ANOVA, programa MINITAB15

De esta manera, el ANOVA aplicado al diseño factorial 2^3 genera los resultados que se indican en la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de varianza ANOVA para los factores a evaluar

Fuente	Gl	SC.Sec	SC.Ajust.	MC.Ajust.	F	P
Efectos Principales	3	11944.4	11944.4	3981.48	9.56	0.005
Ácido dodecilbenceno sulfónico	1	6944.4	6944.4	6844.44	3.79	0.004
Ácido cítrico	1	2500.0	2500 .0	2500.0	2.87	0.040
Aceite esencial	1	2345.0	2345.0	2345.0	2.10	0.040
Error Residual	8	3333.3	3333.3	416.67		
Error Puro	8	3333.3	3333.3	416.67		
Total	15	17777.8				

Fuente: Análisis ANOVA, programa MINITAB15

A partir de estos resultados, se procede a realizar la comparación de los valores de F (Fisher) entre Fisher calculado (FC) y Fisher de tablas (ver Anexo 5), utilizando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Cabe señalar que si el Fisher calculado es mayor al Fisher obtenido en tablas, se procede a rechazar la hipótesis nula que se está evaluando.

Considerando que en la Figura 13 se diferencian tres variables significativas como la consistencia liquida espumosa, pH y olor, considerados que son los efectos principales que influyen sobre la variable de respuesta, es necesario analizar las hipótesis planteadas:

Ho: El Ácido dodecilbenceno sulfónico **no influye** en la variación de la calidad del detergente.

Análisis:

Conociendo que, el Fisher de tablas se obtiene con la siguiente fórmula Fα-1, ab (n-1).

Tenemos que:

F1, 8; 0.05

Fc= 3.79 < FT= 5.318

Conclusión:

Por ende, el Fischer calculado es menor al Fischer obtenido en las tablas, la hipótesis se acepta, concluyendo que el ácido dodecilbenceno sulfónico **no influye** en la calidad del detergente.

Ho: EL pH **no influye** en la variación de la calidad del detergente

Análisis:

Tenemos que:

F1, 8; 0.05

Fc= 2.87 < FT= 5.138

Conclusión:

Por ende el Fischer calculado es menor al Fischer obtenido en las tablas, la hipótesis se acepta, concluyendo que el ácido cítrico **no influye** en la calidad del detergente.

Ho: El aceite esencial **no influye** en la calidad del detergente

Análisis:

Tenemos que:

F1, 8; 0,05

Fc= 2,10 < FT= 5.138

Conclusión:

Por ende el Fischer calculado es menor al Fischer obtenido en las tablas, la hipótesis se acepta, concluyendo que el aceite esencial **no influye** en la calidad del detergente.

Así mismo, se da paso a evaluar la última hipótesis nula:

Ho: La interacción del ácido dodecilbenceno sulfónico, ácido cítrico y el aceite esencial **no influyen** en la calidad del detergente.

Análisis:

Tenemos que:

Fc= 9.56 > F3, 8; 0.05

Fc= 9.56 > FT = 4.066

Conclusión:

Al ser el Fisher calculado mayor al Fisher obtenido en tablas, la hipótesis **se rechaza**, concluyendo que tanto los factores: ácido dodecilbenceno sulfónico, ácido cítrico y aroma **si influyen** en la calidad del detergente.

Es así que, en la figura 14 se observa la relación de los efectos principales y el cumplimiento de los criterios de aceptación del detergente, por lo que se puede evidenciar que para el ácido dodecilbenceno sulfónico existe una mayor aceptabilidad si este se encuentra en un nivel bajo de 5,5 % comparado con el nivel alto de 6,5%, el cual muestra una baja aceptabilidad del detergente.

Por su parte, el ácido cítrico muestra una aceptabilidad, si este se encuentra en un nivel bajo de variación; es decir 0,05%, ya que por el contrario para el nivel alto del 0,015%, la aceptabilidad del pH es alta.

Finalmente, para el aceite esencial se revela una alta aceptabilidad del detergente para un nivel alto del 10%, al contrario del nivel bajo el 5%, en que no hay aceptabilidad del factor.

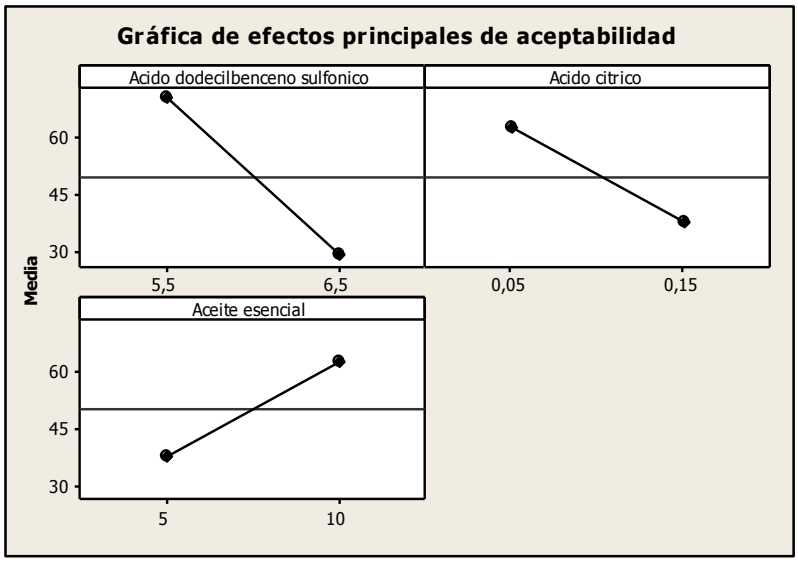


Figura 14. Gráfica del factor principal
Fuente: Análisis ANOVA, programa MINITAB15

Concluyendo con el análisis, la gráfica de cubos (Figura 15) revela que al combinar los tres factores, los niveles de variación en los que es posible obtener una aceptabilidad del 100% del detergente son: un porcentaje de 5,5 % de ácido dodecilbenceno sulfónico, 0,05% de ácido cítrico y 10% de aceite esencial.

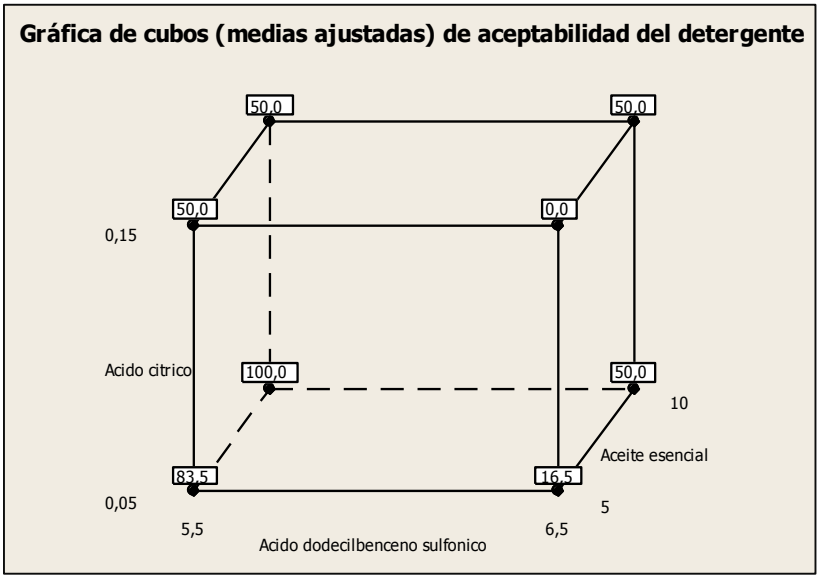


Figura 15. Gráfica de cubos
Fuente: Análisis ANOVA, programa MINITAB15

3.6. Formulación

3.6.1. Establecimiento de la fórmula del detergente

La fórmula que obtuvo un 100% de aceptabilidad según los criterios establecidos como baja consistencia espumosa, pH ácido y aroma agradable influyen en la calidad del detergente, por lo tanto la fórmula seleccionada para la elaboración del detergente se resume en la tabla 15.

Tabla 15. Fórmula seleccionada para la elaboración del detergente.

FÓRMULA DEL DETERGENTE	
EXCIPIENTES	**% (p/v)**
Ácido dodecilbenceno sulfónico	5,5
Lauril éter sulfato de sodio	2,5
Ácido cítrico	0,05
Dietanolamida de ácidos grasos de coco	1,75
Cloruro de Sodio	0,75
Urea	0,8
Metilparabeno	0,09
Propilparabeno	0,01
Galaxolide	2
Aceite Palo santo / Hierba luisa	10
Colorante verde #C-008	0,002
Agua	c.s.p

Fuente: Silva, M. (2015)

3.7. Parámetros de la fórmula detergente

3.7.1. Parámetros organolépticos y físico-químicos.

Tabla 16. Resultados del análisis organoléptico y físico-químicos

Parámetros	Fórmula detergente	
Organolépticos	Aspecto	Semilíquida
	Olor	Ligeramente limón
	Color	Verde manzana
Físico-químico	Densidad g/mL	0.95
	pH	5.2

Fuente: Silva, M. (2015)

Los resultados de la tabla 16 muestran las características organolépticas y físico-químico que se obtuvieron de la fórmula detergente seleccionada, presentando un aspecto semilíquido debido a los tensioactivos utilizados (ácido dodecilbenceno y lauril éter sulfato de sodio) que actúan

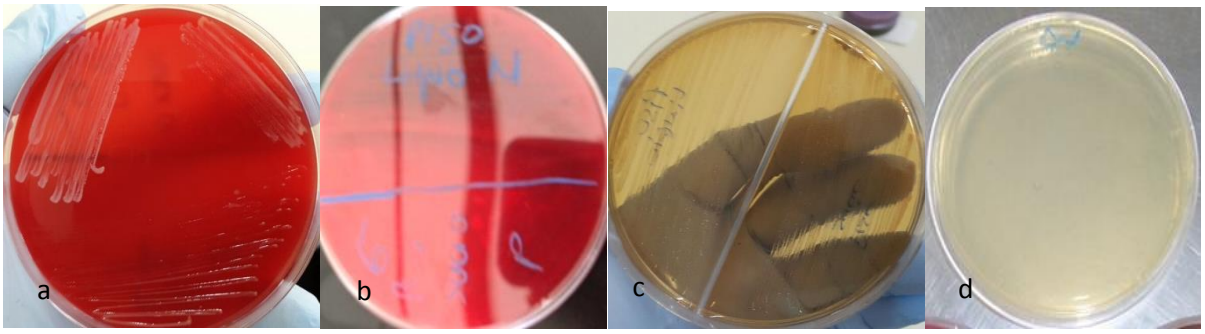
aumentado su viscosidad y a la vez garantizando un aspecto igual a un detergente comercial, se registró un olor ligero a limón característico de la hierba luisa que contiene en su composición cantidades de limoneno (monoterpeno cíclico) que también se encuentra en las cáscaras de los cítricos (Sun, 2007), por lo que la fórmula contiene una concentración de aceite de hierba luisa mayor al aceite de palo santo. En lo que respecta al color se registró verde manzana debido al colorante usado, concluyendo que la fórmula presentó una mezcla homogénea y una apariencia límpida.

También se revela los parámetros (pH, densidad) evaluados a temperatura ambiente. En un estudio realizado por Quiroz (2009), se elaboró un desengrasante a base de aceite esencial extraído de cáscara de naranja, se obtuvo un valor de pH aproximado a 6; mientras que, el detergente formulado en la presente investigación es de 5.2, que va acorde con el rango de pH ácido comprendido entre 0-6, puesto que se emplea en la elaboración de detergentes con el fin de eliminar la suciedad en las superficies (pisos) la misma en la que será aplicada (Orlandi, 2004).

Por otro lado, en lo que respecta a la densidad Castro (1973), en una investigación de productos de limpieza señala una densidad (0.9g/mL-1.10g/mL) por tanto al comparar la fórmula del presente estudio se evidenció un valor de 0.95g/mL que se encuentra dentro de los rangos aceptables.

3.8. Actividad antimicrobiana de la fórmula detergente.

Los resultados antimicrobianos encontrados sobre la superficie del piso sucio y limpio se muestran en la figura 16.



a. Agar sangre (*S. aureus*) piso sucio b. piso limpio c. Agar (*S. aeruginosa*) piso sucio. d. piso limpio
Figura 16.Resultados del análisis microbiológico
Fuente: Silva, M. (2015)

Como se puede observar en el piso sucio se identificó el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que muestra cocos gram positivos dispuestos en racimos y en el agar Macconkey se identificó el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* que muestra bacilos gram negativos.

Por otra parte al realizar el lavado del piso aplicando la fórmula detergente no se observó crecimiento de los microorganismos esto indica que la fórmula inhibió el crecimiento de las bacterias identificadas (*S. aureus, P. aeruginosa*).. Según Hidalgo et al. (2012) nos indica que el aceite esencial de las hojas de *B. graveolens* poseen actividad antibacteriana contra *S. aureus, Bacillus subtilis* y *Saccharomyces* (Hidalgo et al,.2012). y el aceite de *C. citratus* presenta actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Guerra et al., 2004). Es así que el uso de aceites esenciales (palo santo/hierba luisa) incluidos como aromatizantes en la elaboración del detergente liquido presento actividad antimicobriana.

CONCLUSIONES

- ✓ Se demostró que mediante los resultados obtenidos de las mezclas de diversos aceites esenciales para la elección del aroma, la formulación más óptima para la elaboración del detergente liquido es el ensayo 2 cuya concentración es de 1.5mL de aceite de hierba luisa y 1ml de aceite de palo santo.

- ✓ Los resultados obtenidos de la CMI en cuanto a los aceites esenciales de *B. graveolens y C. citratus* fue inactivo frente a bacterias y hongos en estudio, es decir no mostraron actividad con ninguno de los microrganismos en las concentraciones máximas evaluadas.

- ✓ Se optimizó la formulación para la elaboración del detergente en base al uso de aceites esenciales de *B. graveolens y C. citratus* a un porcentaje de 10%, 5,5% de ácido dodecilbenceno sulfónico y 0,05% de ácido cítrico, respondiendo a requerimientos como baja espuma, consistencia liquida, pH ácido y aroma agradable, otorgando una aceptabilidad del 100%.

- ✓ Según el análisis microbiológico, se pudo determinar que al aplicar la fórmula detergente sobre el piso limpio inhibió el crecimiento de *S. aureus y P. aeruginosa.*

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda llevar un control del pH con el fin de asegurar que el producto sea el adecuado para eliminar el tipo de suciedad en la zona en la que se pretende usar y de las cantidades de los excipientes al momento de elaborar la fórmula detergente la cual sea de fácil enjuague y lavado al eliminar residuos de suciedad.

- ✓ Se aconseja el uso de detergentes del tipo no corrosivo y compatible con otros materiales; con el fin de asegurar la completa estabilidad de la fórmula elaborada.

- ✓ Integrar más microorganismos de estudio de interés en salud humana, para la evaluación antimicrobiana.

- ✓ Se recomienda realizar un estudio de estabilidad de la fórmula del detergente líquido utilizando el diseño factorial Plackett y Burman para así predecir el periodo de validez bajo condiciones normales de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Ancalmo, E. (2001). Fundamentals of microbiology (6 ed.). Massachusetts: Jonas and Bartlett.

Arteche, A., & Vanaclocha, B. (1998). Vademécum de prescripción Plantas medicinales. Fitoterapia 3.ª ed. .

Bailon, R. (2003). Ingenieria de Conocimientos y Vigilancia Tecnologica Aplicada a la Investigacion en el Campo de los Tensoactivos. Granada.

Bandoni, A. (2002). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su Aprovechamiento Industrial Para la Producción de Aromas y Sabores. Buenos Aires, Argentina.

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. .* Magister en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Berger, R. (2007). Bioprocessing and Sustainability. Flavours and Fragrances. Chemistry.

Briga, J. (1962). Los aromáticos en la industria moderna. 2ª edición. Editorial Sintes. .

Buchbauer, G. (2000). The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. Perfumer & Flavorist.

Cano, C., Bonilla, P., et al. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de Minthostachys mollis (muña). Experimental y Salud Publica, 25(3), 298-301.

Carhuapoma, M. (2006). Estudio de la composicion quimica y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray''' arrayán., Universidad Mayor de San Marcos, Lima-Perú. .

Carroll, B. (1993). Physical aspects of detergency. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, vol 74 (pp. 131-167).

Cerpa, M., Mato, R., et al. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales. Modelado y caracterización. *AIChE Journal, 54(4)*, 909-917.

Cuaspud, M. (2004). Extraccion de aceites esenciales y analisis de posibles compuestos insecticidas de Vetiver (Vetiveria Zinazoide), en la Carolina provinica de Imbabura . Ibarra-Ecuador: Ficaya. .

Diaz, A. (2009). Diseño estadístico de experimentos (2 ed., pp. 714-978). Colombia: Universidad de Antioquía.

Dominguez, J. (1986). Tensioactivos y Detergencia *2*, 166.

Dorado, A. (1996). Detergentes. Universidad Nacional de Educacion a Distancia (pp. 208-209): Lerko Print S.A.

Fourman, G., & Mullen, P. (1993). *Determining Cleaning Validation Acceptance limits for Pharmaceutical Manufacturing Opperations, Pharmaceutical Technology* (Tercera ed.). Mexico

Guardarrama, S. (1999). Introduccion a la Fitoterapia y a la Medicina Tradicional.

Guerra, M., Rodríguez, J., et al. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de Cymbopogon citratus (DC). *Revista cubana de plantas medicinales, 9*, 7.

Hernández, R., & Águeda, M. (2006). *Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos desinfectantes*. Barcelona. Retrieved from http://www.tdx.cat/TDX-0601107-162233

Hidalgo, L., Gutiérrez, M., et al. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de Bursera graveolens y Taxodium mucronatum de Chiapas,Mexico. *10*(Gayana Bot), 7-14.

Jakobi, G., & Lohr, A. (1987). Detergents, En : Kundy, L; Pfefferrkorn, R; ROUNDSAVILLE, JF.(Ed.). *Ullmann´s Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH,5a, A8,Cp 1-3-5,7.9,12,13.p.297.308*.

Jimenez, S., & Fonnegra, R. (2007). Plantas Medicinales aprobadas en Colombia , Medellin: Universidad de Antioquia.

Jumbo, G. (2012). *Investigación en desarrollo de subproductos a partir de aceite esencial de palo santo.* Universidad Técnica Particular de Loja.

Kirsch, B. (1998). Validation of Analytical Methods used in Pharmaceutical Cleaning Assessment and Validation. *Pharma Technol* (2 ed., pp. 11-22). Misisipi.

Kluger, D. (1981). HYgiene en industrie alimentarie. *Henkel France S.A*, 116.

Lemos, T., Matos, T., et al. (1990). Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *4*, 82-84.

Lindgren, A., & Wold, S. (1996). Modelling of detergency performance for some technical nonionic surfactants. *Chermometrics and Intelligent laboratory sistems 32*, 11-132.

Manzano, L., Miranda, M., et al. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de B. graveolens Triana & Planch. (Palo santo) de Ecuador. *Cubana de Plantas Medicinales, 14*, 45-53.

Manzano , P. (2009). *"Potencial fitofármaco de Bursera graveolens sp (Palo Santo), del bosque seco tropical, península de Santa Elena, provincia del Guayas"* Escuela Superior Politécnica del litoral (ESPOL); Campus Gustavo Galindo

Martinez , A. (2003). Aceites Esenciales. Medellin: Universidad de Antioquia.

Martínez, J., Sulbarán, B., et al. (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>.

Moreno, S., Crescente, O., et al. (2009). Composicion quimica y actividad toxica del aceite esencial de Simsia pubescens Triana. Rev. Ciencia y Tecnologia de America. Pag. 745-747.

Orlandi M. (2004). "Piel sana y manto ácido". Dermatología cosmética. Santiago de Chile

Ortuño, M. (2006). "Manual práctico de aceites esenciales aromas y perfumes". Primera edición. Aiyana ediciones. Impreso en España. Págs. 99.

Pino , A., Ortega , L., et al. (1996). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de Lippia alba *Revista Cubana de Farmacia* 30.

Pozo, X., & Naranjo, B. (2006). Extraccion, caracterizacion y determinacion de la actividad antibacteriana y antimicotica del aceite esencial de Hierba Luisa(Cymbopogon Citratus)(DC) stapf. En ingeniero en Biotecnologia, Escuela Politecnica del Ejercito. Ecuador.

Provan, G., Gray, P., et al. (1987). Monoterpenerich resins from some Kenyan Burseraceae *Flavour and Fragance, 2*, 115 -118.

Quiroz, A. (2009). *Utilización de residuos de cascara de naranja para la elaboración de un desengrasante doméstico e industrial.* Universidad Internacional SEK, Quito-Ecuador

Restrepo, A., Guerrero, F., et al. (2008). Elaboración de un ambientador desinfectante *Institución Educativa Integrado Carrasquilla industrial Ciencias* (pp. 11-15). Quibdó - Chocó.

Riba, C. (2002). Diseño concurrente (1 ed., pp. 81-96): Universidad politécnica de Catalunya.

Romero, M. (2004). Tratado de Aromaterapia. Buenos Aires: KIER.

Rzedowski, J., & Calderon , G. (1996). Flora de Verazcruz - BURSERACEAE. Instituto de Ecología. Veracruz, México. ISBN: 968-7213-86-8. Pag. 18-21.

Sachdev, A., & Krishnan, S. (1997). Heavy- Duty Liquid Detergents. En: LAI, K, Y. (ed.). Liquid Detergents Surfactant Science Series. *Vol. 67, Cap.8, p. 206-324*.

Salager, J. (1988). DETERGENTES Componentes, Fabricación, Formulas. Laboratorio de formulación de interfaces reologia y procesos Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. Disponible en: http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S332A_Detergentes.pdf

Salager, J. (2004). Surfactantes III. Surfactantes anionicos.Cuaderno FIRP 5302-PP.Universidad de los Andes. Escuela de Ingenieria Quimica.Merida. Venezuela, 28p

Salas, M., & Zaragocin, R. (2006). Extraccion, caracterizacion fisico quimica y determinacion de componentes 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.

Scott, M., & Jones, M. (2000). Review: The biodegradation of surfactants in the environment.Biochemia et Biophysica Acta, vol.1508 .

Sellés, E. (2000). Estabilidad del Medicamento. En tratado de farmacia galénica (Vol. 1, pp. 59-61). Madrid. (Reprinted from: Copyright).

Seoanez, M. (1996). "Ingeniería del medio ambiente" (Mundi- Prensa ed., pp. 68). Madrid-España. Retrieved from http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/20agua.html.

Soto, R. (2002). Agrotecnología para el cultivo de la caña santa o zacate limón (Cymbopogon citratus). Obtenido de www.monografias.com/trabajos14/zacate-limon/zacate-limon.shtml.

Sun, J. (2007). Safety and Clinical Applications. *Alternative Medicine Review, 12*, 259.

Swaco, M. (2004). Fluidos de Perforación. Houston Texas.

USP. (2010). Farmacopea de los Estados Unidos de América *Formulario Nacional USPNF. Compendios de Normas Oficiales, 1*.

UTPL. (2012) Informe de avance en indicadores propuestos de línea base de proyecto palo santo

Departamento de Química - Sección Ingeniería de procesos. Loja-Ecuador.

Valarezo, E., Morocho, V., et al. (2008). Aceites Esenciales - Plantas aromáticas de sur del Ecuador, *Planta de Productos Naturales UTPL,* pp. 30-33. Retrieved from http://www.alternativesforhealing.com/articles/PALO-SANTO-BURSERA.pdf

White, A. (1981). Hierbas del Ecuador. In E. E. L. Mundi (Ed.), (1 ed., pp. 165-166). Quito-Ecuador.

Wildebrett, G. (2000). Limpieza y Desinfeccion en la industria alimentaria (pp. 362-363): Acribia S.A.

Wilhelm, K., & Fisher, P. (1987). Detergents. En: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH, 5a.Ed., Vol A8. Cap.10 (pp. 408-412).

Zapata, B., Durán, C., et al. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamérica de Micología 2 (vol. 27)*, 101-103.

ANEXOS

ANEXO 1

Determinación de la densidad relativa a 20ºc

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

La presente norma está basada en la norma ISO 279-1981 publicada por la Organización Internacional de Normalización.

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

La presente norma específica el método referido a la determinación de la densidad relativa a 20°C de los aceites esenciales.

REFERENCIAS:

- NF T 75-003 Aceites esenciales-Reglas generales para la preparación.
- NF T 75-110 Aceites esenciales-Preparación de la muestra previa al análisis.

PRINCIPIO:

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20°C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20°C.

NOTA:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de 20°C ± 0.2°C.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

- **Preparación del Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C. Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 minutos ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.
- **Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, luego enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20}=\frac{m_2-m_0}{m_1-m_0}$$

Dónde:

d_{20}^{20}: Densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C.

m_0: masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1: masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2: masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO 2

Determinación del índice de refracción

PRINCIPIO:

Según el tipo de aparato que utilice, la medida directa del ángulo de refracción o la observación del límite de refracción total. El aceite se mantendrá dentro de las condiciones de iso-tropismo y de transparencia.

DEFINICIÓN:

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

APARATOS:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de ± 0.0002.

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de ±0.2°C y debe mantenerse a ±0.2°C.

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Resultados:

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula.

$$n^{t}_{D} = n^{t}_{D} + 0.0004\ (t` - t)$$

Dónde:

ntD = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t, o aquella a la que se ha efectuado la determinación.

F = factor de corrección (0.0004)

t`= temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ±0.0002.

ANEXO 3

Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y *Bursera graveolens*

Para evaluar la actividad biológica se utilizaron 9 microorganismos patógenos; siete son cepas bacterianas y dos son cepas fúngicas. Las cepas utilizadas en esta prueba son de American Type Culture Collection (ATCC), son de referencia internacional y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudio (Martinez et al., 1997).

Se emplearon estos microorganismos debido a que tienen un gran impacto en la salud en el ser humano es decir son causantes de una gran mayoría de enfermedades.

MICROORGANISMOS PATÓGENOS		
CEPAS BACTERIANAS		CEPAS FÚNGICAS
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-positivas	Hongos esporulados
• *Pseudomona aeruginosa ATCC 27853* • *Klebsiella pneumoniae ATCC 9997* • *Escherichia coli ATCC 25922* • *Proteus vulgaris ATCC 8427* • *Salmonella typhimurium LT2*	• *Staphylococcus aureus ATCC 25923* • *Enterococcus faecalis ATCC 29212*	• *Trichophyton mentagrophytes ATCC 28185* • *Trichophyton rubrum ATCC 28188*

Método de microdilución en caldo.

Es un método que posee la ventaja de que se utilizan volúmenes mínimos de la muestra a analizar. Se utiliza una placa que contiene 96 pocillos, en los cuales se realizan diluciones seriadas. Previamente se debe preparar las muestras a utilizar.

- **Preparación de la muestra.**

La muestra de aceite esencial que se va a emplear en este ensayo, debe estar diluida. Con fines de bioprospección se emplea una solución 20 µL de cada aceite de *B. graveolens* y *C. citratus* en 980 µL de Dimetil sulfóxido (DMSO).

- **Preparación del cultivo microbiano "Cultivo overnight"**

Previo a la preparación del inóculo bacteriano, se realizó los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizó 30 µL de cada cepa bacteriana, almacenadas en una reserva criogénica a -80°C. Luego de realizar la siembra de cada cepa se procedió a incubar los medios por 24 horas a 37°C, por esta razón el cultivo se denomina overnight.

- **Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.**

Del cultivo overninght incubado la noche anterior se toma 150-300 µL a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland. De la suspensión anterior se tomó 140 µL y se inoculó en un vial 6,86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de $2x10^6$ UFC/mL. De esta solución final se transfirieron 100 µL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 µL, de forma que en cada pocillo la concentración final es de $5x10^5$ UFC/mL.

- **Concentración mínima inhibitoria antibacteriana (CMI).**

Para realizar correctamente el método de microdilución en caldo y así determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales fue necesaria la limpieza y desinfección de la cámara de trabajo con alcohol etílico al 70% y la exposición a los rayos ultra violeta por 30 minutos con el objetivo de evitar cualquier tipo de contaminación.

La prueba se realizó en placas esterilizadas de 96 pocillos, mediante diluciones dobles seriadas; del caldo Mueller Hinton se transfirió 180 µL a cada pocillo de la primera fila de la placa, en los pocillos restantes se colocó 100 µL del mismo caldo. A continuación se colocó 20 µL de la dilución de aceite esencial más DMSO solo a los pocillos de la primera fila de la placa; excepto a los tres últimos pocillos los cuales van a contener: el primero, 180 µL de caldo Mueller Hinton + 20 µL de aceite diluido conocido como control de esterilidad, el segundo, un control negativo con 180 µL de caldo Muller Hinton + 20 µL de DMSO y finalmente en el tercero un control positivo, que es una mezcla de 180 µL de caldo Muller Hinton + 20 µL de Gentamicina de 0,39 µg/mL para todas las bacterias, excepto para *E. faecalis* y *S. tiphymurium* que se utilizó Gentamicina de 1,95 µg/mL. Para que el medio y la solución de aceite se homogenicen correctamente, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución de todos los pocillos de la primera fila y se tomó 100 µL de la solución homogenizada, luego se diluyó con 100 µL del pocillo siguiente y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se desechan los 100 µL

sobrantes, así la concentración final de cada solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de la placa fue de 10000 a 7,81 µg/mL. El mismo procedimiento fue aplicado con el control positivo, negativo y el control de esterilidad.

Finalmente, ya preparada la placa de microdilución se procede a inocular todos los pocillos (excepto el pocillo que contiene el control de esterilidad) con 100 µL de la suspensión con el inóculo bacteriano. Completando así un volumen final de 200 µL con una población bacteriana de 5×10^5 UFC/mL, para el control de esterilidad se completó el volumen final con 100 µL de caldo Muller Hinton. Al concluir con la inoculación las placas de microdilución se sellan con parafilm y se incuban a 37°C de 18-24 horas.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Básicamente el procedimiento es el mismo que se utilizó en la Concentración mínima inhibitoria antibacteriana, con unas leves variaciones que se describen en los siguientes ítems.

- **Preparación de la muestra**

Se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido) y 20 µL de los aceites esencial de *B. graveolens* y *C. citratus.*

- **Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos**

La suspensión de los microorganismos fúngicos se realizó a partir de cepas almacenadas en reservas criogénicas que se mantienen a una temperatura de -80°C. Se transfirió de las reservas fúngicas 14 µL a un tubo estéril con 7 mL de Caldo Sabouraud, de esta suspensión se tomó 100 µL para completar un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo con una concentración de 5×10^4 esporas/mL.

- **Procedimiento**

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo; en hongos esporulados es de $5x10^4$ esporas/mL y los controles; el positivo que es una solución de 180 µL de caldo Sabouraud más 20 µL de Itraconazol de 0,39 µg/mL el control negativo que consta de 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de DMSO y finalmente Control de esterilidad, que contiene 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de aceite diluido. Cuando las placas de microdilución están inoculadas totalmente, se sellan las cajas con parafilm y se incuban a 28°C por 96 horas.

Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana y antifúngica e interpretación de los resultados.

Una vez retiradas las placas de microdilución de la incubadora, se observa minuciosamente cada caja utilizando luz reflejada; se comienza examinando el control de esterilidad para descartar

cualquier tipo de contaminación, ya que al existir contaminación la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida.

Por otro lado el control positivo nos indica que si habido un crecimiento adecuado, ya sea de las bacterias o los hongos en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet de > 2 mm.

Finalmente en el control negativo no se debe evidenciar ningún rastro de crecimiento, por el contrario debe estar claro y sin turbidez. Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo en el cual se distinga turbidez del medio. Es un proceso manual sin ayuda de ningún aparato óptico.

ANEXO 4

PRUEBAS EXPERIMENTALES PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA FÓRMULA DE DETERGENTE

ANEXO 5

Tabla 5. VALORES F DE LA DISTRIBUCIÓN F DE FISHER

$1 - \alpha = 0.95$ $\quad$ v_1 = grados de libertad del numerador

$1 - \alpha = P(F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$ $\quad$ v_2 = grados de libertad del denominador

v_2 \ v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	242.981	243.905	244.690	245.363	245.949	246.466	246.917	247.324	247.688	248.016
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.433	19.437	19.440	19.443	19.446
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.692	8.683	8.675	8.667	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.844	5.832	5.821	5.811	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.604	4.590	4.579	4.568	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.922	3.908	3.896	3.884	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.494	3.480	3.467	3.455	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.202	3.187	3.173	3.161	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.989	2.974	2.960	2.948	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.828	2.812	2.798	2.785	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.701	2.685	2.671	2.658	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.599	2.583	2.568	2.555	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.515	2.499	2.484	2.471	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.445	2.428	2.413	2.400	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.385	2.368	2.353	2.340	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.333	2.317	2.302	2.288	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.289	2.272	2.257	2.243	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.250	2.233	2.217	2.203	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.215	2.198	2.182	2.168	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.184	2.167	2.151	2.137	2.124
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.156	2.139	2.123	2.109	2.096
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.131	2.114	2.098	2.084	2.071
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.109	2.091	2.075	2.061	2.048
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.088	2.070	2.054	2.040	2.027
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.069	2.051	2.035	2.021	2.007
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	2.052	2.034	2.018	2.003	1.990
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	2.036	2.018	2.002	1.987	1.974
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	2.021	2.003	1.987	1.972	1.959
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	2.007	1.989	1.973	1.958	1.945
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.995	1.976	1.960	1.945	1.932
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.904	1.885	1.868	1.853	1.839
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.850	1.831	1.814	1.798	1.784
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.815	1.796	1.778	1.763	1.748
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969	1.928	1.893	1.863	1.836	1.812	1.790	1.771	1.753	1.737	1.722
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.772	1.752	1.734	1.718	1.703
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938	1.897	1.861	1.830	1.803	1.779	1.757	1.737	1.720	1.703	1.688
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.746	1.726	1.708	1.691	1.676
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878	1.837	1.801	1.769	1.742	1.717	1.694	1.674	1.656	1.639	1.623
500	3.860	3.014	2.623	2.390	2.232	2.117	2.028	1.957	1.899	1.850	1.808	1.772	1.740	1.712	1.686	1.664	1.643	1.625	1.607	1.592
1000	3.851	3.005	2.614	2.381	2.223	2.108	2.019	1.948	1.889	1.840	1.798	1.762	1.730	1.702	1.676	1.654	1.633	1.614	1.597	1.581

Elaborada por Irene Patricia Valdez y Alfaro.