



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Desarrollo y optimización de una loción con propiedad repelente a base de aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*).**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

**AUTORA:** Arias Calvachi, Claudia Patricia.

**DIRECTOR:** Ojeda Riascos, Edgar Santiago. M. Sc.

LOJA - ECUADOR

2017



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

*Septiembre, 2017*

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Master of Science.

Edgar Santiago Ojeda Riascos.

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Desarrollo y optimización de una loción con propiedad repelente a base de aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*)** realizado por **Arias Calvachi Claudia Patricia** ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Marzo de 2017

f) \_\_\_\_\_  
M. Sc. Edgar Santiago Ojeda Riascos

## DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo **Arias Calvachi Claudia Patricia** declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Desarrollo y optimización de una loción con propiedad repelente a base de aceite esencial de Palo santo (*Bursera graveolens*)**, de la titulación de **Bioquímica y Farmacia**, siendo M. Sc. Edgar Santiago Ojeda Riascos director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

f.) \_\_\_\_\_

Srta. Claudia Patricia Arias Calvachi  
1105078768

## DEDICATORIA

A mis amados abuelitos, **Lic. Wilson Bolívar Calvachi Mejía** y **Lcda. Zoila Eufemia Fernández Zapata** porque lo que diga o haga nunca será suficiente para retribuirles todo lo que han hecho por mi.

A mis papis, **Dr. Pablo Nicolás Arias Burneo** e **Ing. Patricia Mylene Calvachi Fernández**, por apoyarme en mis decisiones.

A mis hermanitas, **Ing. María Isabel Arias Calvachi**, **Bq. F. Daniela Elizabeth Arias Calvachi**, **María Belén** y **Ana Paula** ya que son esas mujercitas lindas de cuerpo y alma que me complementan.

A mi princesa **Danna Sofía Álvarez Arias** por hacerme la tía mas feliz del mundo.

A mis mejores amigos por rodearme de energías positivas y creer en mi.

A **Maximus**, **Micaela**, **Lucas**, **Upelkuchen** y **Cleopatra**.

## **AGRADECIMIENTO**

**“Confía y duerme en paz, sabiendo que Dios, tiene todos tus asuntos en sus manos”.**

Es un pensamiento recurrente que tuve durante todo este tiempo en el que estuve a prueba y en el que Dios fue el único que me concedió la serenidad ante cualquier dificultad, la paciencia ante cualquier error y la fortaleza y dicha para demostrar que soy capaz de realizar lo que me propongo.

**“Cuando bebas agua, recuerda la fuente.” Proverbio chino**

En este apartado quiero extender mi agradecimiento y gratitud a quiénes desinteresadamente colaboraron en el cumplimiento de los objetivos propuestos en este trabajo experimental, a quienes gracias a su preparación académica y científica lograron en mi la adquisición de conocimientos y competencias, las cuales me hicieron crecer como persona y me concedieron los lineamientos dentro de mi carrera universitaria hacia un futuro y una especialización cercana.

Al M. Sc. Edgar Santiago Ojeda Riascos.

A la M. Sc. Lupe Carolina Espinoza Tituana.

Al Ph. D. Gianluca Gilardoni.

A la M. Sc. Natalí Elizabeth Solano Cueva.

Al Mgtr. José Vinicio Montesinos Jaramillo.

A la Bq. Adriana Jara.

Al M. Sc. Luis Emilio Cartuche Flores.

Al Ph. D. Pablo Ancelmo Ramón Contento.

Al Ing. James Willam Calva.

Al Bgo. Diego Stalin Marín Armijos.

Al Ing. Holger Isidro Jaramillo Encalada.

Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1.....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Familia Burseraceae.....	6
1.2. Especie Bursera.....	6
1.3. Perfil botánico de la especie <i>Bursera graveolens</i> .....	7
1.4. Usos de la especie <i>Bursera graveolens</i> .....	7
1.5. Composición química del aceite esencial de la especie <i>Bursera graveolens</i> .....	8
1.6. Limoneno.....	8
1.7. Aceites esenciales.....	8
1.7.1. Obtención de los aceites esenciales.....	9
1.7.2. Componentes mayoritarios contenidos en los aceites esenciales.....	10
1.7.3. Variables naturales en la composición de las plantas que afectan el contenido de aceite esencial.....	10
1.7.4. Mecanismo de acción.....	11
1.7.5. Aplicaciones.....	11
1.8. Repelentes.....	11
1.8.1. Especies vegetales con potencial repelente.....	12
1.8.2. Metabolitos naturales responsables de la actividad repelente.....	12
1.8.3. Metabolitos sintéticos responsables de la actividad repelente.....	12
1.8.3.1. Picaridina.....	12
1.8.3.2. DEET ( <i>N, N</i> - diethyl- <i>m</i> -toluamida).....	12
1.8.4. Efecto y concentración de los aceites esenciales utilizados en repelentes.....	13
1.9. Fitocosméticos.....	13
1.9.1. Propiedades de los fitocosméticos.....	14
1.10. La piel.....	14
1.11. Formas farmacéuticas líquidas de aplicación tópica .....	15

1.11.1. Lociones.....	15
1.11.1.1 <i>Loción solución</i> .....	15
<b>1.12. Excipientes.....</b>	<b>15</b>
1.12.1. Descripción y concentración de los excipientes principales de los productos repelentes.....	16
1.12.2. Descripción y concentración de los excipientes usados en la formulación.....	16
<b>1.13. Método de manufactura.....</b>	<b>17</b>
<b>1.14. Especificaciones para el envasado.....</b>	<b>17</b>
1.14.1. Material de acondicionamiento.....	17
1.14.2. Etiquetado.....	18
<b>1.15. Estudios de preformulación.....</b>	<b>18</b>
1.15.1. Propiedades Físico – Químicas.....	19
1.15.1.1 <i>Caracteres organolépticos</i> .....	19
1.15.2. Solubilidad.....	19
1.15.3. pH.....	20
1.15.4. Índice de refracción.....	20
1.15.5. Densidad.....	20
1.15.6. Viscosidad.....	20
<b>1.16. Estabilidad farmacéutica.....</b>	<b>21</b>
1.16.1. Condiciones de Estabilidad.....	21
1.16.2. Tipos de Estabilidad.....	22
<b>1.17. Determinación del periodo de vida útil.....</b>	<b>22</b>
<b>1.18. Pruebas de repelencia.....</b>	<b>23</b>
<b>1.19. Pruebas microbiológicas.....</b>	<b>23</b>
<b>1.20. Pruebas toxicológicas.....</b>	<b>24</b>
<b>1.21. Interpretación analítica de los datos.....</b>	<b>24</b>
<b>1.22. Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.....</b>	<b>24</b>
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>25</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Obtención del material vegetal.....</b>	<b>26</b>
2.1.1. Método de extracción del aceite esencial.....	26
<b>2.2. Estudios de preformulación.....</b>	<b>26</b>
2.2.1. Análisis cualitativos y cuantitativos del principio activo.....	26
2.2.1.1 <i>Condiciones del equipo</i> .....	27
<b>2.3. Parámetros Organolépticos y Físico- Químicos del principio activo.....</b>	<b>28</b>
2.3.1. Determinación de la solubilidad.....	28
2.3.2. Determinación del Índice de refracción.....	29
2.3.3. Determinación de la densidad.....	29
2.3.3.1 <i>Procedimiento</i> .....	29
<b>2.4. Parámetros Físico- Químicos de los excipientes.....</b>	<b>29</b>
2.4.1. Determinación de la solubilidad.....	29
<b>2.5. Estudio de compatibilidad aceite esencial – excipiente mediante el diseño experimental de mezclas binarias.....</b>	<b>30</b>
2.5.1. Fundamento.....	30

2.5.2. Composición de las mezclas.....	30
2.5.3. Elaboración y acondicionamiento de las muestras.....	31
2.5.4. Tiempo de análisis.....	32
<b>2.6. Ensayo de actividad repelente para determinar la concentración del producto.....</b>	<b>32</b>
2.6.1. Procedimiento.....	33
<b>2.7. Formulación. ....</b>	<b>34</b>
2.7.1. Protocolo de elaboración de la loción repelente.....	35
<b>2.8. Ensayos de estabilidad del producto terminado .....</b>	<b>36</b>
<b>2.9. Predicción de la vida útil de la loción repelente con el método de Arrhenius como estudio de estabilidad acelerada. ....</b>	<b>36</b>
<b>2.10. Control de calidad de la loción repelente.....</b>	<b>36</b>
2.10.1. Parámetros Físico- Químicos y Organolépticos.....	37
2.10.1.1. Determinación de la densidad.....	37
2.10.1.2. Determinación del pH.....	37
2.10.1.3. Determinación de la viscosidad.....	37
2.10.2. Pruebas microbiológicas.....	37
2.10.3. Pruebas de actividad repelente.....	38
<b>2.11. Bioensayo de toxicidad dérmica aguda de la loción repelente.....</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Valoración cualitativa y cuantitativa del principio activo.....</b>	<b>40</b>
3.1.1. Identificación y cuantificación de los compuestos por CG – EM y CG - FID. ....	40
<b>3.2. Preformulación. ....</b>	<b>42</b>
3.2.1. Solubilidad del principio activo.....	42
3.2.2. Solubilidad de los excipientes.....	43
<b>3.3. Estudio de compatibilidad aceite esencial - excipiente mediante el diseño experimental de mezclas binarias.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Formulación de la loción repelente.....</b>	<b>48</b>
3.4.1. Fórmula de composición.....	48
<b>3.5. Bioensayo de actividad repelente.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6. Resultados de las pruebas de estabilidad.....</b>	<b>50</b>
<b>3.7. Determinación de la vida útil.....</b>	<b>53</b>
<b>3.8. Control de calidad de la loción repelente.....</b>	<b>53</b>
3.8.1. Análisis organolépticos.....	53
3.8.2. Análisis físico – químicos.....	54
3.8.3. Análisis microbiológicos.....	57
3.8.4. Test de repelencia del producto elaborado al 2 %.....	58
<b>3.9. Toxicidad dérmica aguda del repelente.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la especie *Bursera graveolens*.
- Tabla 2.** Terminología indicativa para describir las propiedades organolépticas.
- Tabla 3.** Condiciones de estabilidad para productos farmacéuticos terminados.
- Tabla 4.** Zonas climáticas a nivel mundial.
- Tabla 5.** Tipos de microorganismos y medios usados para el control microbiológico.
- Tabla 6.** Grado de solubilidad mediante términos descriptivos.
- Tabla 7.** Listado de excipientes.
- Tabla 8.** Asignación de las muestras en los viales ámbar.
- Tabla 9.** Condiciones del ensayo de repelencia.
- Tabla 10.** Clasificación en grados de repelencia.
- Tabla 11.** Diseño de la fórmula para la loción repelente.
- Tabla 12.** Datos de los hidrocarburos utilizados en los análisis.
- Tabla 13.** Compuestos identificados a partir del Índice de Kóvats.
- Tabla 14.** Partes de disolvente para diluir el pa.
- Tabla 15.** Excipientes disueltos en agua y etanol.
- Tabla 17.** Cantidad de limoneno existente en el aceite - mes 1.
- Tabla 18.** Cantidad de limoneno existente en el aceite - mes 2.
- Tabla 19.** Compatibilidad con Propilenglicol mes 1 y 2.
- Tabla 17.** Compatibilidad con Carboxi metil celulosa mes 1 y 2.
- Tabla 20.** Compatibilidad con Benzoato de sodio mes 1 y 2.
- Tabla 21.** Compatibilidad con Aloe vera mes 1 y 2.
- Tabla 22.** Compatibilidad con Polisorbato 80 mes 1 y 2.
- Tabla 23.** Compatibilidad con Ácido bórico mes 1 y 2.
- Tabla 24.** Compatibilidad con Etanol mes 1 y 2.
- Tabla 25.** Resumen de los estudios de compatibilidad entre el principio activo y los excipientes.
- Tabla 26.** Cálculos para determinar la fórmula unitaria y la fórmula de manufactura.
- Tabla 27.** Datos por hora de repelencia.
- Tabla 28.** Cantidad de limoneno presente en el aceite esencial de Palo Santo.

- Tabla 29.** Estabilidad del repelente mes 0.
- Tabla 30.** Estabilidad del repelente mes 1.
- Tabla 31.** Estabilidad del repelente mes 2.
- Tabla 32.** Estabilidad del repelente mes 3.
- Tabla 33.** Resumen de los ensayos de estabilidad.
- Tabla 34.** Cinética de degradación de orden 0.
- Tabla 35.** Resultados de las análisis organolépticos.
- Tabla 36.** Resultados de las pruebas fisicoquímicas.
- Tabla 37.** Resultados de los análisis ANOVA del pH.
- Tabla 38.** Resultados de los análisis ANOVA de la densidad.
- Tabla 39.** Resultados de los análisis ANOVA de la viscosidad.
- Tabla 40.** Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre pH vs. tiempo.
- Tabla 41.** Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre densidad vs. tiempo.
- Tabla 42.** Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre viscosidad vs. tiempo.
- Tabla 43.** Resultados de las pruebas microbiológicas.
- Tabla 44.** Porcentaje de repelencia a temperatura ambiente  $\pm 2$ .
- Tabla 45.** Porcentaje de repelencia a 30 °C  $\pm 2$ .
- Tabla 46.** Porcentaje de repelencia a 40 °C  $\pm 2$ .
- Tabla 47.** Peso documentado de las ratas (hembras).
- Tabla 48.** Peso documentado de las ratas (machos).
- Tabla 49.** Niveles de dosis y mortalidad.
- Tabla 50.** Observaciones macroscópicas.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Árbol y frutos de Palo Santo.

**Gráfico 2.** Estructura de la piel.

**Gráfico 3.** Destilador cleavenger.

**Gráfico 4.** Equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrofotometría de Masas.

**Gráfico 5.** Disolventes utilizados en las pruebas de solubilidad.

**Gráfico 6.** Almacenamiento de los disolventes en viales de vidrio.

**Gráfico 7.** Cromatograma del aceite esencial.

**Gráfico 8.** Loción repelente elaborada al 2%.

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Arroceras en el sector Vadeal en Macará.
- Anexo 2.** Trampa de luz con malla para atrapar mosquitos.
- Anexo 3.** Agares para recuento microbiano.
- Anexo 4.** Cajas petri – test de actividad repelente.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo experimental fue elaborar una loción repelente cuyo principio activo (pa) es el aceite esencial de palo santo, evaluando la interacción entre el principio activo y 7 excipientes por medio del diseño experimental de mezclas binarias, revelando que 3 componentes muestran más interacción con el limoneno (compuesto mayoritario 68% y aquel que posee la actividad repelente). Los análisis del aceite y de la loción se hicieron en un CG-EM. Al estudiar la efectividad repelente se dedujo que de cuatro concentraciones probadas (0.5% - 1% - 2% - 3%); la loción elaborada al 2% es aquella que brinda protección hasta un 80% contra mosquitos del género *Aedes aegypti*. Como parte de los estudios de estabilidad del producto, el limoneno se degrada más del 10% cuando las lociones son almacenadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  respectivamente. Adicionalmente, los bioensayos microbiológicos y de toxicidad dérmica aguda demuestran que la fórmula repelente al ser ensayada en ratas no produce efectos secundarios, y carece de elementos patógenos que pongan en riesgo su salud.

**PALABRAS CLAVE:** palo santo, *Bursera graveolens*, CG – EM, mezclas binarias, compatibilidad, formulación, loción repelente, estabilidad.

## ABSTRACT

The aim of this experimental work was to elaborate a repellent lotion whose active principle (pa) is the essential oil of holly wood, evaluating the interaction between the active principle and 7 excipients using the experimental design of binary mixtures, showing that 3 components interacts with limonene (majority compound 68% and the one owing the repellent activity). The analysis of oil and lotion was done in a GC-MS. When studying the repellent effectiveness, four concentrations were tested (0.5% - 1% - 2% - 3%); the lotion elaborated at 2% is the one that provides protection up to 80% against *Aedes aegypti* mosquitoes. As part of the stability studies of the product, limonene degrades more than 10% when the lotions are stored at 30 °C ± 2 and 40 °C ± 2 respectively. Additionally, microbiological and acute dermal toxicity bioassays demonstrate that the formula when tested in rats produces no side effects, and lacks pathogenic elements that could put your health in risk.

**KEYWORDS:** holly wood, *Bursera graveolens*, GC – MS, binary mixtures, compatibility formulation, lotion repellent, stability.

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son los insectos más importantes en términos de salud pública ya que son transmisores de enfermedades como el dengue, fiebre chikungunya, zika, filariasis y malaria, causando la muerte de 700.000 personas al año. Los mosquitos comprenden 3.500 especies y se encuentran en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Kalita, Bora, & Sharma, 2013). Los géneros ***Aedes aegypti***, ***Anopheles*** y ***Culex quinquefasciatus*** son los tres vectores principales, cuyas picaduras causan respuestas alérgicas en la piel incluyendo reacciones locales y sistémicas (Sritabutra & Soonwera, 2013).

Los datos estadísticos más actuales en Ecuador revelan que en el año 2010 se reportaron 1.888 casos de malaria, mientras que en el año 2014 se reportaron tan solo 241 casos. Estas cifras van disminuyendo notablemente gracias a los sistemas de fumigación y a las medidas preventivas tomadas por la población ("GHO | By country | Ecuador - statistics summary (2002 - present). Por lo tanto, la protección frente a las picaduras de mosquitos es esencial y se alcanza evitando hábitats infestados, utilizando ropa adecuada y repelente contra insectos (Fradin & Day, 2002).

Los repelentes comerciales ya sean elaborados a base de químicos sintéticos o de aceites esenciales derivados de las plantas (Fradin & Day, 2002) son sustancias que actúan localmente o a distancia creando una barrera protectora y disuadiendo a los mosquitos de picar la piel humana (Nerio, Olivero, & Stashenko, 2010).

A través de la investigación científica se abre un nuevo espacio a los aceites esenciales, evaluando su efecto por medio de pruebas *in vitro* e *in vivo* en tejidos vivos (Arapa, 2010). En general, los aceites esenciales de las plantas han sido reconocidos como reservorio natural de insecticidas debido a que algunos son selectivos, biodegradables a productos no tóxicos y tienen pocos efectos colaterales en otros organismos y en el medio ambiente (Sritabutra & Soonwera, 2013).

La resina de ***Bursera graveolens*** ha sido usada en medicina tradicional como un analgésico y su exudado en alcohol para combatir el reumatismo (Leyva, Jairo, & Stashenko, 2007).

La importancia de esta investigación radica en minimizar el problema actual que deriva en las enfermedades producidas por vectores patógenos, disminuyendo el impacto y las consecuencias en la salud pública; enfocándose en desarrollar una loción repelente líquida cuyos componentes sean compatibles y su formulación sea estable, inocua y efectiva en donde se incorpore el aceite de la especie *Bursera graveolens* como principio activo. Esta fórmula repelente estará avalada por los ensayos, pruebas analíticas y pruebas estadísticas que comprueben que constituye un producto seguro y eficaz que sustente a su vez el aprovechamiento de los fitocosméticos y subproductos elaborados a partir del aceite de esta especie (Santana et al., 2009). Esta investigación se encuentra dividida en 3 capítulos que comprenden: 1) el marco teórico (conceptos fundamentales), 2) los métodos empleados en la investigación y 3) los resultados obtenidos así como su análisis y conclusiones.

El equipo utilizado en la ejecución de este trabajo es la cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas (CG – EM) para realizar la valoración del aceite y como parte del control de calidad del repelente para determinar si existe o no una degradación significativa del principio activo.

El diseño experimental de mezclas binarias del principio activo con un único excipiente nos permite conocer la interacción entre los componentes. Se lleva a cabo al almacenar el producto a tres temperaturas: ambiente  $\pm 2$ , 30 °C  $\pm 2$  y 40 °C  $\pm 2$  y a dos humedades relativas: 43%  $\pm 5$  y 75%  $\pm 5$ , determinando los componentes más estables para la formulación final. Adicionalmente se realizaron pruebas de estabilidad, físico químicas, microbiológicas y ensayos de toxicidad dérmica aguda en ratas en donde el producto estuvo en contacto directo con la piel de los animales, demostrando que no produce reacciones adversas, y que es seguro para el uso en seres humanos.

Finalmente, se debe tomar en cuenta que los repelentes a base de aceites esenciales tienen una efectividad limitada que depende de su grado de volatilidad y tiempo de exposición (Nerio et al., 2010), por lo que se evaluó también la efectividad del producto elaborado, utilizando como referencia el Test de (Talukder & Howse, 1993) en donde se calcula el porcentaje de repelencia poniendo a prueba distintas concentraciones del producto.

**CAPITULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

### 1.1. Familia Burseraceae.

La familia Burseraceae está compuesta por 11 géneros (Rzedowski, Median, & Calderón, 2004). Está distribuida en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo. El género **Bursera** comprende cerca de 40 especies y se conoce que las plantas producen una resina rica en terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos) pero raramente diterpenoides (Moreno, Rojas, Aparicio, Marcó, & Usubillaga, 2010).

Son árboles o arbustos de hasta 15 metros de alto, caducifolios, resino- aromáticos, dioicos o polígamo-dioicos rara vez hermafroditas, con un tronco de 40 cm. La corteza externa de las partes lignificadas está provista de una capa de color gris y ramillas rojizas. Las hojas sin estípulas, son fasciculadas en los extremos, precedidas por una roseta de catafilos oblongos a ovalados de 4 a 8 mm de largo. Florecen por lo general antes o al mismo tiempo que van apareciendo las hojas (Rzedowski et al., 2004).

### 1.2. Especie Bursera.

**Bursera graveolens** es una árbol nativo propio del bosque seco (Manzano, 2013). Se encuentra distribuido desde México hasta Perú (Yukawa, Iwabuchi, Kamikawa, Komemushi, & Sawabe, 2004). Crece en los bordes de quebradas cercanas al mar, en montañas bajas y medias en la costas ecuatorianas y peruanas convirtiéndolo en el lugar propicio para la evolución y adaptación de especies vegetales y animales únicos en el mundo (Santana et al., 2009) (**Ver Gráfico 1**).

**Gráfico 1.** Árbol y frutos de Palo Santo.



**Fuente:** Cultura Guaraní: El palo santo.

**Elaboración:** La autora.

En la literatura se encuentran identificados los componentes responsables del aroma, la característica picante, dulce y el olor balsámico. El limoneno forma parte de estos componentes y se encuentra en los tallos, hojas y frutos (Santana et al., 2009).

### 1.3. Perfil botánico de la especie *Bursera graveolens*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la especie *Bursera graveolens*.

Taxonomía	
Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Rosanae
Orden	Sapindales
Familia	Burseraceae
Género	<b>Bursera</b>
Especie	<b><i>Bursera graveolens</i></b>
Nombre común	Palo Santo

**Fuente:** [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org).

**Elaboración:** La autora.

### 1.4. Usos de la especie *Bursera graveolens*.

El palo santo ha sido utilizado desde épocas remotas por las poblaciones locales para curar dolores estomacales y como linimento para reumatismos. Tiene propiedades antibacterianas, analgésicas, sedativas y antineoplásicas (Manzano, 2013).

La madera seca tiene fuertes características picantes, dulces y un olor balsámico que es utilizado como incienso en las iglesias donde se lo conoce como palo santo (Yukawa et al., 2004). Se le atribuyen también las bondades etnomédicas: para la fatiga y latidos irregulares del corazón (Melorose, Perroy, & Careas, 2015).

Actualmente de los extractos de *Bursera* se reporta actividad inhibitoria de la células HT 1080 del fibrosarcoma, lo cual motiva a los especialistas a continuar indagando sus propiedades para ser usadas en beneficio de la salud (Manzano, 2013).

### **1.5. Composición química del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens*.**

En una investigación realizada por (Yukawa et al., 2004) se aislaron 5 componentes cuyas estructuras fueron dilucidadas por NMR: el primero llamado 5,11-epoxy-4  $\alpha$ ,5  $\beta$ ,10 $\alpha$ -eudesm-1-ene es un nuevo sesquiterpenoide que no ha sido descrito antes en la literatura. Los compuestos: 4  $\alpha$ -hydroxydihydroagarofuran, 3  $\beta$ , 4  $\beta$  oxidoagarofuran y 10-epi-  $\gamma$ -eudesmol también son reportados por los autores por primera vez en la especie *B. graveolens*.

En otra investigación realizada por (Manzano, 2013) en nuestro país, se describen los siguientes componentes:  $\alpha$  pinene, limonene, mentofurano, terpinen – 4 – olo,  $\alpha$  terpineolo, carvone, así como los triterpenos lupeol y epi lupeol que tienen propiedades antineoplásicas.

### **1.6. Limoneno.**

El limoneno es un monoterpeno mono cíclico con olor a limón y el mayor constituyente en varios aceites cítricos (naranja, limón, mandarina, lima) (Sun, 2007).

Existen dos isómeros ópticos: d y l – limoneno que se usan en la industria como disolventes de pintura, para la limpieza de aparatos electrónicos y como aditivo en la industria alimenticia y de perfumería (Dormer, W. Gomes, R. Meek, 1998). En 1994 el limoneno fue registrado como un ingrediente pesticida y larvicida activo en 15 productos incluido en repelentes de mosquitos de uso humano (Hollingsworth,2005).

### **1.7. Aceites esenciales.**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles producidos como metabolitos secundarios y son los responsables del olor distintivo en las plantas y de sus bioactividades (Nerio et al., 2010).

Son insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, en solventes no polares o medianamente polares, en éter, en aceites vegetales y minerales. Están constituidos por hidrocarburos alicíclicos y aromáticos así como sus derivados oxigenados, por ejemplo, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico y se los cataloga como terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos.

En el año 1850 los avances de la química orgánica sintética y el análisis de los componentes de algunos aceites, llevó a la producción de los mismos sintéticamente (Ortuño, 2006).

### ***1.7.1. Obtención de los aceites esenciales.***

Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias y por lo tanto constituyen la materia prima para su obtención, ya sea empleando toda la planta o solo sus hojas (menta, romero), flores (manzanilla, lavanda), frutos (pimienta, nuez moscada) o raíces (valeriana, angélica). Los aceites esenciales se encuentran en concentraciones pequeñas, por lo tanto son difíciles de obtener y es necesaria una gran cantidad de material vegetal (Ortuño, 2006).

Los aceites contenidos dentro de las plantas son liberados a través de calor o presión ejercida sobre las hojas, flores, frutos, hierbas, raíces y madera. Puede llevarse a cabo mediante varios métodos, uno de los más utilizados es la hidrodestilación por arrastre de vapor, el cual concentra un rendimiento alto en hidrocarburos terpénicos. Otros métodos incluyen la extracción con solventes derivados del petróleo (componentes sensibles al calor), infusiones acuosas y con fluidos supercríticos (no altera la composición del aceite esencial, ni deja residuos de disolventes). Así la composición química del aceite ya sea cualitativa o cuantitativa difiere de acuerdo a la técnica de extracción (Djilani & Dicko, 2012). El perfil aromático también puede variar dependiendo del método de extracción (Ortuño, 2006).

### ***1.7.2. Componentes mayoritarios contenidos en los aceites esenciales.***

Los constituyentes mayoritarios son hidrocarburos que alcanzan del 75 al 90% (por ejemplo pineno, limoneno, bisaboleno), seguido de cantidades menores de alcoholes (linalol, mentol), ácidos (ácido benzoico, ácido geránico), aldehídos (citrinal), aldehídos cíclicos (cuminal), cetonas (camphor, tujona), lactonas (bergapteno), fenoles (eugenol, éteres fenólicos (anethole), óxidos (1,8 cineole) y ésteres (acetato de geranilo, acetato de linalilo). Todos estos compuestos se clasifican en dos categorías: terpenoides y fenilpropanoides. Existen otros componentes en los aceites esenciales que no están relacionados con su aroma pero tienen importancia como conservantes, antibióticos o fijadores del aroma (Djilani & Dicko, 2012).

Los terpenos son inodoros y contribuyen escasamente al aroma global, pero si le confieren volatilidad y sus propiedades físicas. En cuanto a los grupos funcionales de tipo cetona, éster, alcohol y aldehído que se encuentran en menor proporción en estado puro presentan un aroma característico, que en conjunto determinan el aroma de ciertas frutas (Ortuño, 2006).

### ***1.7.3. Variables naturales en la composición de las plantas que afectan el contenido de aceite esencial.***

El contenido de aceite esencial total varía en las plantas y la mayoría de ellos carecen de color o son amarillos pálidos y de carácter volátil cuya densidad no es mayor a la del agua (Djilani & Dicko, 2012).

Las fragancias y la composición química pueden cambiar de acuerdo a la locación geo-climática y a las condiciones de crecimiento (tipo de suelo, clima, altitud y cantidad de agua disponible), temporada (antes o después de la floración), día y hora de cosecha y factores genéticos y biogenéticos propios de la planta. Por lo tanto, todos estos factores tienen influencia sobre la síntesis bioquímica de los aceites esenciales. La misma especie de planta puede producir un aceite similar, sin embargo, con una composición química diferente dada por los diferentes quimiotipos (Andrade, Alves, Guimarães, Carreira, & Maia, 2011).

#### **1.7.4. Mecanismo de acción.**

Hasta ahora no hay un estudio que concluya sobre el modo de acción de los aceites esenciales. Dado a su complejidad y su composición química, todo sugiere que el modo de acción es complejo y la vía molecular de acción es difícil de identificar. Se piensa que cada constituyente tiene su propio mecanismo de acción (Djilani & Dicko, 2012).

#### **1.7.5. Aplicaciones.**

Los aceites esenciales, resinas y extractos ya eran utilizados desde la antigüedad por los egipcios. Paracelso, en el siglo XVI, los empleó en medicamentos y los consideró como la quintaesencial o el elemento inmaterial presente en todo ser (Ortuño, 2006).

Aproximadamente 3000 aceites esenciales son conocidos y 300 de ellos tienen importancia comercial en la cosmética (perfumes, jabones), desinfectantes, repelentes, comida e industria farmacéutica (Nerio et al., 2010).

En 1881, De la Croix demostró los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales en los componentes fenólicos. Además se tiene referencia de las propiedades antivirales, antimicóticas y antiparasitarias relacionadas con la función de sus metabolitos. En el campo de la aromaterapia constituye el 2% del mercado total. También son usados como saborizantes ya sean extraídos de un vegetal o sintéticamente manufacturados. Del aceite de romero se extrae el conservante “DMD Base natural” que ya es reconocido por la FDA como un aditivo seguro para el consumo humano (Burt, 2012).

#### **1.8. Repelentes.**

Los repelentes son sustancias que actúan localmente o a distancia bloqueando los receptores de los mosquitos de manera que pierdan el contacto químico con el huésped. También actúan enmascarando el olor humano utilizando una esencia que los mosquitos naturalmente evitan (Patel, Gupta, & Oswal, 2012). Estos pueden ser de origen natural o sintético (Nerio et al., 2010).

### **1.8.1. Especies vegetales con potencial repelente.**

Actualmente se ha registrado que los aceites obtenidos de la albahaca (*Ocimum basilicum*), del apio (*Apium graveolens*), del geranio (*Pelargonium graveolens*), del romero (*Rosmarinus officinalis*) y de la menta (*Menta piperita*) (Patel et al., 2012) así como los aceites de citronella, limón y eucalipto son usados como ingredientes en los repelentes naturales para ser aplicados sobre la piel. Estos productos naturales han sido frecuentemente usados debido a su relativa baja toxicidad, eficacia comparable y aceptación por parte del consumidor (Nerio et al., 2010).

### **1.8.2. Metabolitos naturales responsables de la actividad repelente.**

Algunos monoterpenos presentes en el palo santo como el  $\alpha$  pineno, cineol, eugenol, limoneno, terpinoleno, citronelol, citronelal, camphor y timol son algunos constituyentes que en literatura presentan actividad repelente antimosquito (Nerio et al., 2010). Las propiedades repelentes parecen estar asociadas con la presencia de monoterpenoides y sesquiterpenos (Jantan & Zaridah, 1998).

### **1.8.3. Metabolitos sintéticos responsables de la actividad repelente.**

#### **1.8.3.1. Picaridina.**

La picaridina también llamada KBR 3023 es un compuesto con actividad repelente de larga duración, de la familia de las piperidinas cuya protección es de 94,7% elaborado al 19,2% (Mazzieri, 2014).

Fue desarrollada en Estados Unidos en el año 2005 como una alternativa al DEET. Su concentración en productos farmacéuticos va desde el 7 al 20% como ingrediente activo (Kalayci, Demirci, & Sahin, 2014).

#### **1.8.3.2. DEET (N, N- diethyl-m-toluamida).**

Varios químicos sintéticos han sido desarrollados para proteger a los humanos de las picaduras de mosquitos, siendo el DEET no sólo un repelente de amplio espectro, también el más efectivo

y persistente sobre la piel. Es usado por el 30% de la población. Existen estudios que demuestran su alta toxicidad, por lo que se torna importante incrementar los esfuerzos en buscar repelentes de origen natural, que sean seguros y amigables con el medio ambiente (Nerio et al., 2010).

#### **1.8.4. Efecto y concentración de los aceites esenciales utilizados en repelentes.**

Algunos repelentes elaborados a base de plantas se comparan o son aun mejores que los repelentes sintéticos, aunque las formulaciones que contienen aceites esenciales tienen efectividad limitada lo que depende de su grado de volatilidad (Nerio et al., 2010). Se espera que a mayor concentración, mayor efecto. Las bajas concentraciones (5 – 10%) deben usarse cuando el periodo de exposición a los mosquitos es de 1 a 3 horas o se debe repetir la aplicación (hasta cinco horas) para obtener una protección completa (Wisconsin, 2011).

El aceite de citronella (*Cymbopogon nardus*) elaborado al 5 y 10% protege durante dos horas (Ferreira-Maia & Moore, 2011). El aceite de geraniol elaborado al 25% protege hasta 4 horas. El aceite de fréjol elaborado al 2% protege de 5 a 8 horas (Barnard & Xue, 2004). Se conoce que algunos aceites esenciales tienen efecto sinergista, es decir, que combinados con otros aceites potencian la actividad repelente brindando mayor protección.

#### **1.9. Fitocosméticos.**

La fitocosmética es una alternativa natural, cuyos productos son elaborados con materias vegetales para el cuidado de la piel, uñas y el cabello. El nombre deriva de las palabras griegas “*kosmein*” (decorar) y “*fitos*” (plantas), y consiste en la utilización de principios activos de origen vegetal en productos cosméticos. Los diferentes extractos botánicos vegetales han sido los ingredientes más comunes en los productos de belleza más antiguos como lo demuestran las farmacopeas de África, China, Europa y América. Los ingredientes botánicos se combinaban con otros compuestos para buscar un efecto sinérgico, pero también para preservar el secreto del principio activo que contenían (Valgreen, 2009).

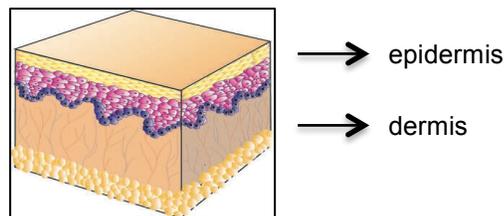
### **1.9.1. Propiedades de los fitocosméticos.**

Las propiedades dermatológicas de los fitocosméticos actúan como: tonificantes, astringentes, antiinflamatorias, antisépticas, cicatrizantes, detergentes, suavizantes, calmantes, emolientes, descongestionantes, refrescantes, etc (Sevillano et al., 2012).

### **1.10. La piel.**

La piel es una barrera física de alrededor de 2 metros que nos protege del ambiente. Es esencial para la regulación de la temperatura corporal. La anatomía de la piel está compuesta por tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis. El espesor de las capas varía en las diferentes partes del cuerpo (Burlando, Verotta, Cornara, & Bottini, 2010) **(Ver Gráfico 2).**

**Gráfico 2.** Estructura de la Piel



**Fuente:** Handbook of Cosmetic SkinCare. (2009).

**Elaboración:** La autora.

La epidermis es la capa más externa y su propósito es generar el estrato corneo compuesto por células muertas que protege contra la deshidratación, las infecciones y el daño causado por sustancias extrañas. Se estima que la epidermis se renueva cada 45 o 75 días (Tobergte & Curtis, 2013).

Las funciones de la piel comprenden la regulación de la temperatura corporal, la producción de vitamina D, (Shai, Avi Maibach, Howard Baran, 2009), la regulación de la percepción sensorial del calor, frío y dolor (Tobergte & Curtis, 2013).

## **1.11. Formas farmacéuticas líquidas de aplicación tópica.**

Existe una gran cantidad de productos de aplicación sobre la piel que corresponden a las diferentes formas farmacéuticas de uso dermatológico, diferenciándose entre sí por su consistencia y caracteres reológicos. Entre ellas se encuentran: aerosoles, lociones, linimentos, geles, jaleas, cremas dérmicas, ungüentos (Fauli, 2000).

### **1.11.1. Lociones.**

Proviene del latín "lotionis" que significa lavado. Se tratan de dispersiones líquidas con sólidos finalmente divididos y mantenidos en suspensión con ayuda de tensoactivos y espesantes. Se clasifican en loción solución y loción suspensión (Fauli, 2000).

#### **1.11.1.1. Lociones Solución.**

Son soluciones acuosas con el o los principios activos disueltos en su matriz, destinados a ser aplicados en un volumen relativamente elevado sobre una amplia superficie cutánea (Fauli, 2000).

Las lociones pueden clasificarse también de acuerdo a:

- **El lugar de aplicación:** lociones faciales, para el cuello, corporales.
- **Según su aspecto:** tónicas, astringentes, emolientes, estimulantes, blanqueadoras.
- **A su forma de presentación:** emulsiones, soluciones, suspensiones (Salvador et al., 2011).

## **1.12. Excipientes.**

Un excipiente es una sustancia o componente que está diseñado para ser usado en una forma farmacéutica (Who, 2009).

### ***1.12.1. Descripción y concentración de los excipientes principales de los productos repelentes.***

- **Cosolventes:** capaces de adecuar la constante dieléctrica del principio activo a la del excipiente mayoritario, lo cual facilita la solubilización. Se emplean soluciones hidroalcohólicas o el empleo de glicoles (Fauli, 2000).
- **Tensoactivos:** usados cuando los principios activos son hidrófobos y se requiera una solubilización micelar a fin de garantizar un reparto homogéneo del principio activo en la totalidad del volumen preparado (Fauli, 2000).
- **Conservantes:** se usa cuando existe la posibilidad de contaminación fúngica o bacteriana (Fauli, 2000).
- **Antioxidantes:** debido a la estructura molecular de los aceites esenciales (presencia de doble enlaces y grupos funcionales como hidroxilo, aldehído, éster) estos son fácilmente oxidables por la luz, el calor o el aire, por lo tanto se debe incorporar un antioxidante (Djilani & Dicko, 2012).

### ***1.12.2. Descripción y concentración de los excipientes usados en la formulación.***

- **Propilenglicol:** es un líquido tornasolado y viscoso utilizado como humectante y antimicrobiano en concentraciones del 15 al 30%.
- **Carboximetil Celulosa (CMC):** es un polvo fino de color blanco, higroscópico, que se utiliza como agente viscosante en formulaciones tópicas y orales. Su concentración no supera al 2%.
- **Benzoato de Sodio:** es un polvo blanco, granular, ligeramente higroscópico que se utiliza como antimicrobiano. En formulaciones tópicas se usa en concentraciones de 0.02 – 5%.
- **Ácido bórico:** es un polvo cristalino, higroscópico utilizado como regulador de pH en formulaciones tópicas del 0.3 al 2%.
- **Polisorbato 80:** es un líquido viscoso ligeramente amarillo que se utiliza dentro de la industria farmacéutica como agente solubilizante y como surfactante no iónico. Su concentración es de 15%.

- **Extracto de Aloe Vera:** utilizado como antioxidante frente a una alternativa como el ácido ascórbico, debido a que presenta mayor estabilidad. La concentración apropiada es hasta el 15%.
- **Etanol:** es un disolvente por naturaleza. Sus concentraciones van desde el 60 al 80% (Handbook, 2006).

### 1.13. Método de manufactura.

El proceso de elaboración llevado a cabo es para una fórmula unitaria de 120 mL.

- **Preparación de la solución viscosante:** en un vaso de precipitación disolver la carboxi metil celulosa en 100 mL de agua hasta que se forme una solución transparente y ligeramente viscosa.
- **Preparación de solución I:** en un vaso de precipitación disolver el ácido bórico y el benzoato de sodio primero y luego el aloe vera a 30 °C. Temperar la solución viscosante e incorporarla. Luego calentar e incorporar el alcohol a la misma temperatura.
- **Preparación de la solución II:** en un vaso de precipitación calentar el polisorbato 80 hasta 50 °C y añadir el aceite de palo santo, homogenizando lentamente hasta que se disuelva.
- **Mezcla final:** Calentar la solución I y la solución II a 50 °C, una vez alcanzada esa temperatura, verter lentamente la solución 2 por el contorno del vaso que contiene la solución 1 y mezclar por agitación hasta obtener una solución, homogénea, transparente y libre de partículas visibles. Aforar con agua hasta llegar a los 120 mL.

### 1.14. Especificaciones para el envasado.

#### 1.14.1. Material de acondicionamiento.

El envase primario que es el que está en contacto directo con la loción, debe estar limpio y estéril antes de su uso y ser resistente a la luz por medio de las propiedades específicas del material con el que está compuesto. Las condiciones óptimas deben incluir almacenamiento a temperatura ambiente, protección de la humedad y de la luz (la transmisión de la misma no excede al 10% a cualquier longitud de onda en el intervalo de 290 nm y 455 nm para formas farmacéuticas de aplicación tópica (USP 33, NF 28).

Las normas y pruebas caracterizan a los envases de tereftalato de polietileno (PET) como adecuados para envasar formas farmacéuticas líquidas garantizando que la identidad, contenido, calidad y pureza se mantienen hasta la fecha de caducidad del producto. Las resinas, PET y otros ingredientes utilizados en la fabricación de estos frascos no contienen plastificantes, adyuvantes de procesamiento o antioxidantes. Si hubiera colorantes en la composición del envase, estos no migran al líquido contenido en el frasco (USP 33, NF 28).

#### **1.14.2. Etiquetado.**

Se refiere al marbete y material escrito, impreso o gráfico que aparece sobre el envase primario, sobre o dentro del empaque secundario, donde debe constar el número de lote, la fecha de elaboración y caducidad, las condiciones de almacenamiento, descripción y modo de uso del producto, así como la cantidad de ingrediente y excipiente por unidad de dosificación, el cual se expresa en términos de porcentaje o gramos (USP 33, NF 28).

#### **1.15. Estudios de preformulación.**

Los ensayos de pre-formulación se realizan con el objetivo de generar información útil para el formulador en el desarrollo de una forma de dosificación estable y biodisponible (García, 2001). Estos estudios comprenden los procesos de degradación, formulación, desarrollo de métodos analíticos, procesos de manufactura, condiciones adversas, biodisponibilidad, farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad (Gopinath & Naidu, 2011). Además, la preformulación incluye la investigación de caracteres organolépticos, estabilidad química y solubilidad (Salazar, 2001).

La primera etapa de preformulación comienza con la búsqueda bibliográfica de información sobre el principio activo y los excipientes más adecuados a incorporar en una forma farmacéutica, por lo que los estudios de compatibilidad química son importantes ya que el éxito de una formulación depende de la selección adecuada de los excipientes; logrando la estabilidad y eficacia del producto en beneficio del consumidor (Tobergte & Curtis, 2013).

### **1.15.1. Propiedades Físico – Químicas.**

#### **1.15.1.1. Caracteres organolépticos.**

Este estudio comienza con la descripción del producto que incluye color y olor para conocer la calidad con la que éste fue fabricado (Salazar, 2001). Su aspecto debe ser homogéneo, y su olor o color aceptable. Como es un producto tópico debe dispersarse en la piel y no dejar residuos. Estos controles se deben realizar durante el periodo de tiempo que corresponda (0 – 1 – 2 – 3 meses) (USP 33, NF 28). Según Wadke et al, se enlistan algunos términos descriptivos, los cuales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Terminología indicativa para describir las propiedades organolépticas.

<b>Color</b>	<b>Olor</b>
Transparente	Fuerte
Blanco	Sulfuroso
Amarillo	Afrutado
Marrón Claro	Aromático
Brillante	Inodoro

**Fuente:** Wadke et al (1989). Preformulation Testing in Pharmaceutical Dosage Forms.

**Elaboración:** La autora.

#### **1.15.2. Solubilidad.**

La solubilidad se puede clasificar mediante el método semi cuantativo: por adición de pequeñas cantidades de soluto a un volumen conocido de disolvente. Después de cada adición, el sistema se agita y se observa visualmente de manera que no queden partículas de soluto visibles (Salazar, 2011).

### **1.15.3. El pH.**

El pH es el valor dado por un instrumento potenciométrico apropiado, adecuadamente normalizado, capaz de reproducir valores de pH de hasta 0.02 unidades de pH. Emplea dos electrodos, uno indicador sensible a la actividad del ión hidrógeno y otro de referencia. Las mediciones se hacen a 25 ° C (USP 33, NF 28).

Nuestra piel tiene un pH alrededor de un pH de 4,5 5,9 el cual debe mantenerse en ese rango porque proporciona un ambiente óptimo para que las enzimas actúen sobre los lípidos extracelulares, así como en la participación de los procesos de reparación acelerada cuando hay un daño causado por agentes externos (Barel, André, PAye, Marc, Maibach, 1970) y para mantener el equilibrio de la flora bacteriana de la piel que nos protege de agentes infecciosos (Valiente, 2002).

### **1.15.4. Índice de refracción.**

El índice de refracción de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es valioso en la identificación y en la detección de impurezas. La observación y análisis nos permite detectar y cuantificar posibles signos de inestabilidad durante la preparación, dispensación y almacenamiento (USP 33, NF 28).

### **1.15.5. Densidad.**

La densidad es el volumen de masa que ocupa una sustancia en un espacio determinado (USP 33, NF 28).

### **1.15.6. Viscosidad.**

La viscosidad es una propiedad de los líquidos que está relacionada con la resistencia al flujo. La unidad básica es el poise, pero se puede representar también en centipoise (1 poise= 100 centipoise). Las lecturas se hicieron en un viscosímetro Brookfield rotatorio que utiliza un huso sumergido en la muestra de prueba y mide la resistencia al movimiento de la marca rotatoria (USP 33, NF 28).

## 1.16. Estabilidad farmacéutica.

La estabilidad farmacéutica se define como la conservación de las propiedades iniciales dentro de los límites específicos y durante todo el periodo de almacenamiento. Conlleva la integridad física y química del producto contra la contaminación microbiológica (USP 33, NF 28).

La observación y análisis nos permite detectar y cuantificar posibles signos de inestabilidad durante la preparación, dispensación y almacenamiento. Estos análisis se llevan a cabo mediante pruebas en tiempo real y acelerada de manera que se incremente la velocidad de la degradación química y biológica con el fin de poder determinar un periodo de vida útil de la forma farmacéutica elaborada (Salvador et al., 2011).

### 1.16.1. Condiciones de Estabilidad.

Según la guía ICH las condiciones del estudio de estabilidad acelerada implican: temperatura, humedad y luz analizados en un sólo lote de producción (ICH, 1993). Dentro de los parámetros se encuentran: la temperatura ambiente  $\pm 2$  (hace referencia a la temperatura constante dentro del laboratorio) y la temperatura acelerada que permite la interpretación de los datos sobre desviaciones transitorias breves en las condiciones de almacenamiento ( $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ,  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) (USP 33, NF 28); como también las humedades relativas que en Ecuador representan el  $75\% \pm 5$  (WHO, 2009) (**Ver Tabla 3**).

**Tabla 3.** Condiciones de estabilidad para productos farmacéuticos terminados.

Estudio	Condiciones de Almacenamiento	Periodo de tiempo
Largo Plazo	$25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ HR}$ $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ HR}$ $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ HR}$	12 meses
Intermedio	$30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ HR}$	6 meses
Acelerado	$40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ HR}$	3 - 6 meses

**Fuente:** World Health Organization. 2009. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products.

### 1.16.2. Tipos de estabilidad.

- **Química:** cada ingrediente dentro de la formulación debe mantener su integridad dentro de los límites especificados.
- **Física:** las propiedades físicas como la apariencia, color, homogeneidad deben mantenerse.
- **Microbiológica:** el producto debe estar exento de crecimiento bacteriano o al menos mantenerse al margen de las especificaciones (Who, 2009).
- **Terapéutico:** el efecto terapéutico debe mantenerse aun después de abierto el producto
- **Toxicológico:** la toxicidad debe mantenerse baja (Salvador et al., 2011)

### 1.17. Determinación del periodo de vida útil.

La vida útil de la forma farmacéutica es el lapso de tiempo que transcurre entre la preparación inicial hasta la fecha de caducidad especificada. Se calcula a través de la ecuación de Arrhenius (USP, 33, NF 28).

**Tabla 4.** Zonas climáticas a nivel mundial.

ZONAS CLIMATICAS EN EL MUNDO		
Zona Climática	Definición	Condiciones Aceleradas
I	<b>Templada</b> (Japón, Norte Europa, Canadá)	21 °C ± 2 / 45% ± 5 HR
II	<b>Mediterránea, Subtropical</b> (Sur Europa, US)	25 °C ± 2 / 60% ± 5 HR
III	<b>Caliente, Seca</b> (Irán, Irak)	30 °C ± 2 / 35% ± 5 HR
IV IVa IVb	<b>Caliente, Húmeda</b> (Brasil, Indonesia, Ecuador)	30 °C ± 2 / 65% ± 5 HR
		30 °C ± 2 / 75% ± 5 HR

**Fuente:** World Health Organization. 2009. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products.

**Elaboración:** La autora.

### 1.18. Pruebas de Repelencia.

Estas pruebas nos permite elegir una concentración a la cual el repelente se va a someter a las pruebas de compatibilidad y estabilidad y a su vez probar la eficacia de la loción como parte del control de calidad de la misma. El test de repelencia se llevó a cabo según el método propuesto por (Talukder & Howse, 1993).

### 1.19. Pruebas Microbiológicas.

Las pruebas microbiológicas permiten el recuento cuantitativo de bacterias mesófilas, hongos filamentosos y levaduras, *escherichia coli*, *stafilococcus aureus*, *pseudomona aeruginosa*, que se pueden desarrollar en condiciones aeróbicas, para determinar si el repelente cumple con la especificación establecida de calidad microbiológica (USP 33, NF 28) (Ver tabla 5).

Tabla 5. Tipos de microorganismos y medios usados para el control microbiológico.

Microorganismos	Caldo	Temperatura y tiempo de incubación	Medio	Temperatura y tiempo de incubación	Criterio de Aceptación
<b>Aerobios Mesófilos</b>	Digerido de caseína y soja	30 °C – 35 °C 18 – 24h	Agar digerido de caseína y soja	30 °C – 35 °C 48 – 96 h	>100 UFC
<b>Hongos filamentosos y levaduras</b>	–	–	Patata Dextrosa	20 °C – 25 °C 48 – 96 h	>100 UFC
<b><i>Stafilococcus aureus</i></b>	Digerido de caseína y soja	30 °C – 35 °C 18 – 24h	Manitol salado	30 °C – 35 °C 18 – 72 h	>100 UFC
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Digerido de caseína y soja	30 °C – 35 °C 18 – 24h	Cetrimida	30 °C – 35 °C C18 – 72h	>100 UFC
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Digerido de caseína y soja McConkey	30 °C – 35 °C 18 – 24h	McConkey	42 °C – 44 °C 24 - 48h 30 °C – 35 °C 18 – 72h	>100 UFC

Fuente: (USP 33; NF 28).

Elaboracion: La autora.

### **1.20. Pruebas toxicológicas.**

Los productos de aplicación tópica pueden causar irritación, dermatitis por contacto y fotosensibilización que pueden derivarse de los componentes sintéticos o naturales contenidos en el producto (Group, 2010). El estudio de toxicidad aguda es la determinación de los efectos adversos observados que se manifiestan tras la administración por vía dérmica del producto en tres aplicaciones a diferentes tiempos dentro de 24 horas. Se determina la  $DL_{50}$  que se deriva estadísticamente de una sola dosis que causa el 50% de muerte en los animales (PROGECA, 2017).

### **1.21. Interpretación Analítica de los datos.**

La garantía de la calidad de los productos farmacéuticos se logra combinando una serie de prácticas que incluyen un diseño robusto de la formulación, validación, análisis de materias primas, análisis durante el proceso y pruebas del producto final. Durante el proceso de desarrollo se validan los procedimientos para asegurar que los productos fabricados estén caracterizados. Las pruebas del producto final permite comprobar que los productos son seguros y eficaces cumpliendo sus especificaciones (USP 33, NF 28).

### **1.22. Cromatografía de gases y espectrometría de masas.**

La unión CG-EM es propicia para analizar compuestos volátiles, con temperaturas de ebullición, pesos moleculares o polaridades bajas o medianas, presentes en mezclas en el rango de las concentraciones ppb - ppm, además que su análisis transcurre en el mismo estado de agregación (fase vapor). La ventaja principal es que es una técnica altamente sensible y aporta gran información sobre los componentes que se están analizando, dependiendo también del método utilizado, la concentración de la muestra y sistemas cromatográficos (volumen y modo de inyección, tipo y dimensiones de la columna) (USP 33, NF 28).

Las mediciones estadísticas usadas para evaluar la dirección y magnitud de los errores incluyen la desviación estándar y la media. La variabilidad estimada puede usarse para calcular intervalos de confianza para la media e intervalos de tolerancia que capturan una proporción especificada de las mediciones individuales (USP 33, NF 28).

## **CAPITULO II**

### **METODOLOGÍA**

## 2.1. Obtención del material vegetal.

Los frutos del árbol *Bursera graveolens* fueron recolectados en el cantón Zapotillo ubicado en la provincia de Loja a 255 metros sobre el nivel del mar, en la parroquia Limones.

### 2.1.1. Método de extracción del aceite esencial.

La metodología empleada para la extracción del aceite esencial fue por medio de hidrodestilación por arrastre de vapor, el cual utiliza los frutos para obtener el aceite esencial a partir de material vegetal. El equipo usado fue un cilindro de tipo Clevenger compuesto por una rejilla donde se colocan los frutos y el agua destilada. Se generan los vapores que se enfrían y se condensan para ser recogidos en un florentino, cuyo producto está formado por dos fases inmiscibles: la fase orgánica y la fase acuosa.

Por diferencia de densidades se separan los componentes. El aceite obtenido es sometido a un control de calidad que forma parte de los estudios de preformulación que deben tomarse en cuenta antes de la elaboración de la forma farmacéutica. El proceso dura aproximadamente 2 horas (**Ver Gráfico 3**).

**Gráfico 3.** Destilador cleavenger



**Fuente:** La autora.  
**Elaboración:** La autora.

## 2.2. Estudios de preformulación.

### 2.2.1. Análisis cualitativos y cuantitativos del principio activo.

Para la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N, acoplado al espectrofotómetro de masas 5973 (**Ver**

**Gráfico 4)**, ya que es una técnica que determina la presencia o ausencia de un supuesto componente volátil y cuyo sistema tiene la base de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1.

**Gráfico 4.** Equipo de Cromatografía de Gases acoplado a espectrofotometría de masas.



**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

Para el análisis se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de aceite que fueron transferidos a un vial topacio de 1.5 mL de capacidad. Se añadieron tres hidrocarburos como sistema de referencia (0.5 mg del primer alcano, 0.5 mg del segundo alcano y 10  $\mu\text{L}$  del tercer alcano) con 50  $\mu\text{L}$  de diclorometano y se procedió a analizar en el equipo.

Para la identificación de los compuestos se calculó los índices de Kóvats en base a la serie homóloga de hidrocarburos para comparar que los espectros de masa del resultado del análisis del aceite, se correspondan con aquellos contenidos en el libro "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition de Robert. P. Adams. Para conocer la cantidad de compuesto se tomó en cuenta los porcentajes de área obtenidos del análisis con el detector FID.

#### **2.2.1.1. Condiciones del Equipo.**

La columna utilizada para el análisis es la DB 5-MS (5% Fenilmetilpolixilosano) de característica apolar con excelente comportamiento inerte frente a compuestos activos. Su longitud es de 30 metros con una película de 0,25  $\mu\text{m}$ , y sus límites de temperatura son de 60 a 325/350  $^{\circ}\text{C}$ . El gas portador es Helio. El detector es un espectrómetro de masas, con una temperatura de 250  $^{\circ}\text{C}$  y cuyo gas portador es el nitrógeno.

## 2.3. Parámetros organolépticos y Físico- Químicos del principio activo.

El aceite de palo santo tiene propiedades organolépticas que lo diferencian de otros aceites esenciales, por lo tanto es importante tomar en cuenta las mismas para los ensayos posteriores.

### 2.3.1. Determinación de la solubilidad.

Los estudios de preformulación en cuanto a la solubilidad se realizaron con el objetivo de escoger el solvente que mejor diluya el aceite. Los principales disolventes utilizados fueron: glicerina, propilenglicol, polietilenglicol 400, alcohol al 96%, polisorbato 80, y agua (**Ver Gráfico 5**).

**Gráfico 5.** Disolventes utilizados en las pruebas de solubilidad.



**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

La caracterización de cada uno en base a su solubilidad se llevó a cabo mediante la clasificación en términos descriptivos descrita por la farmacopea vigente (**Ver Tabla 6**).

**Tabla 6.** Grado de solubilidad mediante términos descriptivos.

Clasificación del Soluta	Cantidad de disolvente para disolver un soluto
Muy soluble	Menos de una parte
Fácilmente soluble	De una a 10 partes
Soluble	De 10 a 30 partes
Bastante soluble	De 30 a 100 partes
Poco Soluble	De 100 a 1.000 partes
Insoluble	Más de 10.000 partes

**Fuente:** (USP 33; NF 28).

**Elaboración:** La autora.

### **2.3.2. Determinación del Índice de refracción.**

El refractómetro usado fue el de marca ABBE, en donde inicialmente se realizó la calibración midiendo el índice de refracción del agua, y luego colocando una gota de la muestra de aceite esencial sobre el prisma inferior realizando la lectura correspondiente.

### **2.3.3. Determinación de la densidad.**

Para determinar la densidad se usó un picnómetro de vidrio de 2 mL conjuntamente con su capilar y cuyo procedimiento se detalla a continuación.

#### **2.3.3.1. Procedimiento:**

Para comenzar se lava el picnómetro con acetona y se dejar evaporar. A continuación se pesa y anota la masa del picnómetro vacío. Enrasar el picnómetro con agua destilada y colocar el tapón para liberar el exceso de agua por el capilar y secar. Pesarse y anotar la masa del picnómetro con el agua destilada. Vaciar el picnómetro y secar. Llenar el picnómetro con el aceite esencial, colocar el tapón, eliminar los excesos, secar y pesar anotando la masa del mismo. Aplicar la fórmula:

$$\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

En donde:

**m1**= gramos del picnómetro vacío.

**m2**= gramos del picnómetro con agua destilada.

**m3**=gramos del picnómetro con aceite esencial.

## **2.4. Parámetros Físico- Químicos de los excipientes.**

### **2.4.1. Determinación de la solubilidad.**

Los estudios de preformulación en cuanto a la solubilidad se realizaron con el objetivo de esco-

ger el solvente que diluya los excipientes y la loción repelente. La matriz de combinaciones experimentales incluyó al menos 3 excipientes para cada función dentro de la formulación para así elegir los más adecuados. Se escogieron aquellos que según bibliografía no presentan incompatibilidades entre sí que puedan desestabilizar la loción y posteriormente fueron almacenados a temperatura ambiente  $\pm 2$  en viales de vidrio sellados con elastómetros de caucho, para observar posibles cambios en la apariencia (**Ver Gráfico 6**).

**Gráfico 6.** Almacenamiento de los disolventes en viales de vidrio.



**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

Los principales disolventes utilizados fueron el agua y el etanol. Al conocer las partes en las que se solubiliza cada componente y en que disolvente, se pudo definir el protocolo de elaboración con el orden de mezcla.

## **2.5. Estudio de compatibilidad aceite esencial – excipiente mediante el diseño experimental de mezclas binarias.**

### **2.5.1. Fundamento.**

Las mezclas binarias es una técnica experimental que comprueba la disponibilidad *in vitro* que existe al mezclar el principio activo con un único excipiente de manera que, tras ser almacenada durante un tiempo y bajo condiciones controladas se tenga una idea de la compatibilidad y estabilidad de la fórmula final.

### **2.5.2. Composición de las mezclas.**

Las composiciones generales de cada mezcla binaria son las siguientes:

Principio activo: 0.5 g  
Excipiente: 0.5 g

Los excipientes utilizados se detallan a continuación en la tabla 7.

**Tabla 7.** Listado de excipientes.

Número	Excipiente
1	Propilenglicol
2	Carboximetilcelulosa
3	Ácido Bórico
4	Benzoato de Sodio
5	Aloe Vera
6	Polisorbato 80
7	Etanol
8	Aceite de Palo Santo

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

### **2.5.3. Elaboración y acondicionamiento de las muestras.**

Se pesan los componentes (el aceite y un excipiente) directamente en cada vial. Para los excipientes que son líquidos se trabajó con la densidad (el equivalente en masa).

Debido a la fotosensibilidad del aceite esencial, las mezclas se almacenan en viales de vidrio de tipo II de color ámbar de 10 mL de capacidad sellados con tapa rosca con el fin de evitar que factores adicionales influyan en los resultados. La distribución de las mezclas según normas WHO, 2009, se almacenaron a tres temperaturas, las cuales se detallan en la tabla 8.

**Tabla 8.** Asignación de las muestras en los viales ámbar.

Número de Viales	Mezcla	Cantidad por vial	Condiciones
14	todas	1 g	Ambiente $\pm$ 2
14	todas	1 g	30 °C $\pm$ 2
14	todas	1 g	40 °C $\pm$ 2
1	Solo aceite	1.5 mL	Ambiente $\pm$ 2
1	Solo aceite	1.5 mL	30 °C $\pm$ 2
1	Solo aceite	1.5 mL	40 °C $\pm$ 2

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

#### 2.5.4. Tiempo de análisis.

El tiempo de estudio comprende dos meses, realizando los análisis después de un mes (tiempo 1) y después de dos meses (tiempo 2). El mismo se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases, acoplado a un espectrofotometro de Masas (CG-EM), en una columna INOWAX, para cada condición con el fin de determinar el contenido del limoneno y detectar impurezas o productos de degradación en la formulación.

Para analizar las muestras en el cromatógrafo se diluye todo el contenido de los viales y se afora a 50 mL. Se usa el estándar R (+) limoneno para la curva de calibración con concentraciones crecientes del mismo. La interpretación de los resultados se realiza a través de las áreas obtenidas de las lecturas de las muestras en comparación con el área del limoneno (metabolito de interés) obtenido del análisis de la mezcla 8, que sólo posee aceite esencial (100 mg diluidos en 10 mL).

#### 2.6. Ensayo de actividad repelente para determinar la concentración del producto.

Para la ejecución de este trabajo se recolectaron los mosquitos en una arrocería en el sector Vadeal, (**Ver Anexos**) ubicado en el cantón Macará, mediante el montaje de una trampa de luz blanca y luz UV. (**Ver Anexos**). Las condiciones del ensayo se detallan en la **tabla 9**.

**Tabla 9.** Condiciones del ensayo de repelencia.

Parámetros	Condición
Temperatura	28 °C
Sensación real	32 °C
Humedad relativa	62%
Nubosidad	Escasa
Iluminación	Escasa
Material	Cajas petri de plástico
Material biológico	Mosquitos adultos <i>Aedes aegypti</i>
Duración de la prueba	20 horas

**Fuente:** La autora  
**Elaboración:** La autora.

### 2.6.1 Procedimiento.

- **Preparación del sustrato:** tomar el papel filtro de 8 – 9 cm de diámetro (# 40) y doblarlo por la mitad. La parte derecha es aquella a la cual se rocía el repelente, hasta secar totalmente; mientras que la parte izquierda es aquella que no contiene nada y constituye el disco control.
- **Fijación:** en cada caja Petri se colocan los discos de papel filtro y se los ajusta a la caja por medio de una cinta transparente.
- **Captura:** los mosquitos se recolectan directamente desde la malla de la trampa de luz a través de un tubo trampa que contiene dos mangueras, una para el ingreso y otra para la salida.
- **Liberación:** se hace un orificio a un lado de la caja y se liberan 10 mosquitos.
- **Conteo:** se contó el número de mosquitos en el disco control por cada hora, hasta completar 5 horas de exposición.

Los datos obtenidos fueron convertidos en porcentaje de repelencia (PR) utilizando la fórmula:

$$PR (\%) = 2x (c - 50)$$

Donde **c** es el porcentaje de mosquitos presentes en la mitad control.

Los valores se clasificaron tomando en cuenta la tabla 10.

**Tabla 10.** Clasificación en grados de repelencia.

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

**Fuente:** Taludker & Howse, 1993.

**Elaboración:** La autora.

La identificación de la especie de mosquito se realizó en el Departamento de Ciencias Naturales de la UTPL, el cual se corresponde con el género *Aedes aegypti*.

## 2.7. Formulación.

A través del diseño experimental de mezclas binarias se pusieron a prueba 6 excipientes que resultaron idóneos para formar parte de la loción repelente (**Ver Tabla 11**), que luego será sometida a los estudios de estabilidad.

**Tabla 11.** Diseño de la fórmula para la loción repelente.

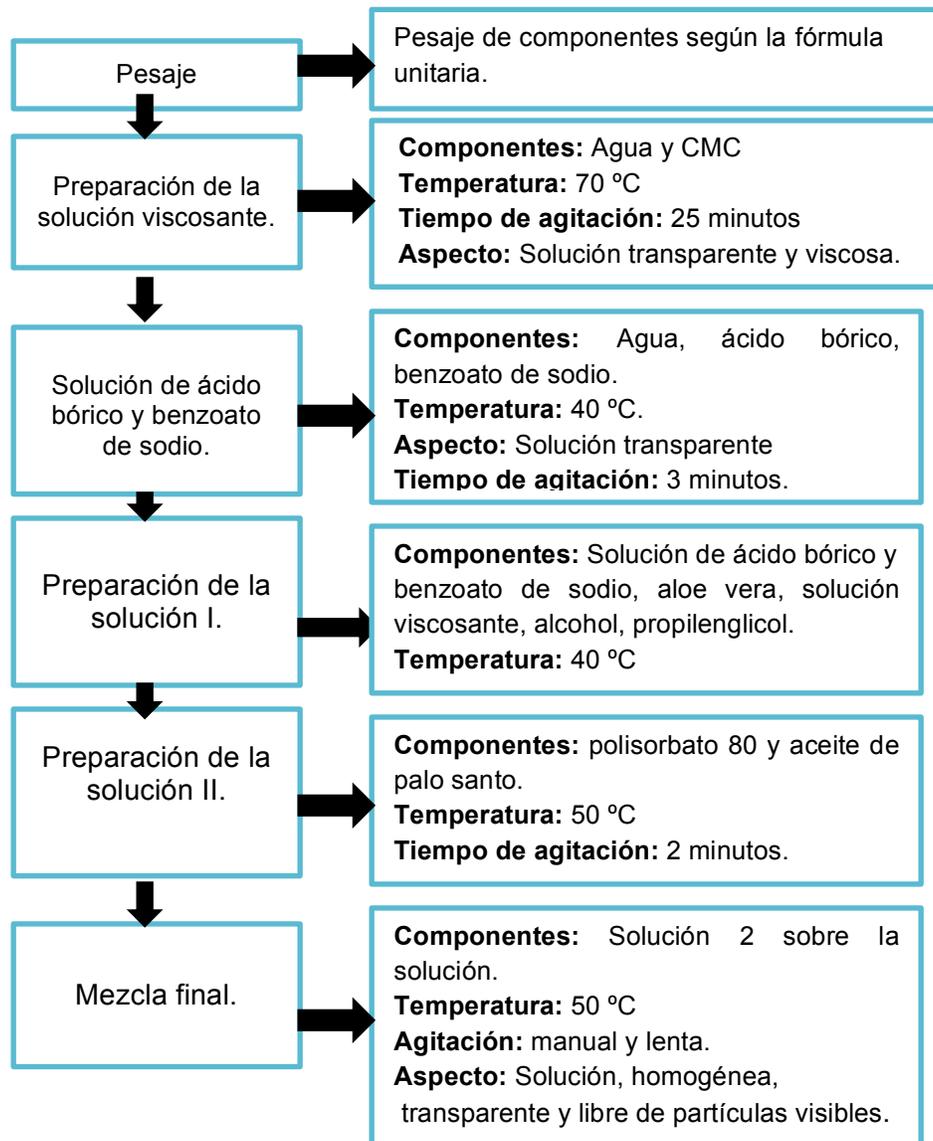
<b>Excipiente</b>	<b>Función</b>
<b>Aceite esencial</b>	Principio activo
<b>Propilenglicol</b>	Humectante
<b>CarboxiMetilCelulosa (CMC)</b>	Viscosante
<b>Ácido bórico</b>	Regulador de pH
<b>Aloe Vera</b>	Antioxidante
<b>Benzoato de Sodio</b>	Conservante
<b>Polisorbato 80</b>	Solubilizante
<b>Agua</b>	Vehículo Primario
<b>Etanol</b>	Disolvente

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

### 2.7.1. Protocolo de elaboración de la loción repelente.

Se siguió el protocolo paso a paso como se muestra a continuación:



## **2.8. Ensayos de estabilidad del producto terminado.**

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de análisis instrumental del departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL.

El lote elaborado fue de 17 unidades, de los cuales 5 fueron utilizados para las pruebas de toxicidad y los 12 restantes se distribuyeron a temperatura ambiente  $\pm 2$ , en un desecador que contiene una solución sobresaturada de NaCl (simulando las condiciones a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) y en una cámara climática ( $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). Las muestras fueron seleccionadas al azar en intervalos de 30 días para evaluar el producto mediante ensayos, organolépticos, físicos-químicos y microbiológicos.

Para el análisis cromatográfico, se realizó una dilución 1 en 2 de las lociones repelentes trabajando por quintuplicado y con curva de calibración usando el estándar R (+) limoneno por cada mes de estudio.

## **2.9. Predicción de la vida útil de la loción repelente con el método de Arrhenius como estudio de estabilidad acelerada.**

El método de Arrhenius nos sirve para la determinación de la vida útil de la loción repelente. Se calcula a través de CG – EM, obteniendo la concentración de principio activo almacenado a temperatura ambiente  $\pm 2$  y a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  en la cámara climática.

Para calcular el periodo de vida útil primeramente se determina el orden de reacción; calculando las pendientes en función del tiempo, trazando las gráficas y tomando en cuenta las temperaturas de estudio. La vida útil se expresa como T90 % (tiempo en el que el principio activo llega a degradarse en un 10 %).

## **2.10. Control de calidad de la loción repelente.**

### **2.10.1. *Parámetros Físico- Químicos y Organolépticos.***

Los parámetros organolépticos de las lociones almacenadas a las 3 temperaturas (el color, olor y aspecto) fueron controladas mes a mes para documentar si estos parámetros se mantienen constantes en el tiempo o si varían.

#### **2.10.1.1. *Determinación de la densidad.***

Para determinar la densidad se usó un picnómetro de vidrio de 2 mL conjuntamente con su capilar y se realizaron las lecturas a temperatura ambiente  $\pm 2$ .

#### **2.10.1.2. *Determinación del pH.***

El pH fue medido a través de un pHmetro marca OAKLON pH700, realizando primero la calibración con los 3 buffers necesarios: buffer pH 4,00, buffer pH 7,00 y buffer pH 10 y luego realizando tres lecturas correspondientes de la muestra.

#### **2.10.1.3. *Determinación de la viscosidad.***

Para determinar la viscosidad se usa un viscosímetro marca Brookfield Viscometer a 60 rev, a un spin de 62 y a 30 segundos de lectura por muestra. Se hacen lecturas por triplicado.

## **2.11. Pruebas microbiológicas.**

Como parte del control de calidad del repelente se realizaron las pruebas microbiológicas en el laboratorio de Bioensayos de la UTPL, utilizando el método de recuento en placa para determinar el número de microorganismos viables reportados como unidades formadoras de colonias (UFC). Se trabajó por duplicado, con un control negativo y con los diferentes caldos y agares (marca DIFCO y BBL) especificados en la USP 33, NF 28 con sus respectivos certificados de análisis.

En una cabina clase II se esterilizan las cajas y los tubos con radiación UV durante 15 minutos antes de su uso. Cada medio es dispensado en las cajas y los caldos en los tubos de vidrio con tapa tomando en cuenta todas las medidas de bioseguridad para evitar posibles contaminantes. Una vez que los agares han gelificado se los etiqueta y sella con parafilm. En el caso de los caldos se inocula 1 mL de muestra, se homogeniza y se lleva a incubación a 30 C por 18 – 24 horas.

Después de transcurrido el tiempo de incubación de los caldos se inocula en cada caja correspondiente usando un asa punta redonda y se sella con parafilm para llevar a incubación. Después del tiempo establecido se hace el conteo de colonias características de cada medio y se reporta en unidades formadoras de colonias (UFC).

#### **2.12. Estimación de la actividad repelente.**

Como parte del control de calidad se debe ensayar *in vitro* los productos repelentes elaborados al 2 % a las tres temperaturas, siguiendo el ensayo propuesto por Taludker & Howse por cada mes, para evidenciar si pese a las condiciones a las que el repelente se encuentra sometido, la actividad repelente se mantiene o disminuye.

#### **2.13. Bioensayo de toxicidad dérmica aguda de la loción repelente.**

Para evaluar que los repelentes elaborados no producen efectos secundarios sobre la piel, se enviaron 5 unidades al laboratorio de análisis PROGECA de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, de acuerdo a las recomendaciones de las guías de Organización Económica para la Cooperación y el Desarrollo (OECD423).

La interpretación de los efectos toxicológicos del producto se basaron en observaciones del peso corporal registrado semanalmente desde el inicio del estudio, signos clínicos diarios buscando señales de toxicidad y mortalidad y al final de la prueba se realiza la necropsia para observar la presencia o ausencia de alteraciones a nivel de órganos en los animales sobrevivientes.

## **CAPITULO III**

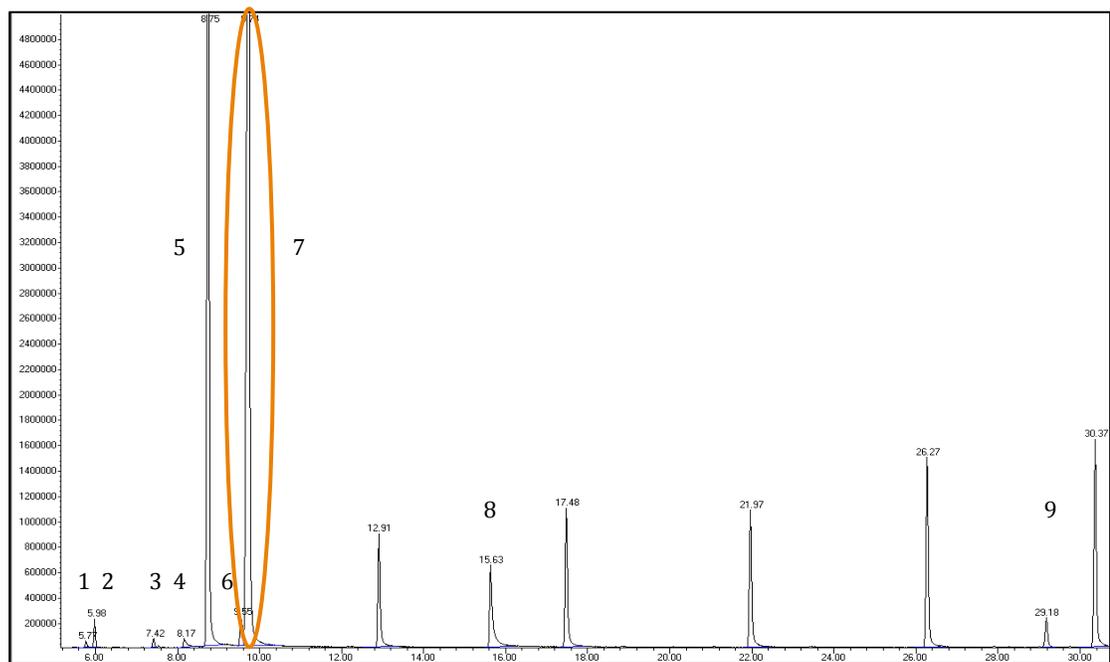
### **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### 3.1 Valoración cualitativa y cuantitativa del principio activo.

#### 3.1.1. Identificación y cuantificación de los compuestos por CG – EM y CG – FID.

A través del análisis en el CG-EM se pudieron identificar los compuestos representados en el cromatograma (**Ver gráfico 7**) en donde el eje X representa los tiempos de elución de los compuestos y el eje Y representa la abundancia de los mismos. De los 9 compuestos que se muestran en el cromatograma, el limoneno representa el mayoritario (**Ver tabla 13**).

**Gráfico 7.** Cromatograma del aceite esencial.



**Fuente:** MSD Chem Station.

**Elaboración:** La autora.

La identificación se llevó a cabo utilizando el tiempo de retención conocido de los estándares de referencia (hidrocarburos) (**Ver tabla 12**) y a través de los cuales se calculó la pendiente para poder establecer los índices de kóvats de los compuestos que fueron comparados con

bibliografía para establecer que su espectro de masa se corresponde con la bibliografía propuesta en el libro de Adams.

**Tabla 12.** Datos de los hidrocarburos utilizados en el análisis.

Tiempo de Retención de los Alcanos	Índice de Kóvats de los Alcanos
12,91	1100 Undecano
17,48	1200 Dodecano
21,97	1300 Tridecano
26,27	1400 Tetradecano
30,37	1500 Pentadecano

**Fuente:** La autora.  
**Elaboración:** La autora.

La cuantificación con el detector FID permitió determinar el porcentaje existente de cada compuesto.

**Tabla 13:** Compuestos identificados a partir del Índice de Kóvats.

Pico	Compuestos	Índice de Retención Kóvats <sub>c</sub>	Índice de Retención Kóvats <sub>b</sub>	Cantidad Existente %
1	α-Thujene	944	930	0.28
2	α-Pinene	948	939	1.02
3	Sabinene	980	975	0.30
4	Myrcene	996	990	1.23
5	α phellandrene	1009	1002	20.52
6	p-cymene	1026	1026	1.32
7	Limonene	1030	1029	68.0
8	Mentofurano	1160	1164	4.82
9	Germacrene D	1471	1485	0.96
<b>Total:</b>				<b>98.45</b>

**Fuente:** La autora.  
c= Índice de Kóvats calculados partir de los hidrocarburos.  
b= Índice de Kóvats en bibliografía (Adams).  
**Elaboración:** La autora.

Según los estudios propuestos por Vacacela, 2012 en cuanto al resultado del análisis del aceite se puede corroborar que el limoneno es el compuesto mayoritario y que el porcentaje existente total de compuestos alcanza un 98,45% constituyendo un valor adecuado para ser utilizado en una forma farmacéutica.

### 3.2. Preformulación.

Como resultado de las pruebas organolépticas y físico - químicas del principio activo se obtiene:

**Solubilidad:** Polisorbato 80.

**Índice de Refracción** (20 °C): 1,4768

**Densidad:** 0.858 g/cm<sup>3</sup>.

**Apariencia:** Líquido viscoso.

**Color:** translúcido.

**Olor:** cítrico, amaderado.

Estos parámetros concuerdan con los estudios ya validados del aceite en el año 2006 por Salas M., y Zaragocín R.

#### 3.2.1. Solubilidad del principio activo.

Con estos ensayos evaluamos tantas mezclas como sean posibles, usando diversos disolventes con el fin de escoger aquel que disuelva el principio activo en el menor número de partes (**Ver tabla 14**).

**Tabla 14.** Partes de disolvente para diluir el pa\*.

Solubilidad del Aceite Esencial		
Disolventes	Partes	Términos Descriptivos
Glicerina	48	Bastante Soluble
Propilenglicol	43	Bastante Soluble
Polietilenglicol	12	Soluble
Polisorbato 80	3	Fácil. soluble
Etanol 96%	8	Fácil. soluble
Agua	-	Insoluble

\*Principio activo.

**Fuente:** La autora.

**Elaboracion:** La autora.

El disolvente escogido por excelencia para cumplir el primer objetivo es el polisorbato 80 ya que disuelve el aceite en el menor número de partes.

### 3.2.2. Solubilidad de los excipientes.

En relación a los excipientes, la mayoría son de carácter hidrofílico por lo que se contabilizó el número de partes disueltas tanto en agua (para la elaboración de la loción repelente) y en etanol para poderlos disolver para los estudios de compatibilidad y estabilidad (**Ver tabla 15**).

**Tabla 15.** Excipientes disueltos en agua y etanol.

Excipientes (una parte)	Partes de disolvente (Agua/mL)	Clasificación USP (Agua)	Partes de disolvente (Etanol/mL)	Clasificación USP (Etanol)	Referencia Handbook	Densidad
Propilenglicol	4	Fácilmente Soluble	3	Fácilmente Soluble	Hasta 15%	1.04 g/cm <sup>3</sup>
Carboxi MetilCelulosa (CMC)	7	Fácilmente Soluble	15	Soluble	0.25% - 2 %	-
Ácido bórico	3	Fácilmente Soluble	7	Fácilmente Soluble	Hasta 0.9%	-
Aloe vera	1	Muy Soluble	3	Fácilmente Soluble	Hasta 15%	0.951g/cm <sup>3</sup>
Benzoato de Sodio	8	Fácilmente Soluble	25	Soluble	0.1- 0.5%	-
Polisorbato 80	5	Fácilmente Soluble	8	Fácilmente Soluble	Hasta 15%	1,59g/cm <sup>3</sup>

**Fuente:** USP 33-NF 28. Vol 1.  
Handbook of Excipients.

**Elaboración:** La autora.

El disolvente escogido por excelencia es el etanol al 96%, ya que es fácilmente soluble homogenizando los excipientes y por lo tanto las mezclas binarias y la loción repelente.

Según Fauli, las formulaciones líquidas llevan en gran parte etanol como disolvente, por lo tanto por un lado nos asegura que la loción se disperse en la piel sin dejar resequead asegurando la calidad final del producto y por otro ser el solvente adecuado para los estudios analíticos.

### 3.3. Estudio de compatibilidad aceite esencial-excipientes mediante el diseño experimental de mezclas binarias.

Los estudios de compatibilidad se llevaron a cabo comparando la cantidad de limoneno en las mezclas binarias con la cantidad de limoneno en el aceite almacenado por cada condición. La cantidad de limoneno en el aceite al mes 1 se muestra en la **tabla 16** y al mes 2 se muestra en la **tabla 17**.

**Tabla 16.** Cantidad de limoneno existente en el aceite - mes 1.

Condiciones	Concentración de limoneno en la dilución 1/10	Concentración de limoneno en el aceite
Ambiente $\pm$ 2	4,02 mg/mL	344,63 mg/mL
30 °C $\pm$ 2	4,23 mg/mL	363,04 mg/mL
40 °C $\pm$ 2	4,64 mg/mL	397,79 mg/mL

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

**Tabla 17.** Cantidad de limoneno existente en el aceite - mes 2.

Condiciones	Cantidad de limoneno en la dilución 1/10	Cantidad de limoneno en el aceite
Ambiente $\pm$ 2	2,20 mg/mL	188,94 mg/mL
30 °C $\pm$ 2	3,25 mg/mL	279,14 mg/mL
40 °C $\pm$ 2	1,41 mg/mL	120,76 mg/mL

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora

A continuación, se muestran los resultados de la combinación entre el principio activo (limoneno) con cada excipiente:

**Tabla 18.** Compatibilidad con Propilenglicol mes 1 y 2.

LIMONENO - PROPILENGLICOL				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	4,12	100
		2	1,67	76
30°C ± 2	75 ± 5	1	2,44	53
		2	0,88	27,1
40°C ± 2	75 ± 5	1	1,02	22,1
		2	0,02	1,6

Fuente: La autora.

Elaboracion: La autora.

**Tabla 19.** Compatibilidad con Carboxi metil celulosa mes 1 y 2.

LIMONENO - CARBOXI METIL CELULOSA				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	2,97	72,1
		2	1,30	59,2
30°C ± 2	75 ± 5	1	2,20	48
		2	0,62	3,7
40°C ± 2	75 ± 5	1	1,55	34
		2	0,05	19,2

Fuente: La autora.

Elaboracion: La autora.

**Tabla 20.** Compatibilidad con Benzoato de Sodio mes 1 y 2.

LIMONENO - BENZOATO DE SODIO				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	3,96	96,1
		2	1,52	69
30°C ± 2	75 ± 5	1	3,79	82,1
		2	1,29	40
40°C ± 2	75 ± 5	1	2,59	56%
		2	0,42	30

Fuente: La autora.

Elaboracion: La autora.

**Tabla 21.** Compatibilidad con Aloe Vera mes 1 y 2.

LIMONENO - ALOE VERA				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	3,88	94,3
		2	1,38	62,4
30°C ± 2	75 ± 5	1	3,20	76
		2	1,42	44
40°C ± 2	75 ± 5	1	1,0	22
		2	0	0

Fuente: La autora.

Elaboracion: La autora.

**Tabla 22.** Compatibilidad con Polisorbato 80 mes 1 y 2.

LIMONENO - POLISORBATO 80				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	2,63	64
		2	0,85	38,4
30°C ± 2	75 ± 5	1	1,46	32
		2	0,46	14
40°C ± 2	75 ± 5	1	1,22	26,4
		2	0	0

Fuente: La autora.  
Elaboración: La autora.

**Tabla 23.** Compatibilidad con Ácido bórico mes 1 y 2.

LIMONENO - ÁCIDO BÓRICO				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	2,37	58
		2	0,66	30
30°C ± 2	75 ± 5	1	1,36	30
		2	0	0
40°C ± 2	75 ± 5	1	0,08	1,7
		2	0	0

Fuente: La autora.  
Elaboración: La autora.

**Tabla 24.** Compatibilidad con Etanol mes 1 y 2.

LIMONENO - ETANOL				
Temp. °C	% HR	Mes	Cantidad de limoneno (mg/mL)	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1	3,91	95
		2	1,75	79,3
30°C ± 2	75 ± 5	1	3,97	86,1
		2	1,07	74
40°C ± 2	75 ± 5	1	0,	12
		2	0	0

Fuente: La autora.  
Elaboración: La autora.

**Tabla 25.** Resumen de los estudios de Compatibilidad entre el principio activo y los excipientes.

Temp. °C	Propil. <sup>1</sup>		CMC <sup>2</sup>		A. bórico		B. de Sodio		Aloe Vera		Polisor. 80 <sup>3</sup>		Etanol	
	% Limoneno		% Limoneno		% Limoneno		% Limoneno		% Limoneno		% Limoneno		% Limoneno	
	1 mes	2 mes	1 mes	2 mes	1 mes	2 mes	1 mes	2 mes	1 mes	2 mes	1 mes	2 mes	1 mes	2 mes
Amb ± 2	100	76	72,1	59,2	58	30	96,1	69	94,3	62,4	64	38,4	95	79,3
30°C ± 2	53	27,1	48	19	30	0	82,1	40	76	44	32	14	86,1	33
40°C ± 2	22,1	1,6	34	3,7	1,7	0	56	30	22	0	26,4	0	12	0

Propilenglicol; <sup>2</sup>Carboxi metil celulosa; <sup>3</sup>Polisorbato 80.

**Fuente:** La autora.

**Elaboracion:** La autora.

Los resultados a temperatura ambiente ± 2 para el mes 1 nos indican que: el propilenglicol, el benzoato de sodio, el aloe vera y el etanol son aquellos excipientes que menos interaccionan con el limoneno conservándolo del 95 al 100%. Por otro lado, existen excipientes como la carboxi metil celulosa, el ácido bórico y el polisorbato 80 que disminuyen la cantidad de principio activo conservándolo en un 58% - 74%.

Si analizamos las mezclas a 30 °C ± 2 para el mes 1 observamos que la concentración de limoneno disminuye en relación con aquellas mezclas conservadas a temperatura ambiente ± 2, aunque los excipientes como el benzoato de sodio, el aloe vera y el etanol conservan la concentración de limoneno hasta un 76% en relación con el resto de componentes bajo estas mismas condiciones. En el caso de la mezcla aceite esencial - ácido bórico al mes dos de estudio muestra que el limoneno se degrada en un 100%.

Las mezclas conservadas a 40 °C ± 2, revelan que todos los componentes al primer mes de estudio pese a estar almacenados bajo condiciones de temperatura y humedad elevada; aún conservan limoneno en sus mezclas con un máximo de 56% para el benzoato de sodio y un mínimo de 1,7% para el ácido bórico; situación que no sucede al mes dos de estudio donde la interacción principio activo con ácido bórico, aloe vera, polisorbato 80 y etanol es nula. De acuerdo con (Viana et al., 2008) al hacer estos análisis entre el principio activo y cada excipiente en una etapa inicial se pueden detectar incompatibilidades que puedan afectar la estabilidad y biodisponibilidad del producto farmacéutico alterando su seguridad y eficacia.

### 3.4. Formulación de la loción repelente.

En base a los resultados obtenidos de la matriz de mezclas, se logró elaborar una formulación en el laboratorio de tecnología farmacéutica del Departamento de Química y Ciencias Exactas (Ver gráfico 8).

**Gráfico 8:** Prototipo de loción repelente elaborada al 2%.



**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

#### 3.4.1 Fórmula de Composición.

Cada 120 mL contiene:

**Aceite esencial** ----- **2%**  
**Excipientes** ----- **csp**

**Tabla 26.** Cálculos para determinar la fórmula unitaria y la fórmula de manufactura.

Función	Componente	% p/p (g)	% p/v (mL)	F. Unitaria (g)	F. Manufactura (1.700 mL)
<b>API</b>	Aceite Palo Santo	1,7	2	1,7	28,9
<b>Humectante</b>	Propilenglicol	15	14,4	15	225
<b>Viscosante</b>	Carboxi metil celulosa	2	20	20	340
<b>Regulador de pH</b>	Acido Bórico	0,5	-	0,5	8,5
<b>Antioxidante</b>	Aloe Vera	6	6,3	6	102
<b>Conservante</b>	Benzoato de Sodio	0,8	-	0,8	13,6
<b>Tensoactivo</b>	Polisorbato 80	6	5,5	6	102
<b>Disolvente</b>	Etanol	7,8	10	7,8	132,6
<b>Agua purificada</b>	Vehículo Primario	-	-	62,2	747,4
<b>Total</b>					1.700

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

### 3.5. Bioensayo de actividad repelente.

Los resultados obtenidos de la actividad repelente de la loción se resumen en la **tabla 27**.

**Tabla 27.** Datos por hora de repelencia.

PORCENTAJE DE REPELENCIA %							
Concentración	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	5 Horas	Promedio	Grado de Repelencia
0.5%	47%	43%	35%	35%	29%	37,8%	II
1%	57%	51%	51%	45%	45%	49,8%	III
2%	83%	80%	67%	60%	56%	69,2%	IV
3%	85%	80%	80%	75%	75%	79%	IV

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

En base a los resultados, las lociones con concentración más bajas: 0.5% y 1% alcanzan una clase II y III de repelencia respectivamente, considerándose intermedias ya que alcanzan un poco más del 50% de protección, mientras que las lociones repelentes elaboradas al 2% y 3% llegan a grado de repelencia clase IV, es decir, que repelen en un 80%, lo que se considera un porcentaje alto de protección frente a otras formulaciones de su misma clase (Repelente Bite blocker que utiliza el aceite de citronela al 10% y es efectivo durante 2 horas) (Courtney J, 2002).

En un estudio de repelencia realizado por Vacacela, 2012 se determina que un repelente elaborado con palo santo al 3% alcanzó la clase IV de repelencia, incluso después de su almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad aceleradas; concluyendo que nuestro producto repelente con el mismo principio activo elaborado al 2%, es capaz de proteger hasta un 80% contra las picaduras de mosquitos y mantener su actividad repelente.

También se calcularon las horas de protección durante el periodo de tiempo correspondiente a las pruebas, considerando que el repelente tuvo la capacidad de inhibir a los mosquitos durante 5 horas, situación que es favorable ya que no necesita ser aplicado por segunda vez si la exposición se mantiene dentro del rango de protección establecido.

### 3.6. Resultados de las pruebas de estabilidad.

Para los estudios de estabilidad se comparó la cantidad de limoneno que se documentó en el estudio cuantitativo del aceite en relación con la cantidad de limoneno presente en la loción repelente.

**Tabla 28.** Cantidad de limoneno presente en el aceite esencial de Palo Santo.

Muestra	Concentración de limoneno en el aceite diluido (mg/mL)	Concentración de limoneno en el aceite (mg/mL)	Limoneno esperado (mg/mL)
Aceite	0,2	204,9	3,38

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

Las primeras pruebas de estabilidad se realizaron el día de la elaboración del lote y cuyos resultados se muestran a continuación en la **tabla 29**.

**Tabla 29.** Estabilidad del repelente mes 0.

ESTABILIDAD MES 0								
Temp. °C	% HR	Concentración de Limoneno en la loción (mg/mL)					Promedio	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	3,33	3,36	3,37	3,34	3,38	3,36	99,4

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

Las segundas pruebas de estabilidad se realizaron transcurridos el primer mes de la elaboración del lote y cuyos resultados se muestran a continuación en la **tabla 30**.

**Tabla 30.** Estabilidad del repelente mes 1.

ESTABILIDAD MES 1								
Temp. °C	% HR	Concentración de limoneno (mg/mL)					Promedio	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	2,50	2,52	2,55	2,52	2,56	2, 53	96,7
30°C ± 2	75 ± 5	0,73	0,71	0,70	0,73	0,72	0,72	87,3
40°C ± 2	75 ± 5	0,48	0,47	0,47	0,48	0,48	0,48	77,5

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

Las terceras pruebas de estabilidad se realizaron transcurridos el segundo mes de la elaboración del lote y cuyos resultados se muestran a continuación en la **tabla 31**.

**Tabla 31.** Estabilidad del repelente mes 2.

ESTABILIDAD MES 2								
Temp. °C	% HR	Concentración de limoneno (mg/mL)					Promedio	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1,85	2,08	1,80	2,21	1,90	1,97	90,2
30°C ± 2	75 ± 5	0,55	0,57	0,54	0,54	0,54	0,55	79,6
40°C ± 2	75 ± 5	0,41	0,39	0,44	0,43	0,38	0,40	73,4

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

Las cuartas pruebas de estabilidad se realizaron transcurridos el tercer mes de la elaboración del lote y cuyos resultados se muestran a continuación en la **tabla 32**.

**Tabla 32.** Estabilidad del repelente mes 3.

ESTABILIDAD MES 3								
Temp. °C	% HR	Concentración de limoneno (mg/mL)					Promedio	% Limoneno
Ambiente ± 2	43 ± 5	1,15	1,14	1,13	1,13	1,15	1,14	84,9
30°C ± 2	75 ± 5	0,32	0,35	0,35	0,35	0,33	0,34	72,2
40°C ± 2	75 ± 5	0,20	0,20	0,21	0,21	0,22	0,21	67,8

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

El resumen de los datos en este estudio de estabilidad se muestran en la **tabla 33**.

**Tabla 33.** Resumen de los ensayos de estabilidad.

	Mes 0	Mes 1	Mes 2	Mes 3
Temp. °C	% Limoneno	% Limoneno	% Limoneno	% Limoneno
Ambiente ± 2	99,4	96,7	90,2	89,4
30°C ± 2	99,4	88,8	80,5	74
40°C ± 2	99,4	83,4	76,9	71,3

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

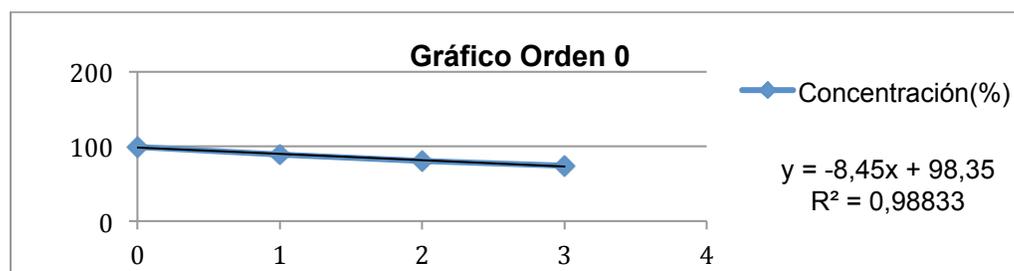
Evidentemente hay un porcentaje de limoneno que se degrada en nuestro estudio de estabilidad cuando se somete la loción a condiciones extremas de temperatura y humedad; condición que algunos autores como (Sherry, Charcosset, Fessi, & Greige-Gerges, 2013) mencionan, alegando que los aceites esenciales son inestables y susceptibles a la degradación en presencia de oxígeno, luz y temperatura, sugiriendo que éstos deberían ser encapsulados en varios sistemas coloidales tales como microcápsulas, microesferas, nanoemulsiones y liposomas que no solo protegerían al principio activo, sino que incrementarían su actividad antimicrobiana.

Los envases PET utilizados para envasar la loción repelente según la USP 33, NF 28 son aquellos que mejor conservan el producto, aunque Shivsharan, Raut, & Shaikh, 2014) menciona que los envases ideales para mantener las propiedades intactas de los fitocosméticos son los de vidrio, ya que debido a su composición son químicamente inertes, protegiendo al producto de interacciones con el oxígeno y la humedad externa.

### 3.7. Determinación de la vida útil.

La predicción de la vida útil de la loción repelente utiliza la ecuación de Arrhenius en donde el principio activo debe conservarse en un T90 %, es decir, puede degradarse hasta un 10 % (USP 33, 2009). En nuestra investigación es complicado tratar de mantener estable al 100% el limoneno que en principio al estar contenido dentro de un aceite esencial se llega a degradar ya sea por volatilización o por influencia de la temperatura y la humedad, sin embargo, estos lineamientos antes mencionados por rigen en principios activos de tipo farmacéutico, no en productos naturales según en ARCSA, ([www.controlsanitario.gob.ec](http://www.controlsanitario.gob.ec)) por lo tanto se hicieron los cálculos necesarios para establecer la cinética de degradación del principio activo (**Ver tabla 34**) y el tiempo de vida útil del mismo.

**Tabla 34.** Cinética de degradación de orden 0.



**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

Al considerarse la cinética de degradación más estricta se calcula la vida útil del producto utilizando los datos de porcentaje de estabilidad para  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  y aplicando la ecuación de Arrhenius que es igual a  $\text{Ln}K = \text{Log} A + (-E_a/R) \cdot 1/C$ . El tiempo de vida útil calculado es de 1,5 meses en los que la loción cumple su función de repelente.

### 3.8. Control de calidad de la loción repelente.

Al momento de elaborar el lote la apariencia de la loción es homogénea y transparente con un ligero olor cítrico amaderado a palo santo.

#### 3.8.1. Análisis Organolépticos.

Como parte del análisis organoléptico mes a mes se obtuvo los siguientes resultados:

**Tabla 35.** Resultados de los análisis organolépticos.

PRUEBA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	CONDICIONES		
		Ambiente $\pm 2$	30 °C $\pm 2$	40 °C $\pm 2$
Color	Mes 0	Transparente	Transparente	Transparente
	Mes 1	Transparente	Transparente	Transparente
	Mes 2	Transparente	Transparente	Ligeramente amarillo
	Mes 3	Transparente	Transparente	Ligeramente amarillo
Olor	Mes 0	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado
	Mes 1	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado
	Mes 2	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado
	Mes 3	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado	Cítrico amaderado
Aspecto	Mes 0	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	Mes 1	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	Mes 2	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	Mes 3	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo

**Fuente:** La autora.

**Elaboración:** La autora.

Los únicos cambios en las lociones se dieron en el mes dos y tres con las lociones almacenadas a 40 °C  $\pm 2$  cambiando su color de transparente a ligeramente amarillo. Este cambio de color en la loción repelente se puede deber a un producto de degradación encontrado en los análisis realizados en el CG – EM llamado butilamine, 1 cloro, 3 metil que podría ser el responsable de dicho cambio cuando interacciona con el aire (Vermeire, Remon, Schrijvers, & Demeulenaere, 2002).

### 3.8.2. Análisis Físico – Químicos.

Los resultados que se muestran a continuación son el resultado de 3 meses de análisis a las lociones almacenadas a temperatura ambiente  $\pm 2$ ,  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

**Tabla 36.** Resultados de las pruebas fisicoquímicas.

PRUEBA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	Temperatura		
		Ambiente $\pm 2$	$30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$	$40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$
pH	Mes 0	5,7	5,7	5,7
	Mes 1	5,7	5,6	5,8
	Mes 2	5,8	5,7	5,8
	Mes 3	5,9	5,9	5,9
Densidad	Mes 0	1,0	1,0	1,0
	Mes 1	1,0	1,0	1,0
	Mes 2	1,0	1,0	1,0
	Mes 3	1,0	1,0	1,0
Viscosidad	Mes 0	14,6 cP <sup>1</sup>	14,6 cP	14,6 cP
	Mes 1	14,0 cP	10,0 cP	7,3 cP
	Mes 2	13,4 cP	8,6 cP	7,2 cP
	Mes 3	12,6 cP	8,1 cP	6,6 cP

<sup>1</sup>Centipoise

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

El estudio estadístico ANOVA realizado en el programa R se muestra en las siguientes 3 tablas:

**Tabla 37.** Resultados de los análisis ANOVA pH.

Temperatura	F value	Pr (>F)
	2.448	0.115

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

**Tabla 38.** Resultados de los análisis ANOVA de la densidad.

Temperatura	F value	Pr (>F)
	0.736	0.488

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

**Tabla 39.** Resultados de los análisis ANOVA de la viscosidad.

Temperatura	F value	Pr (>F)
	103.6	$2.15^{-13}$

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

El análisis de varianza ANOVA acepta la hipótesis nula de que los cambios en los valores de pH no son significativos en función del tiempo (p-valor= 0.115) (**tabla 38**) y que los cambios en los valores de la densidad tampoco son significativos en función del tiempo (p-valor= 0.488); mientras que se rechaza la hipótesis alternativa para la variable viscosidad ya que el p-valor es inferior al nivel de significación (igual o menor a 0.05).

A continuación se muestran los resultados de los análisis estadísticos TUKEY con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 40.** Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre pH vs. tiempo.

Contraste	Diferencia	Valor P	Significativo
Ambiente $\pm 2$ vs 30 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	0.02611111	0.7337719	**
30 $^{\circ}\text{C} \pm 2$ vs 40 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	0.08000000	0.0964489	**
Ambiente $\pm 2$ vs 40 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	-0.05388889	0.2815219	**

(\*Significativo) (\*\*No significativo).

Fuente: Programa R.

Elaboración: La autora.

**Tabla 41.** Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre densidad vs. tiempo.

Contraste	Diferencia	Valor P	Significativo
Ambiente $\pm 2$ vs 30 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	4.440892	0.3076853	**
30 $^{\circ}\text{C} \pm 2$ vs 40 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	0.000000	1.0000000	**
Ambiente $\pm 2$ vs 40 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	4.440892	0.3076853	**

(\* Significativo) (\*\*No significativo)

Fuente: Programa R.

Elaboración: La autora.

**Tabla 42.** Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre viscosidad vs. tiempo.

Contraste	Diferencia	Valor P	Significativo
Ambiente $\pm 2$ vs 30 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	5.502778	0.0000000	*
30 $^{\circ}\text{C} \pm 2$ vs 40 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	-1.5333333	0.0285307	*
Ambiente $\pm 2$ vs 40 $^{\circ}\text{C} \pm 2$	7.036111	0.0000000	*

(\* Significativo) (\*\*No significativo)

Fuente: Programa R.

Elaboración: La autora.

El análisis TUKEY nos revela qué variable es la que presenta mayor grado de variación. Nuestras variables pH vs tiempo y densidad vs tiempo no tienen varianza significativa, mientras que la variable viscosidad vs tiempo sí, ya que el valor P es inferior a 0.05 en todas las condiciones: ambiente  $\pm 2$  vs 30  $\pm 2$ , 30  $^{\circ}\text{C} \pm 2$  vs 40  $^{\circ}\text{C} \pm 2$  y ambiente  $\pm 2$  vs 40  $^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

Al analizar el pH, este se mantiene casi constante en las lociones repelentes, por lo tanto se concluye que no es necesario añadir un excipiente de carácter amortiguador a la formulación; ya que cuando se preparó el prototipo de repelente se hicieron mediciones constantes durante 3 meses del pH antes de someterlo al estudio de estabilidad final; mostrando que el pH no variaba, manteniéndose dentro de los rangos establecidos.

En cuanto a los valores de densidad obtenemos que es el mismo durante los 3 meses bajo las mismas condiciones. En nuestros análisis la viscosidad tiende a disminuir mientras se aumenta la temperatura 10  $^{\circ}\text{C}$ . Según (Marcano, 2013), la viscosidad es fuertemente dependiente de la temperatura, esta dependencia es exponencial y puede haber variaciones de hasta un 10% por cada  $^{\circ}\text{C}$ , lo que justifica los valores obtenidos.

### **3.8.3. Análisis Microbiológicos.**

Los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas mes a mes son los siguientes:

**Tabla 43:** Resultados de las pruebas microbiológicas.

PRUEBA	ESPECIFICACIONES USP	TEMPERATURA	RESULTADO			
			T0	T1	T2	T3
Microorganismos aerobios mesófilos / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente $\pm$ 2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i> / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente $\pm$ 2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i> / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente $\pm$ 2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i> / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente $\pm$ 2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
Hongos filamentosos y levaduras / g	Máximo 100 ufc / g	Ambiente $\pm$ 2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		30 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		40 °C $\pm$ 2		Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

### Análisis Tiempo 0, 1, 2, 3

En cada mes de estudio no hubo crecimiento de alguna colonia presuntiva ni tampoco contaminación en los controles razón por la cual se afirma que la loción es microbiológicamente estable desde el momento de su elaboración.

#### 3.8.4. Test de repelencia del producto elaborado al 2%.

Una vez elaborado el lote, se procede a realizar los ensayos respectivos mes a mes de los repelentes almacenados a las 3 temperaturas y cuyos resultados se muestran a continuación

**Tabla 44.** Porcentaje de repelencia a temperatura ambiente  $\pm$  2 .

Tiempo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	5 Horas	Promedio	Grado de Repelencia
Mes 0	83%	79%	79%	77%	76%	78,8%	IV
Mes 1	81%	81%	77%	75%	75%	77,8%	IV
Mes 2	77%	77%	74%	70%	70%	73,6 %	IV
Mes 3	72%	72%	69%	68%	67%	69,6 %	IV

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

**Tabla 45.** Porcentaje de repelencia a 30 °C ± 2.

Tiempo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	5 Horas	Promedio	Grado de Repelencia
Mes 1	76%	76%	76%	75%	74%	75,4%	IV
Mes 2	73%	70%	68%	68%	66%	69,0%	IV
Mes 3	70%	69%	68%	65%	63%	67%	IV

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

**Tabla 46.** Porcentaje de repelencia a 40 °C ± 2.

Tiempo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	5 Horas	Promedio	Grado de Repelencia
Mes 1	71%	70%	68%	66%	65%	68,0%	IV
Mes 2	67%	67%	63%	63%	62%	64,4%	IV
Mes 3	62%	60%	60%	58%	58%	59,6%	IV

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

Según (Jantan & Zaridah, 1998) la actividad repelente se debe a la presencia de monoterpenos como el  $\alpha$ -pinene, limonene contenidos en los aceites esenciales, se encuentran presentes en el aceite y constituyen los componentes que repelen a los mosquitos satisfactoriamente.

De acuerdo con (Barnard & Xue, 2004) dos formulaciones de repelentes sintéticos contra mosquitos del género *aedes* elaborados al 15% de DEET (OFF) protegen durante 7,2 horas y al 7% DEET (Skinsations) durante 5 horas. Estos autores encontraron que el repelente natural a base de aceite de soya (Bite blocker) elaborado al 2% protege durante 5,5 horas. En otro estudio se menciona un repelente natural llamado Sandokan Body spray que contiene una mezcla de aceites de *Pelargonium graveolens*, *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon winterianus*, *Rosmarinus Officinalis* y *Maleleuca alternifolia* protege hasta 3,8 horas (Masetti & Maini, 2006) . Por lo tanto se puede deducir que los aceites esenciales solos o en combinación con otros muestran actividad repelente, dependiente de la concentración y composición de los mismos.

Nuestro repelente de aceite esencial de palo santo al 2% alcanza las mismas horas de protección que el producto elaborado a base de DEET al 7% lo que nos demuestra que pese a

que fue elaborado a una menor concentración, su fórmula es eficaz para tal fin; siendo una alternativa verde frente a los productos que contienen DEET que han sido asociados con el síndrome de Gulf - war cuando penetra la piel de quienes lo usan. (Hsu, Yen, & Wang, 2013)

En los estudios realizados por (Pavela, 2015) el limoneno es uno de los compuestos que puede crear sinergismo cuando se encuentra interaccionando con otros compuestos como el p cimene y el myrcene, esto podría justificar que pese a que hay degradación del limoneno en las lociones almacenadas a temperatura ambiente  $\pm 2$ ,  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  el efecto repelente sigue siendo el mismo (Clase IV). Según (Mathew, 2017) el efecto sinergista entre los diversos componentes contenidos en los aceites esenciales y la molécula diana intensifica la actividad repelente.

### 3.9.Toxicidad dérmica aguda del repelente.

Para este estudio cada animal fue identificado con marcas en la cola, asignándoles un número único. Las condiciones de temperatura fueron de  $23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y de humedad del 30 al 70%. El bioensayo tuvo una duración de 14 días. Se trabajaron con dos grupos: el grupo A es el de control y el grupo B es el que es tratado con la loción repelente de palo santo.

#### 3.9.1.Variación en Peso.

Las ratas *Wistar* de 8 a 10 semanas de edad, fueron pesadas y sus pesos registrados durante los días: 0 antes de la dosificación, 7 y 14 días después de la dosificación. En nuestro estudio comparando la pesada inicial con la final se puede observar que hubo ganancia de peso en los grupos.

**Tabla 47.** Peso documentado de las ratas (hembras).

GRUPO	1 día	7 días	14 días
Grupo A (solución salina ClNa 0,9 %)	203,3 $\pm$ 5,2 a	206,2 $\pm$ 9,1a	211,3 $\pm$ 11,7a
Grupo B (loción repelente de palo santo)	204,5 $\pm$ 4,6 a	213,2 $\pm$ 10,4a	222,1 $\pm$ 6,7a

Fuente: (PROGECA, 2017)

Elaboración: La autora.

**Tabla 48.** Peso documentado de las ratas (machos).

<b>GRUPO</b>	<b>1 día</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>
<b>Grupo A (solución salina CINA 0,9 %)</b>	205,4±5,2 a	208,2±9,1a	215,1±11,7a
<b>Grupo B (loción repelente de palo santo)</b>	207,2±4,6 a	217,6±10,4a	226,2±6,7a

**Fuente:** (PROGECA, 2017)

**Elaboración:** La autora.

### **3.9.2. Mortalidad.**

La presencia o ausencia de mortalidad en los animales tratados se registró diariamente. Los grupos de ratas dosificados con 4000 mg/Kg, durante y después del estudio no murieron.

**Tabla 49.** Niveles de dosis y mortalidad.

<b>GRUPO</b>	<b>Dosis mg/kg</b>	<b>Sexo</b>	
		<b>Hembras Muertos</b>	<b>Machos Muertos</b>
<b>Grupo A (solución salina CINA 0,9 %)</b>	4000	0/5	0/5
<b>Grupo B (loción repelente de palo santo)</b>	4000	0/5	0/5

**Fuente:** (PROGECA, 2017)

**Elaboración:** La autora.

### **3.9.3. Signos toxicológicos.**

Durante los 14 días de evaluación los animales fueron diariamente observados para su valoración clínica, en donde se observó acicalamiento leve y midriasis en las ratas del grupo B de experimentación. La observación del sitio dérmico expuesto al producto repelente permitió establecer que no hubo presencia de eritema, edema, costra, descamación, cicatrización o hematoma.

### 3.9.4. Valoración Patológica.

Al final del periodo de evaluación, los animales sobrevivientes fueron sacrificados. La necropsia macroscópica incluyó exámenes de los órganos torácicos, abdominales y pélvicos. Como resultado de nuestro estudio no se observó ninguna alteración en los órganos, por lo que no fue necesario la toma de muestras para el estudio patológico.

**Tabla 50.** Observaciones macroscópicas

<b>Hembras y Machos</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
<b>Sistema Respiratorio</b>	0	0
<b>Sistema Nervioso</b>	0	0
<b>Sistema Digestivo</b>	0	0
<b>Sistema Cardiovascular</b>	0	0
<b>Sistema Urogenital</b>	0	0

(0) Ausencia de anomalía

(P) Presencia de anomalía

**Fuente:** (PROGECA, 2017)

**Elaboración:** La autora.

Por tanto los resultados aquí descritos demuestran que la dosis aguda dérmica de 400 mg / 200 Kg peso corporal en ratas, según el protocolo OECD 402 demuestra que es un producto que solo produjo acicalamiento leve que desapareció al cabo de unas horas, que se justifica con la necesidad natural de los animales por retirarse el producto que fue aplicado en su piel. No hubieron signos de mortalidad o valoración patológica, por lo que se aprueba su uso en humanos.

## CONCLUSIONES

- Los estudios de preformulación tanto del principio activo como de los excipientes fueron necesarios para el diseño robusto de la fórmula final de la loción repelente ya que nos permitieron realizar los ensayos necesarios para concebir un producto de calidad.
- La solubilidad del aceite se evidenció utilizando polisorbato 80 y etanol al 96% los cuales sirvieron como solventes ideales dentro de la investigación.
- El diseño experimental de mezclas binarias empleado en esta investigación, nos permite conocer el grado de compatibilidad principio activo – excipiente para poder determinar que componentes pueden incluirse armoniosamente dentro de la misma fórmula sin presentar interacciones que disminuyan el efecto del principio activo y por lo tanto, del efecto repelente.
- La loción elaborada al 2% y su tiempo de duración de 5 horas fueron indicadores de que existe una alternativa natural y eficaz frente a los repelentes comerciales con componentes sintéticos o aquellos repelentes naturales que tienen una mezcla de aceites esenciales, pero que no tienen un tiempo de duración prolongado.

## RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de estabilidad de la loción repelente empleando diversos tipos de envases con el fin de establecer si los componentes con los cuáles están hechos los envases interaccionan con los componentes de la formulación.
- Se recomienda formular otros repelentes con dos o tres aceites esenciales como principios activos ya que se conoce que algunos de ellos pueden tener efecto sinergista de hasta 15 veces más que usando un sólo aceite esencial (aceite de geranio, romero y menta).

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, H., Alves, C. N., Guimarães, E. F., Carreira, L. M. M., & Maia, J. G. S. (2011). Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4–6), 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.bse.2011.05.021>.
- Arapa, S. (2010). Extracción y caracterización del aceite esencial de molle (*schinus molle*). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, (3), 82–86.
- Arcsa. Normativas. Disponible en <http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/12/RESOLUCION-NRO.-ARCSA-DE-034-2015GGG1.pdf>
- Barel, André, PAye, Marc, Maibach, H. (1970). *Cosmetic Science and Technology*. New York. <http://doi.org/10.1016/B978-1-85617-943-0.10041-3>
- Barnard, D. R., & Xue, R.-D. (2004). Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 726–730. <http://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.726>.
- Burlando, B., Verotta, L., Cornara, L., & Bottini, E. (2010). *Herbal Principles in Cosmetics. Properties and Mechanisms of Action*.
- Burt, S. (2012). Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in food. *Hidrobiologica*, 22(3), 201–206. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Courtney J, (2002). Insect Repellent. Texas A&M Agrilife Extension. September.
- Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The Therapeutic Benefits of Essential Oils. *Nutrition, Well-Being and Health*, 155–78. <http://doi.org/10.5772/25344>.
- Dormer, W. Gomes, R. Meek, M. E. (1998). Concise International Chemical Assessment Document 4: METHYL METHACRYLATE, 1–40.
- Ferreira-Maia, M., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S11. <http://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11>.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-33 NF28. Vol Compendios de Normas Oficiales.
- Fradin, M. S., & Day, J. F. (2002). Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine*, 347(1), 13–18. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa011699>.

- García, E.(2001). Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia.
- GHO | By country | Ecuador - statistics summary (2002 - present). (n.d.). WHO.
- Gopinath, R., & Naidu, R. a S. (2011). Pharmaceutical Preformulation Studies. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2(5), 1391–1400.
- Hollingsworth, R. (2005). Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 772–779. <http://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.772>
- Hsu, W.-S., Yen, J.-H., & Wang, Y.-S. (2013). Formulas of components of citronella oil against mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Journal of Environmental Science and Health.*, 48(11), 1014–1019. <http://doi.org/10.1080/03601234.2013.816613>
- Jantan, I., & Zaridah, M. (1998). Development of Environment-Friendly Insect Repellents From the Leaf Oils of Selected Malaysian Plants. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*, (April), 1–7.
- Kalayci, S., Demirci, S., & Sahin, F. (2014). Determination of antimicrobial properties of Picaridin and DEET against a broad range of microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 407–411. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1456-4>
- Kalita, B., Bora, S., & Sharma, A. K. (2013). Plant essential oils as mosquito repellent. *Int J Res Dev Pharm Life Sci*, 3(1), 741–747.
- Leyva, M., Jairo, R., & Stashenko, E. (2007). Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de bursera graveolens, 201–202.
- Manzano, p. (2013). potencial fitofármaco de bursera graveolens sp (palo santo), del bosque seco tropical, península de santa elena, provincia del guayas. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Marcano, R. (2013). Ley de Newton Ing. Rubén Marcano.
- Masetti, A., & Maini, S. (2006). Arm in cage tests to compare skin repellents against bites of *Aedes albopictus*. *Bulletin of Insectology*, 59(2), 157–160.
- Mathew, N. (2017). Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. *Parasitology Research*, 821–825. <http://doi.org/10.1007/s00436-016-5351-4>
- Mazzieri, V. L. y M. R. (2014). Repelentes de mosquitos, 2(Diciembre), 5–7.
- Melrose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2015). *Statewide Agricultural Land Use Baseline*.

- Moreno, J., Rojas, L. B., Aparicio, R., Marcó, L.-M., & Usubillaga, A. (2010). Chemical composition of the essential oil from the bark *Bursera tomentosa* (Jacq) Tr & Planch. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 9(6), 491–494.
- Nerio, L. S., Olivero, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372–378. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>
- Patel, E. K., Gupta, A., & Oswal, R. J. (2012). Mosquito Repellent Methods. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(3), 310–317.
- Pavela, R. (2015). Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitology Research*, 114(10), 3835–3853. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4614-9>
- Rowe, R. Sheskey, P. Owen, S. (2006). Handbook of pharmaceutical excipients. Fifth edition.
- Rzedowski, J., Median, R., & Calderón, G. (2004). Las especies de bursera ( burseraceae ) en la cuenca superior del río papaloapan ( méxico ). *Acta Botánica Mexicana*, 66, 23–151.
- Salas M., Zaragocín R. (2006). “Extracción y caracterización Físico química y determinación de componentes del aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) de tres lugares diferentes de la provincia de Loja: El Empalme, La Ceiba y Yaraco”. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero, Instituto de Química Aplicada. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Salvador, U. D. E. E. L., Isabel, R., Romero, O., Del, G., Orellana, C., Mercedes, A. N. A., & Pérez, T. (2011). “ *Elaboración de una loción repelente a partir de los extractos y aceites esenciales de ocimum micranthum ( albahaca ) y cymbopogon nardus ( citronella )* .
- Santana, P. M., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., & Orellana, a. (2009). Anti-inflammatory effect and chemical composition of bursera graveolens Triana & Planch. branch oil (palo santo) from Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3), 45–53.
- Sevillano, O. P., Rodríguez, C. N., Canchachí, W., Torres, C. L., Pretel, O., & Torres, P. (2012). Efecto de canchalagua, *Hypericum laricifolium*, sobre el perfil lipídico y glucosa sérica de *Rattus rattus albinus*. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo*, 32, 4–10.
- Shai, Avi Maibach, Howard Baran, R. (2009). *Handbook of Cosmetic Skincare*.
- Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., & Greige-Gerges, H. (2013). Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of Liposome Research*, 23(4), 268–75. <http://doi.org/10.3109/08982104.2013.819888>

- Shivsharan, U., Raut, E., & Shaikh, Z. (2014). Packaging of Cosmetics: a Review. *Journal of Pharmaceutical & Scientific Innovation*, 3(4), 286–293. <http://doi.org/10.7897/2277-4572.034158>
- Sritabutra, D., & Soonwera, M. (2013). Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(4), 271–276. [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60069-9](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60069-9)
- Sun, J. (2007). D-Limonene : D-Limonene. *Alternative Medicine*, 12(3), 259–264.
- Talukder, F. A., & Howse, P. E. (1993). Deterrent and Insecticidal Effects of Extracts of Pithraj, *Aphanamixis-Polystachya* (Meliaceae), against *Tribolium-Castaneum* in Storage. *Journal of Chemical Ecology*, 19(11), 2463–2471.
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013a). Estudio comparativo de tecnología dsc e infrarrojo en la identificación de posibles incompatibilidades en mezclas binarias activo-excipiente. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013b). *Surfactants in personal care products and decorative cosmetics*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vacacela, M. (2012). Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*).
- Valgreen. (2009). ¿Qué es la fitocosmética? Retrieved from <http://www.valgreen.es/blog/%25C2%25BFque-es-la-fitocosmetica/>
- Valiente, M. (2002). el-ph-de-la-piel.pdf.
- Vermeire, A., Remon, J. P., Schrijvers, D., & Demeulenaere, P. (2002). A new method to obtain and present complete information on the compatibility: study of its validity for eight binary mixtures of morphine with drugs frequently used in palliative care. *Palliative Medicine*, 16(5), 417–424. <http://doi.org/10.1191/0269216302pm542oa>
- Viana, O. S., Araújo, A. A. S., Simões, R. A., Soares, J. L., Matos, C. R. S., Grangeiro, S., ... Rolim-Neto, P. J. (2008). Kinetic analysis of the thermal decomposition of efavirenz and compatibility studies with selected excipients. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(2), 211–216.
- Who. (2009). Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. *WHO Technical Report Series*, (953), 87–130.
- Yukawa, C., Iwabuchi, H., Kamikawa, T., Komemushi, S., & Sawabe, A. (2004). Terpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 565–570.

## **ANEXOS**

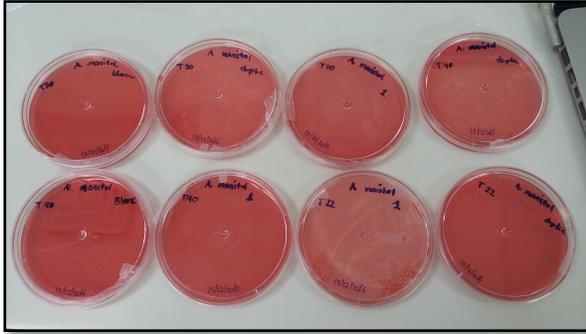
**Anexo 1.** Arrocerá en el sector Vadeal en Macará.



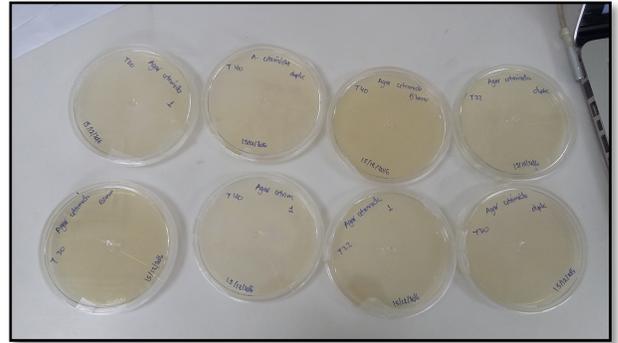
**Anexo 2.** Trampa de luz UV con malla para atrapar mosquitos.



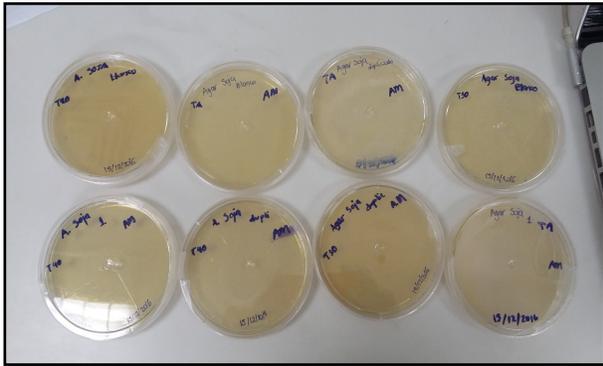
**Anexo 3. Agares para recuento microbiano.**



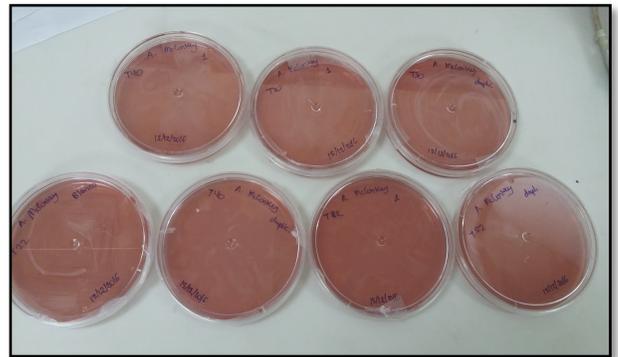
Agares Manitol salado.



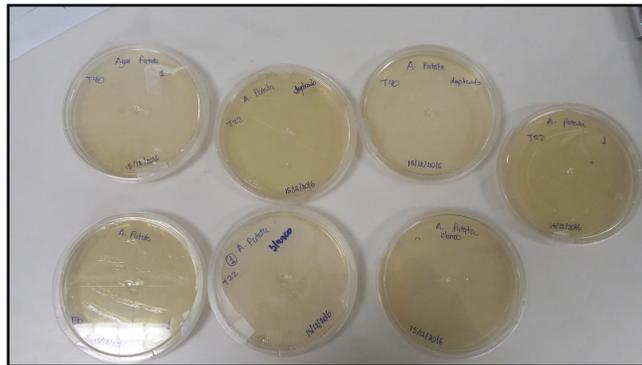
Agares Cetrinida.



Agares Soja – Tripticasa.



Agares MacConkey.



Agares Patata - Dextrosa.

**Anexo 4.** Cajas petri – test de actividad repelente.



**Concentración al 0.5%**



**Concentración al 1 %**



**Concentración al 2 %**



**Concentración al 3%**

