



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*)

Trabajo de fin de titulación.

AUTORA:

Vacacela Ramón Marisol Fernanda

DIRECTOR:

Ojeda Riascos Edgar Santiago, BQF

LOJA – ECUADOR

2012

CERTIFICACIÓN

BQF.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE CARRERA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “**Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens* (palo santo)**”, realizado por la profesional en formación: Vacacela Ramón Marisol Fernanda, cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, septiembre del 2012

f) _____

CI: 1103660328

BQF. Edgar Santiago Ojeda Riascos.

DIRECTOR

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Vacacela Ramón Marisol Fernanda, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

f) _____
CI: 110485666-9
Vacacela Ramón Marisol Fernanda
TESISTA

DEDICATORIA

A mis padres Carlos y Sara, mis hermanos Rocío y Danny pues sin ellos no estaría donde me encuentro, ya que siempre estuvieron conmigo en todo momento para apoyarme y animarme a seguir y poder cumplir mi objetivo planteado.

En fin, a todas las personas que me han brindado su ayuda y a aquellas que he conocido en el transcurso de mi paso por la universidad y que ahora forman parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por guiarme siempre en cada momento de mi vida y darme todos los recursos necesarios para cumplir satisfactoriamente mis metas propuestas.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por abrirme sus puertas y permitirme cumplir mis objetivos planteados a nivel académico y también personal.

Al BQF. Santiago Ojeda Riascos por su apoyo y por compartir sus conocimientos en cada etapa del proyecto.

Al Departamento de Química, Ingeniería de procesos, Laboratorio de Biología, Instituto de Ecología y Laboratorio de Química que a lo largo de ésta investigación estuvieron dispuestos a colaborar y brindarme todos los medios posibles a su disposición.

Y finalmente a todas y cada una de las personas, docentes, compañeros, amigos y familiares que tuvieron que ver en el desarrollo de esta investigación pues mediante su conocimiento, consejos, apoyo y comentarios ésta investigación llega a culminarse, así como mi paso por ésta prestigiosa universidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. Portada y contraportada	I
II. Certificación de revisión del tutor.....	II
III. Cesión de derechos.....	III
IV. Certificación de autoría.....	IV
V. Agradecimientos	V
VI. Dedicatoria.....	VI
VII. Contenido.....	VII
VIII. Resumen.....	XIII
IX. Artículo.....	XIV

I. Fin, Propósito y Componentes

1.1 Fin del proyecto	2
1.2 Propósito del proyecto	2
1.3 Componentes del proyecto	2

II. Introducción y Antecedentes

2.1 Introducción	5
2.2 Antecedentes.....	8
2.2.1 Aplicaciones y usos de aceites esenciales.....	8
2.2.2 Repelentes naturales	8
2.2.2.1 Efecto repelente de los aceites esenciales.....	9
2.2.2.2 Concentración de los aceites esenciales con efecto repelente	9
2.2.2.3 Componentes responsables del efecto repelente de los aceites esenciales.....	10
2.2.3 Información del material vegetal.....	10
2.2.3.1 Características botánicas de la familia <i>Burseraceae</i>	11
2.2.3.2 Características botánicas de la especie <i>Bursera graveolens</i>	12
2.2.4 Composición química del aceite esencial de la especie <i>Bursera graveolens</i>	12
2.2.4.1 Usos de la especie <i>Bursera graveolens</i>	13
2.2.5 Fitofármacos.....	13
2.2.6 Formas farmacéuticas líquidas de aplicación tópica.....	14
2.2.6.1 Lociones: Tipos	14
2.2.6.2 Excipientes	15

2.2.7 Método de manufactura de la loción.....	16
2.2.8 Especificaciones para emulsiones.....	16
2.2.8.1 Características organolépticas.....	16
2.2.8.2 Estabilidad térmica.....	17
2.2.9 Control microbiológico.....	17
2.2.10 Predicción de la vida útil de la loción repelente: Estudio de estabilidad acelerada por el método de Arrhenius.....	18

III. Materiales y Métodos

3.1 Obtención de la materia prima (aceite esencial)	20
3.2 Estudios de preformulación.....	21
3.2.1 Valoración del principio activo (<i>Bursera graveolens</i>).....	21
3.2.1.1 Condiciones del equipo.....	21
3.2.2 Evaluación de la propiedades físicas del principio activo (<i>Bursera graveolens</i>).....	21
3.2.3 Estudio de compatibilidad excipientes-aceite esencial: Diseño factorial Plackett y Burman	23
3.3 Planteamiento de la fórmula	24
3.3.1 Formulación de la loción repelente.....	25
3.4 Ensayos de estabilidad del producto terminado.....	26
3.5 Predicción de la vida útil de la loción repelente /Método de Arrhenius como estudio de estabilidad acelerada.....	26
3.6 Bioensayo de actividad repelente	27
3.7 Determinación de la toxicidad aguda por la vía dérmica de la loción a partir del aceite esencial de palo santo (<i>Bursera graveolens</i>).....	28
3.8 Esquema de procedimiento	30

IV. Resultados y Discusión

4.1 Identificación de componentes mediante GC-MS	32
4.2 Control de calidad del aceite esencial de palo santo	33
4.3 Compatibilidad excipientes-aceite esencial: Diseño factorial Plackett y Burmán	33
4.4 Elaboración de la loción repelente.....	38
4.4.1 Fórmula de composición.....	38
4.5 Pruebas de estabilidad de la loción repelente.....	38
4.5.1 Análisis organoléptico	38

4.5.2 Análisis físico-químico.....	39
4.5.3 Análisis microbiológico.....	41
4.6 Determinación de la vida útil de la loción repelente mediante el método de Arrhenius	42
4.7 Determinación de la actividad repelente.....	43
4.8 Efecto toxicológico por la vía dérmica de la loción repelente	45

V. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones.....	48
5.2 Recomendaciones.....	50

VI. Anexos51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Zonas climáticas en el mundo	18
Tabla 2. Grado de solubilidad mediante términos descriptivos	22
Tabla 3. Distribución y acondicionamiento de las mezclas.....	24
Tabla 4. Fórmula base para la elaboración de una loción O/W	25
Tabla 5. Métodos empleados para el estudio de estabilidad de la loción repelente	26
Tabla 6. Compuestos identificados del aceite de palo santo mediante Índice de Kóvats	32
Tabla 7. Factores o excipientes empleados para el diseño de Plackett y Burman	34
Tabla 8. Matriz “Plackett y Burman”, se relaciona la potencia del principio activo para cada mezcla	35
Tabla 9. Matriz donde se observa la significancia de cada factor	36
Tabla 10. Fórmula escogida para la elaboración de la loción repelente	37
Tabla 11. Resultados de los análisis organoléptico de la loción	39
Tabla 12. Resultados del análisis físico-químico de la loción	39
Tabla 13. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre Densidad vs. Tiempo	40
Tabla 14. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre pH vs. Tiempo	40
Tabla 15. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre % (concentración de aceite) vs. Tiempo	40
Tabla 16. Resultado de análisis microbiológico de la loción	41
Tabla 17. Concentración del aceite esencial de la Mezcla 5 luego del estudio de Plackett y Burman	42
Tabla 18. Resultados del efecto repelente de la loción evaluado mes a mes	43
Tabla 19. Variación en peso (g) de los animales (hembras) sometidos al estudio de la toxicidad aguda dérmica	45
Tabla 20. Observaciones Macroscópicas	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Árbol de palo santo (<i>Bursera graveolens</i>)	11
Gráfico 2. Mapa del área de recolección	20
Gráfico 3. Proceso de manufactura de la fórmula de la loción repelente	25
Gráfico 4. Esquema general de los componentes de la investigación.	30
Gráfico 5. Cromatograma del aceite esencial de palo santo por GC-MS.	32
Gráfico 6. Producto terminado	38
Gráfico 7. Comparación del periodo de duración de diferentes repelentes comerciales y la loción repelente de palo santo	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Equipo de cromatografía de gases Agilent serie 6890 N, acoplado a un espectro de masas Agilent series 5973 Inert.....	52
Anexo 2. Mezclas generadas a partir de la matriz de experimentación.....	53
Anexo 3. Viales para la distribución y acondicionamiento de las muestras de acuerdo al diseño factorial de Plackett y Burman	55
Anexo 4. Trampas de luz empleadas para la recolección de mosquitos para el bioensayo de actividad repelente	56
Anexo 5. Resultados de los análisis microbiológicos en agar realizados al producto ..	57

ABREVIATURAS

DEET	N, N-dimetil-m-toluamida
GC/MS	Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
O/W	Oil-in-Water. Agua-en-aceite
INH	Instituto Nacional de Higiene
WHO	World Health Organization. Organización Mundial de la Salud
USP	Pharmacopeia of United States. Farmacopea de los Estados Unidos
OECD 402	Organización Económica para la Cooperación y el Desarrollo
% ID P.A	Porcentaje de identificación del principio activo
BHT	Butil Hidroxi Tolueno
BHA	Butil Hidroxi Anisol
c.s	Cantidad suficiente
Ufc	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN EJECUTIVO

En la presente investigación se estudió el aceite esencial de la especie *Bursera graveolens* (palo santo) como principal componente de una loción repelente de origen natural. Para ello se realizaron estudios de preformulación y formulación utilizando el diseño factorial de Plackett y Burman que permitieron encontrar los excipientes adecuados que no influyan en la degradación o disminución de la potencia del aceite esencial. Y así mismo se valoró la presencia del aceite esencial mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS). Los resultados obtenidos se sometieron a tratamiento estadístico utilizando el programa XLSTAT, lo que permitió elegir la fórmula más estable, en este caso se elige una fórmula en la cual excluya el excipiente BHT debido que su presencia provoca una disminución en la concentración del aceite esencial. Finalmente la fórmula obtenida se sometió a estudios toxicológicos (Toxicidad Aguda Dérmica realizada en ratas *Wistar*), de estabilidad a diferentes temperaturas (ambiente, 30 °C y 40 °C) y de vida útil para así garantizar la eficacia y seguridad de la loción repelente.



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA
TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

"DESIGN AND DEVELOPMENT OF A REPELLENT LOTION FROM ESSENTIAL OIL OF THE SPECIE *Bursera graveolens* (palo Santo)"

Marisol F. Vacacela¹; Santiago Ojeda².

¹Biochemistry and Pharmacy School- Universidad Técnica Particular de Loja

²Institute of Applied Chemistry, Universidad Técnica Particular de Loja

San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja - Ecuador.

www.utpl.edu.ec

mfvacacela@utpl.edu.ec; esojeda@utpl.edu.ec

ABSTRACT

In the present research we studied the essential oil of the specie *Bursera graveolens* (Palo Santo) as the main component of a natural repellent lotion. For this, we made studies about pre-formulation and formulation using the factorial design of Plackett and Burman which allowed finding the suitable excipients that do not affect degradation or decrease in power of the essential oil. Likewise we valued the presence of essential oil by Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry (GC/MS). The obtained results were subjected to statistical processing using the XLSTAT program, allowing us to choose the most stable formulation. In this case the chosen formula excluded the excipient BHT due to its presence caused a decrease in the concentration of essential oil. Finally the obtained formula was subjected to toxicological studies (Acute Dermal Toxicity performed in *Wistar* rats), stability at different temperatures (ambient: 17 ° C approximately, 30 ° C and 40 ° C) and shelf life to ensure the safety and efficacy of the repellent lotion.

Keywords: GC/MS, *Bursera graveolens* (palo santo), repellent natural origin.

INTRODUCTION

Mosquitoes are the most important group of arthropods in relation to medicine. They are a very large group with over 3,000 species.

The 3 most important genres are: *Anopheles*, *Culex* and *Aedes* ⁽¹⁾.

To obtain blood, females are attracted to certain characteristics of human skin, such as heat, humidity and perspiration.

Mosquitoes that have domestic habits are more likely to transmit diseases such as malaria, filariasis *Brugia* and *Wuchereria*, urban yellow fever, dengue, equine encephalitis and encephalitis viral.

The mosquitoes control is done through public health actions and individual actions through the use of repellents ^(1, 2).

Repellents are chemical substances that interfere with the chemical receptors of insects and avoid that they set on the skin for biting, for that reason they avoid approaching the body areas covered by repellent ^(3, 4, 5).

Common repellents are generally those which contain DEET ((N, N-diethyl-3-metil-benzamida o N, N-dimetil-m-toluamida), and are used worldwide against mosquitoes and biting flies. However, studies show that DEET may have a toxic effect on nervous system not only insects, but also in mammals by inhibiting the activity of a key enzyme of the central nervous system, acetylcholinesterase. This means that repellents that contain DEET are actually really toxic and can damage the nervous system of human beings ^(6, 7, 8).

The need to find natural alternatives to the control of mosquitoes bite that replace synthetic products, potentially toxic to both the human being and the environment, promotes the development of a bio-repellent that would have the same characteristics of synthetics. Many plants produce substances or metabolites to protect themselves from insects and other herbivores, including essential oils which give the peculiar smell to some flowers, fruits and leaves. These metabolites are an interesting option as a source of repellents and insecticides

against mosquitoes and other insects of sanitary interest ^(9, 10).

Field studies have shown that the repellent protection provided by some essential oils is similar to the protection provided by the DEET ⁽¹¹⁾.

Not all mosquitoes species are sensitive to a single chemical compound. What is interesting with natural repellents is that the spectrum against these mosquitoes increases dramatically as the essential oils are mixtures of many chemical substances. Ecuador, for being a multicultural country and have a high biodiversity, it becomes a paradise for the interest of the pharmaceutical industry, due to the greatest asset is reflected in the ancient wisdom, related to the vegetal world ^(12, 13).

The specie *Bursera graveolens*, commonly called palo santo, is a native plant of the coasts from Ecuador and Peru. Among the substances that compose it are: α -phellandrene, D-germacrene, pinene, p-cymene, limoneno, etc., responsible of aroma, the spicy characteristic, sweet and balsamic odor. Although studies of palo santo oil are mostly of wood, some studies show no significant difference between the essential oil of fruit and wood, so we recommend the use of essential oil from fruits of palo santo (*Bursera graveolens*) avoiding cut down trees ^(14, 15).

Among the fundamental properties of essential oils include the anti-inflammatory, antirheumatic, antibacterial, etc. In our environment is known the popular use of this plant: dry wood as incense and especially to scare away the mosquitoes⁽¹⁴⁾.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining raw material

Obtaining the essential oil was made from the fruits of the species *Bursera graveolens* (Palo Santo) of Zapotillo Canton. The extraction method used is by steam distillation in a Clevenger type equipment⁽¹⁵⁾.

PREFORMULATION STUDIES

Valuation of essential oil

The analysis of essential oil components was performed by Gas Chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) and performed on an Agilent 6890 N series, and a mass spectrum Agilent series 5973 inert, equipped with a data system MSD-ChemStation D.01.00 SP1.

For this, the preparation of the mixtures was previously performed by placing 10 µL of essential oil in 990 µL of dichloromethane.

The characterization of essential oil components was executed by computer comparison of their mass spectra with the database of the equipment used (MSD-ChemStation D.01.00 SP1) and Kovats index.

The essential oil, was subjected to a series of physical tests such as determination of density (pycnometer method), solubility (according to the technique set forth in USP NF 32) and determining the volatile content for difference in weight after being subjected to high temperatures.

COMPATIBILITY STUDY

Factorial design Plackett and Burman

The fundament of Plackett and Burmann factorial design is that "the physical and chemical stability of mixtures of various excipients and the active principle to study, after being stored for a time certain conditions, provided information about the compatibility between each of the excipients and the active principle." For this design we used eleven factors or carriers at two different levels indicated by the signs + and -, "+" high concentration and "-" low concentration. Four of the factors are dummy variables and do not contain excipients either of the two levels, and they are included to perform the statistical analysis, all these data are represented in a matrix of experimentation⁽¹⁶⁾.

The number of mixtures originating from the experimental matrix is 12. We proceeded to prepare 50 g of mixtures in glass vase, combining successive portions of the excipients with the essential oil. Once prepared the samples were distributed in vials of 10

mL capacity and kept at certain conditions: room temperature ambient: 17 ° C approximately, 30 ° C and 40 ° C for 8 weeks.

After the 8 weeks the samples analyzed by GC/MS, using the same technique which the essential oil was analyzed for the preformulation process, in order to determine the content of active principle and detect impurities or degradation products in the formulation ⁽¹⁶⁾.

Statistical analysis

The data obtained were analyzed using a table that relates the effect for each factor, depending on potency or percentage of identification of the essential oil is calculated with the respective formulas experimental variance, standard deviation and finally the statistical significance with a value of $p = 0.05$ $p = 0.005$.

STABILITY TESTS OF THE FINISHED PRODUCT

Once the lotion repellent it obtained, was subjected to stress conditions to determine the 3 months stability following the conditions proposed by the National Institute of Hygiene and Tropical Medicine "Leopoldo Izquieta Pérez" (INH) that are at room temperature: 17° C approximately, 30 ° C \pm 2 ° C and 40 ° C \pm 2 ° C with a relative humidity of 75 % \pm 5 %.

The analysis as well as the methods and techniques used to perform stability

tests in this research are detailed in Table 1.

Table 1. Method used to evaluate the stability of the repellent lotion.

ACTIVITY	METHOD
Physicochemical analysis	pH, Density, GC/MS
Microbiological analysis	Aerobios mesófilos (USP 32) Escherichia coli (USP 32) Hongos-levaduras (USP 32) Staphylococcus aureus (USP 32) Speudomona aeruginosa (USP 32)
Organoleptic analysis	Appearance, consistency, odor and color

PREDICTION OF SHELF LIFE OF THE REPELLENT LOTION / ARRHENIUS METHOD

For determining the shelf life of the repellent lotion by the method of Arrhenius first, through suitable technique (GC / MS) was assessed the concentration of active ingredient (essential oil) every certain interval time (0, 1, 2, 3 months) and at different temperatures: temperature: 17° C approximately, 30 ° C \pm 2 ° C, 40 ° C \pm 2 ° C and a relative humidity of 75 % \pm 5 %. Then we determined the reaction order. The graphs are plotted with their respective slopes as a function of time and temperature of study. Finally shelf life is expressed as T90 % (time in which the active ingredient becomes degraded by 10 %) at a temperature of 30 ° C, Zone 4, which corresponds to the Ecuador location.

BIOASSAY OF REPELLENT ACTIVITY

The evaluation of the repellent effect or repellency takes place according to the method proposed by Talukder y Howse⁽¹⁷⁾.

We use filter paper in 9 cm diameter separated into two equal halves. Repellent lotion is applied in one of the halves. The halves treated were allowed to stand until the lotion is completely dry. The treated and untreated halves of each circle are placed contiguously into Petri boxes, and released within 10 mosquitoes generally known as *zancudos* corresponding to the *Culicidae* species and commonly found in our environment. In this research, we use mosquitoes collected by light trapping (white light and UV light).

STATISTICAL ANALYSIS

The data were converted to a repellency percentage (PR) through the formula:

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

Where Nc is the percentage of mosquitoes present in the middle control half.

The mean values were categorized based on a scale comprising from 0 % to 100 % effective repellent^(17, 18).

DETERMINATION OF THE ACUTE TOXICITY FOR DERMAL VIA OF REPELLENT LOTION

The repellent lotion product from the essential oil of palo santo (*Bursera graveolens*) was analyzed in the laboratory for analysis PROGECA School of Chemical Sciences, Universidad de Guayaquil, to know its acute toxicity by the dermal via and get to know if the structural formula produces a deleterious effect on the skin.

The experimental design used by the laboratory for analysis PROGECA for repellent lotion of essential oil of palo santo (*Bursera graveolens*, is based on the procedures described in the protocol of the OECD 402 (Economic Organization for Trade and Development 2001)

The experimental animals (females and males) received the dosage over a period of 14 days, according to body weight of each animal, which was performed for the respective calculation.

RESULTS AND DISCUSSION

QUALITY CONTROL OF ESSENTIAL OIL PALO SANTO

The characterization of the oil is reflected by computer comparison of their mass spectra (Graphic. 1) and identification of its components through Kovats index is detailed in Table 2.

Graphic 1. Chromatogram of the essential oil used in the investigation

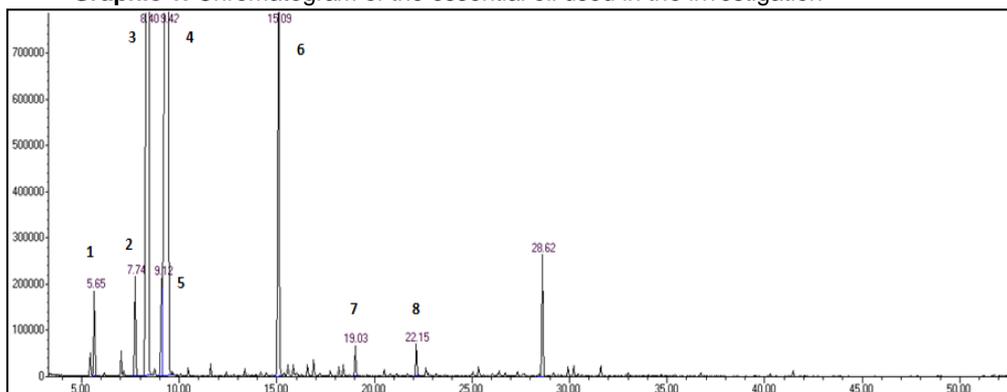


Table 2. Compounds identified palo santo oil by Kovats Index

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

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

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

b= average percentage calculated based on the % of area of the peaks reported in the column DB5-MS

The data obtained from preformulation studies of essential oil were as follows:

- **Density:** 0.845 g / mL
- **Solubility:**
Glycerin: Very soluble
- **Volatile content:** 92 %

According to the research conducted by Salas M., and Zaragocín R. ⁽¹⁵⁾ these values are consistent with the standards established for the essential oil of palo santo.

COMPATIBILITY EXCIPIENTS- ESSENTIAL OIL:

Factorial design Plackett and Burman

The general composition of the mixtures is a 3 % of essential oil and 97 % of excipients.

In the present study design factors are detailed in Table 3.

Depending on the level of factors is obtained experimental matrix shown in Table 4 with the power corresponding

to each mixture. Since each output data obtained for each formulation was calculated by the average effect.

Table 3. Factors used for the design of Plackett and Burman

FACTORS	LEVEL	COMPONENTS	CONCENTRATION % (p/v)
A	+	Sodium lauryl sulfate	1
	-	Sodium lauryl sulfate	0,8
B	+	Cetostearyl alcohol	2
	-	Cetostearyl alcohol	1,5
C	+	Propylene glycol	14
	-	Propylene glycol	10
D	+	Vitamin E	0,06
	-	Vitamin E	0,03
E	+	Vaselin liquid	2
	-	Vaselin liquid	0,5
F	+	Silicone oil	1
	-	Silicone oil	0,3
G	+	BHT	0,05
	-	BHT	0,03

For example, the effect of A (E_A) is calculated by adding and subtracting the responses obtained for the different

blends. The signs are marked by "A" column of the matrix:

$$E_A = (\text{Answers } +) / 6 - (\text{Answer } -) / 6$$

Table 4. Matrix "Plackett and Burmann," relates the active power for each mixture.

MIXED NUMBER	FACTORS OR EXCIPIENTS							DUMMIES VARIABLES				POWER o % ID P.A
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	78
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	87
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	78
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	78
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	91
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	65
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	69
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	89
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	79
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	92
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	81
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81
SUM (+)	491	485	505	483	479	500	464	494	493	457	471	
SUM (-)	477	483	463	485	489	468	504	474	475	511	497	
AVERAGE EFFECT	2,4	0,27	6,93	-0,27	-1,73	5,27	-6,73	3,4	3,07	-8,93	-4,4	
X2								11,56	9,406	79,798	19,36	

To determine the significance of effects, the experimental variance is calculated (S_{exp}), it is considered to be the variance of the effects of factors "dummy" (H, J, K, L), as follows:

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

$$S^2_{exp} = \frac{66.746}{4}$$

$$S^2_{exp} = 16.687$$

The experimental standard deviation (s) is the square root of the experimental variance:

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

$$S = 4.0849$$

For each effect is calculated the experimental t "t_E" and:

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

With these values is assembled in Table 5, the same can observe the values of "t" that further away from 0 thus representing the excipients that directly or indirectly influence the power of essential oil.

Table 5. Matrix "Placket and Burmann" which relates the active power for each mixture.

MIX	ANSWER	FACTOR	EFFECT	X2	"t"	SIGNIFICANCE			
						95	97,5	99	99,5
						p= 0,05	p= 0,025	p= 0,01	p= 0,005
						2,132	2,776	3,747	4,604
1	78	1							
2	87	A	2,40		0,240	*	*	*	*
3	78	B	0,27		0,251	*	*	*	*
4	78	C	6,93		0,669	*	*	*	*
5	91	D	-0,27		0,441	*	*	*	*
6	65	E	-1,73		1,030	*	*	*	*
7	69	F	5,27		0,532	*	*	*	*
8	89	G	-6,73		2,949	**	**	*	*
9	79	H	3,40	11,560	0,153	*	*	*	*
10	92	J	3,07	9,425	0,562	*	*	*	*
11	81	K	-8,93	79,745	0,081	*	*	*	*
12	81	L	-4,40	19,360	1,912	*	*	*	*

(*) Not significant, (**) SIGNIFICANT.

The mixture 8 highlighted, is the formulation with a value of "t" significant.

It is clearly seen that the most influential factor in the formulation with respect to the essential oil is the factor "G" corresponding to the carrier BHT, the same that serves as an antioxidant, providing chemical stability of the formulation. However, studies by Venereo J. (2002), demonstrate that the effect of BHT is strengthened to be used with BHA because its effects reinforce each other.

BHT alternatively, in the end product is used as antioxidant Vitamin E, the final formula chosen corresponds to that which excludes the factor 8 (BHT).

DEVELOPMENT OF THE REPELLENT LOTION

The lotion formulated to repel mosquitoes has been developed in the DC (Department of Chemistry) technology laboratory and the composition formula is:

Each 100 g. contains: Essential oil of palo santo (<i>Bursera graveolens</i>)...3% Excipients.....q.s

STABILITY TESTS OF REPELLENT LOTION

- Organoleptic analysis of repellent lotion

The lotion has a homogeneous appearance, and a milky white due to the excipients used as cetostearyl alcohol which acts increasing its viscosity, only a slight color change in the second month in lotions stored at 40 ° C and the third month in the lotions you store the environment, 30 ° C and 40 ° C

- Physical-chemical analysis of the repellent lotion

The results reported in Table 6 indicate that there is no significant difference between the pH and density factors. However, as for the density there is a significant difference when comparing the conditions of 40 ° C, ambient and 40 ° C-30 ° C, since the density depends on the composition of the oil phase, the proportion of the phases and

concentration the emulsifier, reflected in the degree of emulsification, therefore the density varies ⁽²⁰⁾.

Table 6. Results of physico-chemical analysis of the lotion

PARAMETERS	CONDITIONS	MONTHS			
		0	1	2	3
g/mL	Ambient	1	1	0,99	1
	30 °C	-	1	1	1,009
	40 °C	-	1	1	1
(Density) --	Ambient	5,5	5,1	4,5	4,3
	30 °C	-	4,6	4,5	4,2
	40 °C	-	4,5	4,3	4
% oil concentration	Ambient	96	91	75,154	70,304
	30 °C	-	91	74,192	72,660
	40 °C	-	91	83,709	71,240

As to the values obtained after analysis by GC / MS of the essential oil within the repellent lotion formula can be said that both the variation in pH as the type of packaging used to store the lotion influenced so that it has decreased, according to USP 32, the specifications for containers should be chosen according to the characteristics of the product to be stored, thus to prevent rapid volatilization of the oil container is most suitable to choose a glass container.

- Microbiological analysis product

Performed the microbiological analysis (Table 7) of the repellent lotion, it was found that there was no contamination in the three conditions, only a slight increase from month 2 and month 3 mostly in mesophilic aerobic bacteria, and fungi and yeast but they are within allowable limits given by the USP 32.

Table 7. Results of microbiological analysis of the lotion

ANALYSIS	USP SPECIFICATIONS	CONDITIONS	RESULTS IN MONTH			
			0	1	2	3
Mesophilic aerobic bacteria / g	Maximum 100 cfu / g	Ambient	Absence	Absence	Absence	Absence
		30 °C		Absence	Absence	<10 cfu/g
		40 °C		Absence	<10 cfu/g	<10 cfu/g
Fungi, molds and yeasts / g	Maximum 100 cfu / g	Ambient	Absence	Absence	Absence	Absence
		30 °C		Absence	Absence	<10 cfu/g
		40 °C		Absence	Absence	<10 cfu/g
Escherichia coli / g	Maximum 100 cfu / g	Ambient	Absence	Absence	Absence	Absence
		30 °C		Absence	Absence	Absence
		40 °C		Absence	Absence	Absence
Staphylococcus aureus / g	Maximum 100 cfu / g	Ambient	Absence	Absence	Absence	Absence
		30 °C		Absence	Absence	Absence
		40 °C		Absence	Absence	Absence
Pseudomona aeruginosa / g	Maximum 100 cfu / g	Ambient	Absence	Absence	Absence	Absence
		30 °C		Absence	Absence	Absence
		40 °C		Absence	Absence	Absence

DETERMINATION OF THE SHELF LIFE OF THE REPELLENT LOTION BY THE METHOD OF ARRHENIUS

In this investigation, the prediction of the life of the repellent lotion could not be determined since the Arrhenius method is a very rigorous method in which work with data that must meet certain specifications, such as in the case of the value for T90 % (time required for the degradation of the active ingredient 10 %). However, in contrast to this could be deduced a very interesting point, since the time of the compatibility study of the essential oil-carriers by the experimental design of Plackett and Burman, the mixtures were placed in glass vials for carrying out the analysis and after the time expires (2 months) it was observed that

the concentration of essential oil is kept up to a maximum of 94 % and a minimum of 91 %, which confirms that the only factor responsible for the existence of a variation significant concentration of essential oil is the type of packaging used to store the repellent lotion.

DETERMINATION OF THE REPELLENT ACTIVITY

After statistical analysis it was found that the degree of repellency of the lotion is placed in Class IV (60-80 % repellency Table 8), this indicates that the properties of the lotion made in this investigation are ideal to meet their function, which is to repel mosquitoes or mosquitoes, vectors responsible for transmission of infectious diseases like

dengue and malaria.

Table 8. Results bioassay repellent activity.

% REPELLENCE						
	Hour 1	Hour 2	Hour 3	Hour 4	Half Repellency	Class Repellency
Month 0	74,3623	71,2867	63,489	68,4915	69,407375	IV
Month 1	71,2867	74,3623	68,4915	68,4915	70,658	IV
Month 2	77,835	71,2867	61,2053	65,9073	69,058575	IV
Month 3	74,3623	74,3623	63,489	63,489	68,92565	IV

Besides checking the degree of repellency, it could also determine the approximate period of duration repellent lotion, then comparing the data of this investigation with those obtained by Faccioli V. et al. 2010, it is easy to deduce that the lotion developed from the essential oil of palo santo provides a 3 % to 4 hours protection against mosquitoes, in contrast to synthetic commercial repellents based on DEET in high concentrations where used as it is the case of OFF repellent containing 23 % of this compound and which provides a protection period of 5 hours.

TOXICOLOGICAL EFFECT BY DERMALLY REPELLENT LOTION

Change in Weight

In the different weight register made on days 1, 7, 14, there was no decrease in the average weight of heavy animals and comparing the initial with the final notice that there was weight gain.

Table 9. Change in weight (g) of animals (females) who underwent the study of acute dermal toxicity

GROUP	1	7	14
A Control (saline 0,9% NaCl)	204,2±5,2a*	202,5±9,1a	213,1±11,7a
B (palo santo lotion)	205,6±4,6a	214,3±10,4a	224,9±6,7a

Source: Toxicological Test Report. Acute toxicity study via dermal lotion repellent product from the essential oil of *Bursera graveolens* species (palo santo)

* Column with the same letter showed no significant difference with a probability of $p < 0.5$ mortality

Mortality

Records of the possible daily mortality in the group tested, a dose of 2000 mg / kg, showed no presence of dead animals (0% mortality).

Toxicological signs

On observations made during the study period showed signs such as mild erythema in group B (palo santo lotion), from the second hour post dosing remained the same until the third day from the fourth day severity gradually decreased until the seventh day, until complete disappearance of erythema on day 8, between the first and fourth hour showed mild grooming between the first and second hour circling for both the treatment group of females to

the group of males. The control groups showed no sign.

Macroscopic pathology

At the end of the trial, this is 14 days after dosing, all animals sacrificed, we performed the gross necropsy, we proceeded to see if there were alterations in organs and tissues. A dose of 2000 mg / kg, no changes were observed in any organ observed.

Table 10. Macroscopic observations

Males and Females	A	B
Respiratory	0	0
Digestive	0	0
Nervous System	0	0

Source: Toxicological Test Report. Acute toxicity study via dermal lotion repellent product from the essential oil of *Bursera graveolens* species (palo santo)

(0) No Abnormality
(P) Presence of Abnormality

Thus the results of the dose of 400 Acute Dermal mg / 200 Kg body weight in rats under the conditions set by the OECD 402 show that it is a product that was a mild disease in experimental animals, is a mild condition since that despite this is observed in animals, after a few days disappears without generating any other significant effect in experimental animals.

CONCLUSIONS

The formulation is physically and chemically stable in that it does not include BHT as an antioxidant, otherwise the power of the essential oil is diminished.

After the tests applied, the repellent lotion made proves to be stable on the physical, and microbiological, chemical level while the influential factor for a decrease in the concentration of essential oil is the type container.

The degree of repellency, as well as the duration repellent lotion that provides made in this investigation is among the satisfactory range, showing that the lotion from the essential oil of palo santo (*Bursera graveolens*) is an innovative front to traditional synthetic repellents.

The acute dermal toxicity evaluated in the repellent lotion is mild and disappears within a few days, but may be required to improve the composition formula to prevent changes in pH as it is most likely the factor responsible for these types of conditions.

Essential oils are easily removable, environment friendly being biodegradable unlike synthetic pesticides, are complex mixtures of compounds that act synergistically as a strategic defense, making it difficult to develop resistance to pests, So all the beneficial properties of essential oils make the proposal made in this investigation is a great contribution to the knowledge of new applications of biodiversity to the pharmaceutical industry.

ACKNOWLEDGEMENT

The Institute of Applied Chemistry, Technical University of Loja for opening

their doors and give us most of tools to carry out this investigation. A whole team of DC.

REFERENCES

1. **Botero D., Restrepo M.** (2005) Parasitosis Humanas. 4ta Edición. Editorial CIB. Bogotá, Colombia.
2. **Badii M., Garza V., Landeros J., Quiroz H.** "Diversidad y Relevancia de los Mosquitos". UANL-UACJ-UAAAN. México.
3. CedimCat Centre d'Informació de Medicaments de Catalunya. Disponible en: <http://www.cedimcat.info/html/es/dir2471/doc26947.html#Bloc1>
4. **Rosa J. R., Gene C. M., Rea M. J. F., Borda C. E.** "Control Biológico de Mosquitos". Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales. Facultad de Medicina, UNNE. Santa Fé, Argentina.
5. **Pérez R., Rodríguez C., Lara J., Montes R., Ramírez G., Martínez L.** "Parasitismo de Romanomermis iyengari en larvas de 3 Especies de Mosquitos en Laboratorio y de Anopheles pseudopunctipennis en Campo." Instituto Politécnico Nacional-COFAA. Oaxaca, México.
6. **Gutiérrez D.** (2010). DEET Finalmente Expuesto como neurotóxicos. NaturalNews publicado en la revista BioMed Central Biology
7. **Lallanilla M.** Society of Environmental Journalists
8. **Ware G., Whitacre D.** (2004) "Introducción a los Insecticidas". The Pesticide Book, 6ta edición. MeisterPro Information Resources. Willoughby, Ohio.
9. **Gleiser R., Bonino M., Zygodlo J.** Estudio, publicado en la revista Parasitology Research, realizado en la Universidad Nacional de Córdoba.
10. **Gros E. G., Seldes A. M., Burton G.** (1985) "Introducción al estudio de los Productos Naturales". Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, DC.
11. **Ferreira Maia M., Moore S.** (2011) "Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing". Maia and Moore Malaria Journal.
12. **Lascano V., Mazzieri M.** (2009). REPELENTES DE MOSQUITOS. Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
13. **Ríos M., De La Cruz R., Mora A.** (2008) "Conocimiento Tradicional y Plantas Útiles del Ecuador: Saberes y Prácticas" Editorial Abya-Ayala. Quito, Ecuador.
14. **Manzano P., Morgner I., Morgner J., Orellana A.** "Bursera graveolens (Palo Santo) Como Alternativa de Agricultura Sustentable en la Península de Santa Elena-Provincia del Guayas". Instituto de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
15. **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.
16. **Amela J., Valero E.** (2001). Estudios de Preformulación, Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Glatt Laborotecnic, pp 95-159, España.
17. **Talukder F., Howse P.** (1994). Laboratory evaluation of toxic and repellent properties of the pithraj tree, *Aphanamixis polystachya* Wall & Parker, against *Sitophilus oryzae* (L.). International Journal of Pest Management, 40(3): 274-279.
18. **Faccioli V; Panozzo I; Cáceres M** (2010). "Los Mosquitos (Orden Diptera Familia *Culicidae*)". Cartilla de difusión No. 18. Área Zoología de Invertebrados Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"
19. **Venereo J.** (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Rev Cubana Med Milit;31(2):126-33
20. **Ponce D., Acero C., Cárdenas L.** (1981). Influencia de la formulación en el comportamiento del sistema emulsionado: petrolato, alcohol cetílico, lauril éter, sulfato de sodio y agua. Trabajo de tesis. Disponible en: <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/datafile/farmacia/revista/V4N1P58-91.pdf>.
21. Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-NF. Vol 1. Compendios de Normas Oficiales.

I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES

I. FIN, PROPÓSITO, Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin del Proyecto

Proporcionar una opción alternativa natural para repeler mosquitos, una loción repelente a partir del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) que sea segura y eficaz, sin efecto tóxico tanto para la salud de los consumidores, como para el medio ambiente, y de ésta manera aportar al desarrollo de la industria farmacéutica dentro del área de Productos Naturales en el Departamento de Química.

1.2 Propósito del Proyecto

Desarrollar una loción que cumpla con la función de repeler mosquitos, y cuya fórmula de composición presente estabilidad tanto física, química como microbiológica.

1.3 Componentes del Proyecto

- ✚ Valorar e identificar cualitativa y cuantitativamente la composición química del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)
- ✚ Obtener la combinación adecuada de excipientes a incluirse en la formulación mediante estudios experimentales de preformulación y formulación de la loción repelente.
- ✚ Evaluar la estabilidad de la loción repelente mediante pruebas físicas, químicas y microbiológicas.
- ✚ Evaluar el efecto repelente de la loción a base del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*).

- ✚ Evaluar la toxicidad aguda dérmica de la loción repelente a base del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*).

- ✚ Determinar la vida útil de la loción repelente mediante estudios de estabilidad química del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*).

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos o zancudos, constituyen el grupo de artrópodos más importante en relación con medicina. Es un grupo muy numeroso con más de 3.000 especies. Los 3 géneros más importantes son: *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* ⁽¹⁾.

Para la obtención de sangre, las hembras son atraídas por ciertas características de la piel del hombre como son el calor, humedad y sudor. Los mosquitos que tienen hábitos domésticos son más aptos para la transmisión de enfermedades, tales como: malaria, filariasis por *Brugia* y *Wuchereria*, fiebre amarilla urbana, dengue, encefalitis equina y encefalitis virales. El control de los mosquitos se hace mediante acciones de salud pública y acciones individuales a través del uso de repelentes ^(1,2).

Los repelentes son sustancias químicas que interfieren con los receptores químicos de los insectos e impiden que éstos se fijen en la piel para realizar la picadura, razón por la cual evitan acercarse a las áreas del cuerpo cubiertas por repelente ^(3, 4, 5).

Los repelentes más comunes generalmente son aquellos que contienen DEET (N, N-dietil-3-metil-benzamida ó N, N-dimetil-m-toluamida), y son usados en el mundo entero contra mosquitos y moscas picadoras. Sin embargo, estudios realizados demuestran que el DEET puede tener un efecto tóxico sobre el sistema nervioso no solamente de los insectos sino también de los mamíferos al inhibir la actividad de una enzima clave del sistema nervioso central, la acetilcolinesterasa. Esto significa que los

¹ Botero D., Restrepo M. (2005). *Parasitosis Humanas*. 4ta Edición. Editorial CIB. Bogotá, Colombia.

² Badii M., Garza V., Landeros J., Quiroz H. (2007). "Diversidad y Relevancia de los Mosquitos". UANL-UACJ-UAAN. México.

³ CedimCat Centre d'Informació de Medicaments de Catalunya. Disponible en: <http://www.cedimcat.info/html/es/dir2471/doc26947.htm#Bloc1>

⁴ Rosa J. R., Gene C., Rea M., Borda C. (2005). "Control Biológico de Mosquitos". Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales. Facultad de Medicina, UNNE. Santa Fé, Argentina.

⁵ Pérez R., Rodríguez C., Lara J., Montes R., Ramírez G., Martínez L. (2004). "Parasitismo de *Romanomeris iyengari* en larvas de 3 Especies de Mosquitos en Laboratorio y de *Anopheles pseudopunctipennis* en Campo." Instituto Politécnico Nacional-COFAA. Oaxaca, México.

repelentes que contienen DEET son en realidad muy tóxicos y podrían dañar el sistema nervioso de los seres humanos ^(6, 7, 8).

La necesidad de encontrar alternativas naturales para el control de picaduras de mosquitos que reemplacen a los productos sintéticos, potencialmente tóxicos tanto para el hombre como para el medio ambiente, impulsa al desarrollo de un biorepelente que cumpla con las mismas características de los sintéticos. Muchas plantas producen sustancias o metabolitos para protegerse de los insectos y otros herbívoros, entre ellas los aceites esenciales que son los que les dan el aroma característico a algunas flores, frutos y hojas. Esos metabolitos son una opción interesante como fuente de productos repelentes e insecticidas contra mosquitos y otros insectos de interés sanitario ^(9, 10).

Los estudios de campo han demostrado que la protección repelente provista por algunos aceites esenciales es similar a la protección que proporciona el DEET ⁽¹¹⁾.

No todas las especies de mosquitos son susceptibles a un sólo compuesto químico. Lo que resulta interesante con los repelentes de origen natural es que el espectro contra estos mosquitos aumenta enormemente ya que, los aceites esenciales son mezclas de muchas sustancias químicas. El Ecuador, por ser un país multicultural y poseer una elevada biodiversidad, se convierte en un paraíso para los intereses de la industria farmacéutica, puesto que su mayor riqueza está reflejada en el saber ancestral, relacionado al mundo vegetal ^(12, 13).

⁶ Gutiérrez D. (2010) DEET Finalmente Expuesto como neurotóxicos. *NaturalNews* publicado en la revista *BioMed Central Biology*.

⁷ Lallanilla M. *Society of Environmental Journalists*

⁸ Ware G., Whitacre D. (2004). "Introducción a los Insecticidas". *The Pesticide Book*, 6ta edición. MeisterPro Information Resources. Willoughby, Ohio].

⁹ Gleiser R., Bonino M., Zygadlo J. (2003). Estudio, publicado en la revista *Parasitology Research*, realizado en la Universidad Nacional de Córdoba.

¹⁰ Gros E. G., Seldes A., Burton G. (1985). "Introducción al estudio de los Productos Naturales". *Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*. Washington, DC.

¹¹ Ferreira Maia M., Moore S. (2011). "Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing". *Maia and Moore Malaria Journal*

¹² Lascano V., Mazzieri M. (2009). *REPELENTE DE MOSQUITOS*. Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

¹³ Ríos M., De La Cruz R., Mora A. (2008). "Conocimiento Tradicional y Plantas Útiles del Ecuador: Saberes y Prácticas" Editorial Abya-Ayala. Quito, Ecuador.

La especie *Bursera graveolens*, comúnmente llamada palo santo, es una planta nativa de las costas ecuatorianas y peruanas. Entre las sustancias que lo componen se encuentran: α -phellandrene, D-germacrene, pinene, p-cymene, limoneno, etc., responsables del aroma, la característica picante, dulce y el olor balsámico. Aunque los estudios realizados del aceite de palo santo en su mayoría son de su madera, existen estudios que demuestran que no hay diferencia significativa entre el aceite esencial de frutos y de la madera, por lo tanto se recomienda usar aceite esencial de frutos de palo santo (*Bursera graveolens*) evitando el talado de árboles ^(14, 15).

Entre las propiedades fundamentales de aceites esenciales se incluyen la acción antiinflamatoria, antirreumática, antibacteriana y antineoplásica. En nuestro medio es conocido el uso popular de esta planta: la madera seca como sahumerio y especialmente para espantar los mosquitos ⁽¹⁴⁾.

En tal virtud se estima que el biorepelente, constituye en nuestro medio, una alternativa de solución factible frente a un problema de salud pública como es la infección de enfermedades a causa de los mosquitos.

¹⁴ Manzano P., Morgner I., Morgner J., Orellana A. (2009). "*Bursera graveolens* (Palo Santo) Como Alternativa de Agricultura Sustentable en la Península de Santa Elena-Provincia del Guayas". Instituto de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica del Litoral.

¹⁵ 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.

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1 Aplicaciones y usos de aceites esenciales

Para poder subsistir, el hombre siempre ha dependido de las plantas, a lo largo de la historia, la utilización de éstas con fines medicinales ha desempeñado un destacado papel y han sido de inestimable valor para la propia medicina. El hombre primitivo, trató de aliviar sus enfermedades mediante aquellos elementos que más cerca tenía de sí mismo: las plantas ^(16,17).

En la actualidad se definen como “aceites esenciales” las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides ⁽¹⁸⁾.

2.2.2 Repelentes naturales

Los repelentes naturales hacen referencia a aquellas sustancias con capacidad de repeler insectos diferentes a los sintéticos tradicionales tal como el DEET (N, N-dietil-3-metil-benzamida ó N, N-dimetil-m-toluamida).

Estas sustancias son generalmente productos naturales, como aceites esenciales y extractos vegetales que hoy en día constituyen una

¹⁶Bannerman. R.H. (1982). *Mesas Redondas. “La medicina tradicional en la moderna atención de salud”*. *Forum Mundial de la Salud*. 3(1): 8-28.

¹⁷Guardarrama.Suarez.I. (1999). *Introducción a la Fitoterapia y a la Medicina Tradicional*: 17-28.

¹⁸Palá J. (2002). *“Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “eryngium” I, en la península ibérica”*. *Universidad Complutense de Madrid*.

herramienta alternativa para: el manejo integrado de plagas ⁽¹⁹⁾ y el control de los mosquitos por parte de los habitantes para la prevención de enfermedades tales como la malaria y el dengue.

2.2.2.1 Efecto repelente de los aceites esenciales

Un repelente es una sustancia química o mezcla de ellas, que actuando en fase gaseosa causa en el insecto movimientos de orientación que lo alejan de su fuente de alimento ⁽²⁰⁾.

Existen estudios realizados en los que se ha evaluado el efecto repelente de aceites esenciales de ciertas especies tales como *lemongrass* perteneciente a la familia de las *Gramíneas* o *Poáceas* y obtuvieron valores de repelencia entre 72 y 90%, este efecto repelente se atribuye a los aceites esenciales que contienen ⁽¹⁹⁾.

2.2.2.2 Concentración de los aceites esenciales con efecto repelente

Para la utilización de los de productos naturales, como aceites esenciales y extractos vegetales como una alternativa frente al ataque de plagas, existen estudios donde se ha evaluado la actividad repelente de los aceites esenciales preparados y formulados en solución acuosa empleando como emulsionantes propilenglicol al 5% y lecitina de soja al 0,5%. Las concentraciones aplicadas fueron 0,5; 1; 2; 3 y 4% ^(19, 20).

Concentraciones bajas muestran efectividad de repelencia, sin embargo cuando se utilizan mayores concentraciones de aceite esencial no existe diferencia significativa puesto que a esto se suma una interacción entre los excipientes que conforman la formulación (como el propilenglicol, lecitina de soja, etc.) y los aceites esenciales.

¹⁹Ricci M., Padín S., Ringuet J., Kahan A. (2006). "Utilización de aceite esencial de lemongrass (*cymbopogon citratus stapf*) como repelente de *diuraphis noxia kurdj.* (hemiptera: aphididae) en trigo". Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Buenos Aires, Argentina.

²⁰ Alzogaray et al. (2000) Alzogaray R., Fontan A., Zerba E. (2000). Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans.* Med. Vet. Entomol. (Oxford) 14:6-10.

2.2.2.3 Componentes responsables del efecto repelente de los aceites esenciales

Dado que los aceites esenciales son una mezcla compleja de varios componentes no se puede afirmar a ciencia cierta cuál de ellos es el responsable del efecto repelente. Sin embargo existen estudios en los cuales se ha evaluado las propiedades repelentes de diversas plantas cuyos aceites esenciales se componen de: α -pineno, mirceno, β -pineno, 1, 8 Cineol, linalol, β -cariofileno, α -Thujene, α -Pinene, α -Phellandrene, limonene, sabinene, p-Cymene, menthorfurano, D-germacrene ⁽²¹⁾.

Entre las plantas que poseen estos componentes y que se les atribuye el efecto repelente son: palo santo (*Bursera graveolens*), eucalipto (*Lemon Eucalyptus*), citronela (*Cymbopogon nardus*), cedrón (*Lippia citriodora*), verbena, geranio (*Pelargonium zonale*), pino (*Pinus sylvestris L.*), cajeput (*Melaleuca leucadendron*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum L.*), tomillo (*Thymus vulgaris*), pimienta (*Piper nigrum*), menta (*mentha piperita*). ⁽²²⁾.

2.2.3 Información del material vegetal

Taxonomía

Reino: Vegetal
División: Magnoliophyta (plantas con flores)
Clase: Dicotiledonea
Orden: Sapindales
Familia: Burseraceae
Género: Bursera
Especie: Graveolens
Nombre Científico: Bursera graveolens
Nombre Vulgar: Palo santo ⁽²³⁾.

²¹Lascano V., Mazzieri M. (2009). "REPELENTES DE MOSQUITOS. Parte 2. Información complementaria al Boletín "Repelentes para prevenir el Dengue". Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

²²Ricci M., Padín., Kahan A., Hennig C., (2005). "Evaluación del efecto repelente del aceite esencial de *Laurus nobilis*L. (Lauraceae) sobre *Myzus persicae*Sulz. (Homoptera:Aphididae) en cultivos de pimiento y repollo". Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Argentina.

²³Manzano P. (2009). "Potencial fitofármaco de *Bursera graveolens* sp (palo santo), del bosque seco tropical, península de santa elena, provincia del guayas". Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL); Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral

2.2.3.1 Características botánicas de la familia *Burseraceae*

Las *Burseraceas* son una familia cosmopolita de árboles y arbustos de la selva baja. Las plántulas de *Burseraceas* tienen hojas compuestas, alternas, pinnadas, y con pocas excepciones, un látex oloroso que tiene un carácter distinto. Este látex se encuentra en las ramas, las hojas, en el fuste, y cuando está presente, usualmente es de un color claro y pegajoso que seca en un polvo blanco, o es un látex blanco, con un carácter como leche. Casi siempre, éstas plantas tienen un olor especial, como incienso que es diferente que los olores de otros árboles que tienen un olor dulce como las *Meliaceas* ⁽²⁴⁾.

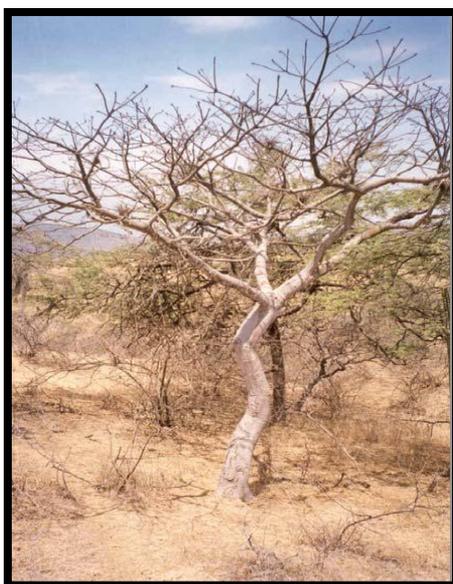


Gráfico 1. Árbol de palo santo (*Bursera graveolens*)

Fuente: Manzano P. (2009). "Potencial fitofármaco de *Bursera graveolens* sp (palo santo), del bosque seco tropical, península de Santa Elena, provincia del Guayas". Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL); Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral

Descripción general de campo: Árboles y arbustos aromáticos, leñosos y secos, con exudación blanca a transparente ^(23, 25).

Hojas: Alternas u opuestas, trifoliadas (3 hojas nacen de un punto) o pinnadas (hojas compuestas) y raramente de una sola hoja (unifoliadas), peciolulos frecuentemente opuestos o subopuestos, con o sin pulvinulos.

²³Manzano P. (2009). "Potencial fitofármaco de *Bursera graveolens* sp (palo santo), del bosque seco tropical, península de Santa Elena, provincia del Guayas". Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL); Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral.

²⁴Freire A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana*, Missouri Botanical Garden, FUNDACYT, QCNE, RLB y FUNBOTANICA. St Louis, Missouri.

²⁵Fine E. Kaplan S., Giblin M, Wachter T., Foster R. (2010). *Guía para BURSERACEAE de Allpahuayo-Mishana*. Reserva Biológica Allpahuayo-Mishana, Iquitos, Loreto, PERU. Apoyo del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP, University of Utah, y Italo Mesones.

Inflorescencia: Terminales o laterales con flores pequeñas.

Frutos: Drupáceos o capsulares con semillas cubiertas con materia carnosa (ariladas)⁽²⁶⁾.

2.2.3.2 Características botánicas de la especie *Bursera graveolens*

Esta especie se caracteriza por tener hojas gruesas, pequeñas, con menos pares de folíolos, y a veces tienen una nervadura conspicua, también es importante decir que las plántulas chicas (< 50 cm en altura) mayormente tienen hojas simples⁽²⁶⁾.

La especie *Bursera graveolens* (palo santo), es una planta nativa que crece en bordes de quebradas frente al mar y en montañas bajas y medias en las costas ecuatorianas (bosque seco de la península de Santa Elena) y peruanas, es un árbol nativo de México, Perú y Venezuela⁽²³⁾.

2.2.4 Composición química del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens*

El palo santo (*Bursera graveolens*) es la única planta conocida que produce el componente químico 2, 3-secolean-12-ene-2, 3, 28 ácido trioico. La composición química de *Bursera graveolens* mediante el análisis incluyen: flavonoides, taninos, triterpenos, sesquiterpenos, resinas, entre los que destacan: α -Pinene, limonene, mentofurano, terpinen-4-Olo, α -Terpineolo, carvone, ácido acético, ácido guayerético. Para la valoración del aceite esencial se realiza un análisis mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS)^(15, 23).

¹⁵ Salas M., Zaragoza 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.

²³ Manzano P. (2009). "Potencial fitofármaco de *Bursera graveolens* sp (palo santo), del bosque seco tropical, península de Santa Elena, provincia del Guayas". Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL); Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral.

²⁶ Chambi B. (2010). "Manual de identificación de especies maderables y no maderables en predios privados". PROYECTO: Manejo forestal mediante reforestación, agroforestería y/o enriquecimiento de bosques con especies nativas en los distritos de Laberinto y de Inambari, provincia de Tambopata, Perú.

2.2.4.1 Usos de la especie *Bursera graveolens*

Es conocido en nuestro medio el uso popular de esta planta: la madera seca como sahumero y para espantar mosquitos. Utilizándose desde épocas remotas como sudorífico, para aliviar dolores estomacales y como linimento para reumatismos ⁽¹⁴⁾.

Se han hallado trabajos que describen las propiedades, fundamentalmente de los triterpenos, lupeol, epi-lupeol y aceites esenciales presentes en los extractos metabólicos de esta especie. Estos incluyen la acción antiinflamatoria, antirreumática, antibacteriana y antineoplásica ^(14, 27).

2.2.5 Fitofármacos

La medicina natural y tradicional (MNT) incluye un conjunto de métodos y técnicas terapéuticas que permiten establecer la armonía entre el individuo y el universo, a través de modalidades de la medicina herbaria y otras ⁽²⁸⁾.

La Fitofarmacología es la rama de la Farmacología que se orienta al estudio de los extractos estandarizados de plantas medicinales.

La base de los fitofármacos son los vegetales. El término fitofármaco no debe confundirse con el de planta medicinal. Al respecto, la OMS ha precisado su significado en los términos siguientes: “Son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entienden: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante” ⁽²⁹⁾.

¹⁴Manzano P., Morgner I., Morgner J., Orellana A. (2009). “*Bursera graveolens* (Palo Santo) Como Alternativa de Agricultura Sustentable en la Península de Santa Elena-Provincia del Guayas”. Instituto de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica del Litoral.

²⁷Nakanishi T., Inatomi Y., Murata H. (2005). “A New and Known Cytotoxic Aryltetralin-Type Lignans from Stems of *Bursera graveolens*”. *Chemical & pharmaceutical bulletin* Vol. 53, no. 2 229

²⁸Vinent M., Torres M., Olivares M. (2002). “Uso de fitofármacos en la sala de medicina del hospital EMILIO BÁRCENAS PIER durante el primer trimestre del 2001”. *Hospital “Emilio Bárcenas Pier”*. MEDISAN. 6(3):25-28.

²⁹Morales M., Morales J. (2009). “Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos hacia una fitomedicina (fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica”. Del Libro: *Plantas medicinales y Medicina natural* (2da Edición). Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Sociedad Chilena de Fitoterapia.

2.2.6 Formas farmacéuticas líquidas de aplicación tópica

Existe una serie de factores que tanto el dermatólogo como el farmacéutico preparador deben considerar en el momento de recetar o diseñar un medicamento de aplicación y acción tópica:

- ~ Elección del principio activo adecuado.
- ~ Elección de la forma farmacéutica y excipientes idóneos.
- ~ Consideración de los efectos dermatológicos y cosméticos del vehículo.

Tan sólo conjuntando adecuadamente las premisas anteriores, y en el supuesto de que el medicamento esté correctamente aplicado podrá obtenerse el éxito terapéutico del mismo ⁽³⁰⁾.

Existe una gran cantidad de productos de aplicación sobre la piel que corresponden a 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 ⁽³⁰⁾.

2.2.6.1 Lociones: tipos

Pueden tratarse de disoluciones de una o más sustancias en el seno de un disolvente o un sistema de solventes. Pueden ser a la vez unas dispersiones líquidas con sólidos finamente divididos y mantenidos en suspensión con la ayuda de tensoactivos y espesantes: *lociones suspensión*; este tipo de productos tienen tendencia a depositar las sustancias insolubles incluidas, por lo que se recomendará la agitación previa a su uso. En ocasiones son *emulsiones* del tipo *OW* ⁽³⁰⁾.

³⁰Faulí C. (1993). Faulí C. (1993). *Tratado de Farmacia Galénica. Primera Edición. Ediciones Luzán 5. S.A. Madrid, España.*

- **Lociones suspensión**

Son preparados líquidos o semifluidos que deben agitarse antes de su aplicación, a fin de asegurar la resuspensión lo más homogénea posible de los principios activos pulverulentos que se encuentran dispersados en el excipiente, mayoritariamente acuoso, en proporciones que oscilan entre el 10-30 % ⁽³⁰⁾.

2.2.6.2 Excipientes

Son sustancias que constituyen elementos habituales e imprescindibles en las formulaciones galénicas de los medicamentos y a pesar que no tiene acción farmacológica y son inertes, sirven para dar la forma farmacéutica ⁽³⁰⁾.

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

- ~ **Cosolventes:** Se utiliza con el fin de aumentar la solubilidad y por tanto la compatibilidad entre el aceite esencial y los excipientes de la fórmula. Ejemplo: Propilenglicol ⁽³⁰⁾.
- ~ **Tensoactivos:** A fin de garantizar un reparto homogéneo del principio activo en la totalidad del volumen del preparado, debido a que se trabaja con un principio activo que es notablemente hidrófobo y se debe recurrir a una solubilización micelar. Para lociones tópicas es común la utilización de tensoactivos no iónicos como aniónicos, dando buenos resultados en ambos casos ^(30, 31).

El tensoactivo a incluir en la formulación es el lauril sulfato de sodio, de tipo aniónico, que actuará como humectante.

- ~ **Conservantes:** Los conservantes a incluir en este tipo de forma farmacéutica son los parabenos: metilparabeno y propilparabeno. Dado que las lociones se presentan en envases multidosis, se aumenta la posibilidad de contaminaciones fúngicas y/o bacterianas aportadas por

³⁰Faulí C. (1993). Faulí C. (1993). *Tratado de Farmacia Galénica. Primera Edición. Ediciones Luzán 5. S.A. Madrid, España.*

³¹Rowe R., Sheskey P., Owen S. (2006). "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 5th Edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. Great Britain.

el propio usuario, razón por la cual deben incluirse en este tipo de formas farmacéuticas ^(30, 31).

- ~ **Reguladores de pH:** ácido cítrico, citrato de sodio, fosfatos. Para mantener el pH ligeramente ácido propio de la piel ⁽³²⁾.

2.2.7 Método de manufactura de la loción

Para la preparación de la loción se debe calentar por separado, la fase acuosa y la fase oleosa a 70 °C, y luego se agrega la fase interna (oleosa) sobre la fase externa (acuosa) bajo agitación. Finalmente, cuando se haya alcanzado los 60 °C se agrega el principio activo, en este caso el aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*). Se mantiene la agitación hasta que se consiga la viscosidad esperada de la emulsión o hasta que alcance una temperatura de 40 °C ^(30, 33).

2.2.8 Especificaciones para emulsiones

Una vez elaborada la loción, se procede a realizar algunos controles descritos en la literatura especializada y adecuados para este tipo de forma farmacéutica, con el fin de asegurar la integridad de la fórmula, debe además observar la preparación final para determinar que su apariencia es la esperada y de no serlo se debe adoptar las medidas necesarias para corregirlas oportunamente, entre estos controles se encuentran: ^(33, 34)

2.2.8.1 Características organolépticas

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

³⁰Faulí C. (1993). Faulí C. (1993). *Tratado de Farmacia Galénica. Primera Edición. Ediciones Luzán 5. S.A. Madrid, España.*

³¹Rowe R., Sheskey P., Owen S. (2006). "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 5th Edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. Great Britain.

³²Irache J. (2007). "Formas farmacéuticas destinadas a la vía percutánea. Farmacia y Tecnología Farmacéutica". Universidad de Navarra.

³³Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-NF. Vol 1. Compendios de Normas Oficiales.

³⁴Signorelli I., Isla M. (2005). *Elaboración de una crema para uso tópico a base de Urtica dioica L. Revista de la facultad de farmacia.*

tópica. Una vez elaboradas las muestras se deben observar a diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 2 y 3 meses) con la finalidad de examinar: homogeneidad, textura, consistencia, color y olor ^(33, 34).

2.2.8.2 Estabilidad térmica

Consiste en determinar la estabilidad física de las preparaciones a diferentes temperaturas, en nuestra investigación (ambiente, 30 °C y 40 °C) condiciones dadas por el INH, mediante determinación de pH y densidad ⁽³⁵⁾.

~ Determinación del pH

Se emplea un medidor de pH digital. Las emulsiones aplicadas a la epidermis deben mantener un pH ligeramente ácido comprendido entre 4 - 6. Mantener este pH es complicado, debido a que algunos emulgentes sólo actúan como tales cuando el pH de la solución tiene un determinado intervalo ⁽³⁵⁾.

~ Determinación de la densidad relativa

La densidad relativa de una sustancia, también llamada gravedad específica, es la relación entre su densidad y la densidad del agua a una determinada temperatura ⁽³⁵⁾.

2.2.9 Control microbiológico

Las estrategias sugeridas para pruebas de límites microbianos para medicamentos de venta libre y productos farmacéuticos comunes, basados en la actividad del agua para emulsiones de aplicación tópica son: RTMA (Recuento Total de Microorganismos Aerobios), RTCLH (Recuento Total

³³Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-NF. Vol 1. Compendios de Normas Oficiales.

³⁴Signorelli I., Isla M. (2005). Elaboración de una crema para uso tópico a base de Urtica dioica L. Revista de la facultad de farmacia.

³⁵Devia P.J. (2007). Desarrollo De Nuevos Productos (DNP). Edición Dirección de Investigación y Docencia Universidad EAFIT Medellín, Colombia.

Combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras), ausencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa* ⁽³³⁾.

2.2.10 Predicción de la vida útil de la loción repelente: Estudio de estabilidad acelerada por el método de Arrhenius

Para el método de Arrhenius, se evalúa la concentración del principio activo mediante GC-MS cada cierto intervalo de tiempo (0, 1, 2 y 3 meses) y a diferentes temperaturas como: temperatura ambiente, 30 °C ± 2 °C y 45 °C ± 2 °C y una humedad relativa del 75 %. Se determina el orden de reacción; se trazan las gráficas con sus respectivas pendientes en función del tiempo y de las temperaturas de estudio. Finalmente la vida útil se expresa en función del tiempo en el que el principio activo llega a degradarse a la temperatura de 30 °C, Zona climática IVb, que corresponde a la ubicación del Ecuador, como se muestra en la Tabla 1 ⁽³⁶⁾.

Tabla 1. Zonas climáticas en el mundo.

ZONAS CLIMATICAS EN EL MUNDO		
Zona Climática	Temperatura (T°C)	Humedad Relativa (%HR)
I. Templada		
(Japón, Norte Europa, Canadá)	21	45
II. Mediterránea, Subtropical		
(Sur Europa, US)	25	60
III. Caliente, Seca		
(Irán, Irak)	30	35
IV. Caliente, Húmeda		
(Brasil, Indonesia, Ecuador)		
WHO: IVa	30	70
WHO: IVb	30	75

Fuente: Lic. Daysi de Miranda. Asuntos Regulatorios Sobre Estabilidad de Medicamentos. XXIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. San Salvador, noviembre 2009.

³³Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-NF. Vol 1. Compendios de Normas Oficiales.

³⁶Amela J, Valero E. (2001). Estudios de Preformulación, Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Glatt Labortechnik, pp 95-159, España.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El aceite esencial obtenido de esta manera, se sometió a un control de calidad que comprendió pruebas físicas y químicas tales como: determinación de densidad, solubilidad, contenido volátil, identificación de componentes, los mismos que corresponden a los estudios de preformulación del principio activo que deben realizarse previamente al desarrollo de la forma farmacéutica.

3.2 ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN

3.2.1 Valoración del principio activo (*Bursera graveolens*)

El análisis de componentes del aceite esencial se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Para esto, la preparación de las mezclas se realizó previamente colocando 10 µL de aceite esencial en 990 µL de diclorometano.

3.2.1.1 Condiciones del equipo

Las corridas cromatográficas se realizaron en un equipo Agilent series 6890 N, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, equipado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1 (Ver Anexo 1). Las corridas se realizaron en la columna apolar DB5-MS. De igual forma se inyectó una muestra patrón de parafinas normales comerciales utilizando el mismo método empleado para el análisis del aceite esencial esto con la finalidad de emplear estos resultados para la identificación del aceite.

La caracterización de los componentes del aceite esencial se ejecutó mediante comparación computarizada de sus espectros de masas con los de la base de datos del equipo utilizado y con la ayuda de los índices de Kóvats.

3.2.2 Evaluación de las propiedades físicas del principio activo (*Bursera graveolens*)

I. Determinación de la solubilidad

La determinación de la solubilidad para el aceite esencial se realizó mediante términos descriptivos como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Grado de solubilidad mediante términos descriptivos

Término descriptivo	Partes de disolvente requeridas para 1 parte de soluto
Muy soluble	Manos de 1
Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Moderadamente soluble	De 30 a 100
Poco soluble	De 100 a 1000
Muy poco soluble	De 1000 a 10000
Prácticamente insoluble o insoluble	10000 o más

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009)
USP-NF. Vol 1. Compendios de Normas Oficiales.

La solubilidad se expresó con el término “miscible”, que de acuerdo con la USP utilizada se refiere a una sustancia que produce una mezcla homogénea al mezclarse en cualquier proporción con el disolvente designado ⁽¹⁵⁾.

En la presente investigación los solventes sometidos al ensayo de solubilidad con el aceite esencial fueron: propilenglicol, glicerina y alcohol al 70 %.

II. Determinación de la densidad relativa

La densidad relativa se obtuvo en función de la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Para esto se pesó en la balanza analítica un picnómetro de 1 mL de capacidad, vacío y seco a 25°C y se llenó con la porción de aceite esencial a ensayar. Se pesó cuidadosamente el picnómetro con el aceite y se repitió la operación con el agua destilada a 25°C, después de limpiar el picnómetro ⁽³⁷⁾.

¹⁵ Salas M., Zaragoza 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.

³⁷ Miranda C. (2002). Folleto de prácticas de farmacognosia y productos naturales, La Habana-Cuba.

Expresión de los resultados:

La densidad relativa a 25 °C se calculó por la siguiente fórmula:

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Donde:

m_0 = Masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 = Masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 = Masa en gramos del picnómetro con el aceite esencial.

III. Determinación del contenido volátil

El contenido volátil se determinó por la pérdida de peso que experimenta el producto durante un determinado tiempo (horas) en una estufa a 105 °C ± 2 °C para determinar por diferencia de peso el contenido volátil.

3.2.3 Estudio de compatibilidad excipientes-aceite esencial: diseño factorial Plackett y Burman

El fundamento del diseño factorial Plackett y Burman consiste en que “la estabilidad física y química de mezclas de varios excipientes y el principio activo a estudiar, tras ser almacenado durante un tiempo a unas determinadas condiciones, suministra información acerca de la compatibilidad entre cada uno de los excipientes y el principio activo” ⁽³⁷⁾.

Para este diseño se emplearon once factores o excipientes a dos niveles diferentes señalados por los signos + y - , “+” mayor concentración y “-” menor concentración. Cuatro de éstos factores son variables dummy y no contienen excipientes a ninguno de los dos niveles, y se incluyeron para realizar el tratamiento estadístico, todos estos datos se representan en una matriz de experimentación. El número de mezclas originadas a partir de la matriz de experimentación es de 12. El número de mezclas se detalla en el Anexo 2.

Posteriormente, se procedió a preparar 50 g de las mezclas en un vaso de precipitación, combinando porciones sucesivas de los excipientes con el aceite esencial ⁽³⁶⁾.

Una vez preparadas, se repartieron en viales de 10 mL de capacidad (Ver Anexo 3), dichas muestras se conservaron a condiciones determinadas: temperatura ambiente (17 °C Aprox.), 30 °C y 40 °C, durante 8 semanas, tal como se muestra en la Tabla 3 ⁽³⁶⁾.

Tabla 3. Distribución y acondicionamiento de las mezclas

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

Fuente: Amela J, Valero E. (2001). Estudios de Preformulación, Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Glatt Laborotecnic, pp 95-159, España.

Transcurridas las 8 semanas se analizó mediante GC-MS, empleando la misma técnica con la que se analizó el aceite esencial para el proceso de preformulación, con el fin de determinar el contenido del principio activo y detectar impurezas o productos de degradación en la formulación ⁽³⁶⁾.

Los datos obtenidos se analizaron mediante una tabla que relaciona el efecto para cada factor en función de la potencia o porcentaje de identificación del aceite esencial, se calculó la varianza experimental, desviación estándar experimental y finalmente la significancia estadística con un valor de $p= 0.05$ a $p= 0.005$ ⁽³⁶⁾.

3.3 PLANTEAMIENTO DE LA FÓRMULA

Según los resultados obtenidos del diseño factorial de Plackett y Burman se escogieron los excipientes más adecuados que se incluyeron en la fórmula de la loción repelente de palo santo (*Bursera graveolens*). La misma estará compuesta por los excipientes básicos para la elaboración de una loción O/W descritos en la Tabla 4.

³⁶Amela J, Valero E. (2001). Estudios de Preformulación, Gestión de Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Glatt Laborotecnic, pp 95-159, España.

Tabla 4. Fórmula base para la elaboración de una loción O/W

Fórmula base para una loción	
Función	Excipientes
Aceite esencial	Principio activo
Tensoactivo	Lauryl sulfato de sodio
Emulsificante	Alcohol cetosteárico
Cosolvente/Humectante	Propilenglicol
Antioxidante/humectante	Vitamina E
Emoliente	Aceite de vaselina
Otorgar brillo	Aceite de silicona
Antioxidante/Agente quelante	BHT
Conservante	Metilparabeno
Conservante	Propilparabeno
Solvente	Glicerina
	Agua para aforo

Elaboración: La autora

3.3.1 FORMULACIÓN DE LA LOCIÓN REPELENTE

Se pesó cada uno de los excipientes y considerando el tipo de fase y su solubilidad se realizó la mezcla como se muestra en el siguiente gráfico:

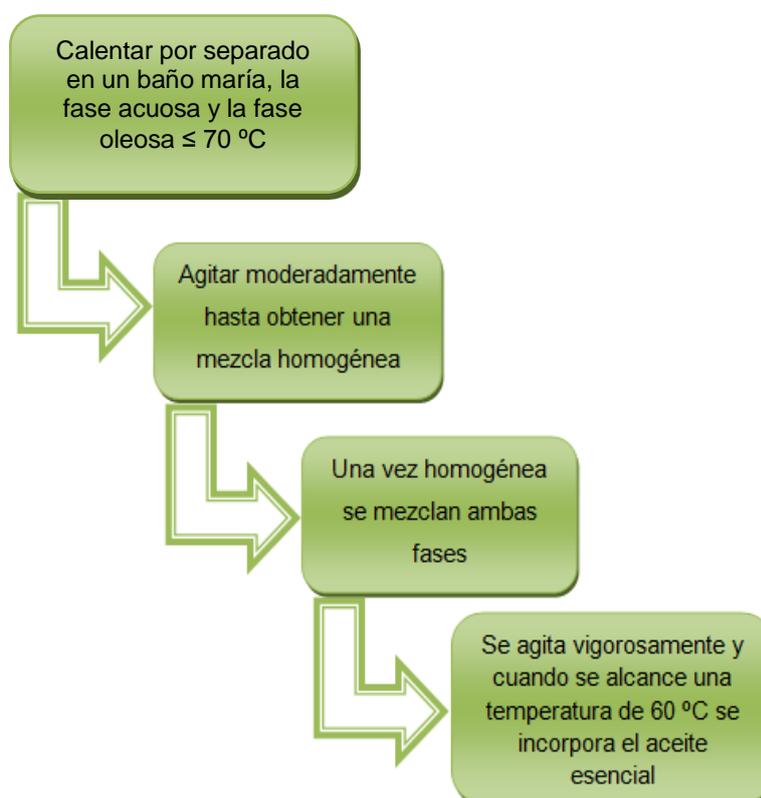


Gráfico 3: Proceso de manufactura de la fórmula de la loción repelente
Fuente: La autora

3.4 ENSAYOS DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Una vez obtenida la loción repelente, se sometió a condiciones de estrés para determinar su estabilidad durante 3 meses siguiendo las condiciones propuestas por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INH) que son: a temperatura ambiente (17 °C Aprox.), 30 °C ± 2 °C y 40 °C ± 2°C con una humedad relativa del 75 % ± 5 %.

Se preparó un sólo lote a escala piloto de 30 unidades, cada una de las muestras fueron seleccionadas al azar en intervalos de 30 días con la finalidad de evaluar el producto mediante ensayos organolépticos, físico-químicos y microbiológicos.

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

Tabla 5. Métodos empleados para el estudio de estabilidad de la loción repelente.

Actividad	Método
Análisis físico-químico	pH, Densidad, GC/MS
Análisis microbiológico	Aerobios mesófilos (USP 32) Escherichia coli (USP 32) Hongos-levaduras (USP 32) Staphylococcus aureus (USP 32) Speudomona aeruginosa (USP 32)
Análisis organoléptico	Aspecto, consistencia, olor y color

Elaboración: La autora

Para el tratamiento de los resultados obtenidos del análisis físico-químico se emplea el programa XLSTAT que es un complemento de solución de estadística y análisis de datos para Microsoft Excel.

3.5 PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LA LOCIÓN REPELENTE/MÉTODO DE ARRHENIUS COMO ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA.

El método de Arrhenius para la determinación de la vida útil de la loción repelente se desarrolló en diferentes etapas.

En primer lugar mediante la técnica adecuada (GC-MS) se evaluó la concentración de principio activo (aceite esencial) cada cierto intervalo de tiempo (0, 1, 2, 3 meses) y a diferentes temperaturas: ambiente (17 °C Aprox., 30 °C ± 2 °C, 40 °C ± 2 °C y una humedad relativa del 75 % ± 5 %. A continuación se determina el orden de reacción; se trazan las gráficas con sus respectivas pendientes en función del tiempo y de las temperaturas de estudio.

La vida útil se expresa como T90 % (tiempo en el que el principio activo llega a degradarse en un 10 %) a la temperatura de 30 °C, ZONA 4, correspondiente a la ubicación del Ecuador.

3. 6 BIOENSAYO DE ACTIVIDAD REPELENTE

La evaluación del efecto repelente o repelencia se llevó a cabo según el método propuesto por Talukder y Howse ⁽³⁸⁾.

Se utilizó papel filtro de 9 cm de diámetro separados en dos mitades iguales. La loción repelente se aplicó en una de ellas; las mitades tratadas se dejaron reposar hasta que la loción secó totalmente. Las tratadas y no tratadas de cada círculo se colocaron en forma contigua dentro de cajas de Petri, y se liberaron en su interior 10 mosquitos generalmente conocidos como zancudos que corresponden a la especie Culicidae y que comúnmente se encuentran en nuestro medio. En esta investigación se emplearon mosquitos recolectados en la Reserva “Laipuna” en el cantón Macará, mediante la colocación de trampas de luz blanca y luz UV, tal como se muestra en el Anexo 4. Se realizaron recuentos de mosquitos presentes en cada mitad del círculo cada hora hasta la cuarta hora posterior al tratamiento ^(38, 39).

Los datos se convirtieron en porcentaje de repelencia (PR) por medio de la siguiente fórmula:

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

³⁸Talukder F., Howse P, (1994). Laboratory evaluation of toxic and repellent properties of the pithraj tree, *Aphanamixis polystachya* Wall & Parker, against *Sitophilus oryzae* (L.). *International Journal of Pest Management*, 40(3): 274-279.

³⁹Faccioli V; Panozzo L; Cáceres M. (2010). “Los Mosquitos (Orden Diptera Familia Culicidae)”. *Cartilla de difusión No. 18. Área Zoología de Invertebrados Museo Provincial de Ciencias Naturales “Florentino Ameghino”*

Donde **Nc** es el porcentaje de mosquitos presentes en la mitad testigo.

Valores positivos (+) indican repelencia y valores negativos (-) indican atracción (29, 32).

Los valores medios se categorizan según la siguiente escala:

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

3.7 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA POR LA VÍA DÉRMICA DE LA LOCIÓN A PARTIR DEL ACEITE ESENCIAL DE PALO SANTO (*Bursera graveolens*)

El producto loción repelente a partir del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) se envió al laboratorio de análisis PROGECA de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, para conocer su toxicidad aguda por la vía dérmica y así conocer si la fórmula desarrollada produce algún efecto nocivo sobre la piel.

El diseño experimental empleado por el laboratorio de análisis PROGECA para la loción repelente a base de aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*), se basó en los procedimientos descritos en el protocolo de la OECD 402.

Para el ensayo, se usaron ratas *Wistar* hembras y machos de 8 a 10 semanas de edad; provenientes de las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

²⁹Morales M., Morales J. (2009). "Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos hacia una fitomedicina (fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica". Del Libro: Plantas medicinales y Medicina natural (2da Edición). Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Sociedad Chilena de Fitoterapia.

³²Irache J. (2007). "Formas farmacéuticas destinadas a la vía percutánea. Farmacia y Tecnología Farmacéutica". Universidad de Navarra.

Se formó 2 grupos de:

A Control (solución ClNa 0.9 %): 3 animales hembras / 3 animales machos

B Tratado (loción palo santo): 6 animales machos

Los grupos conformados recibieron la dosificación durante un periodo de 14 días, de acuerdo al peso corporal de cada animal, para lo cual se realizó el respectivo cálculo.

3.8 ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO

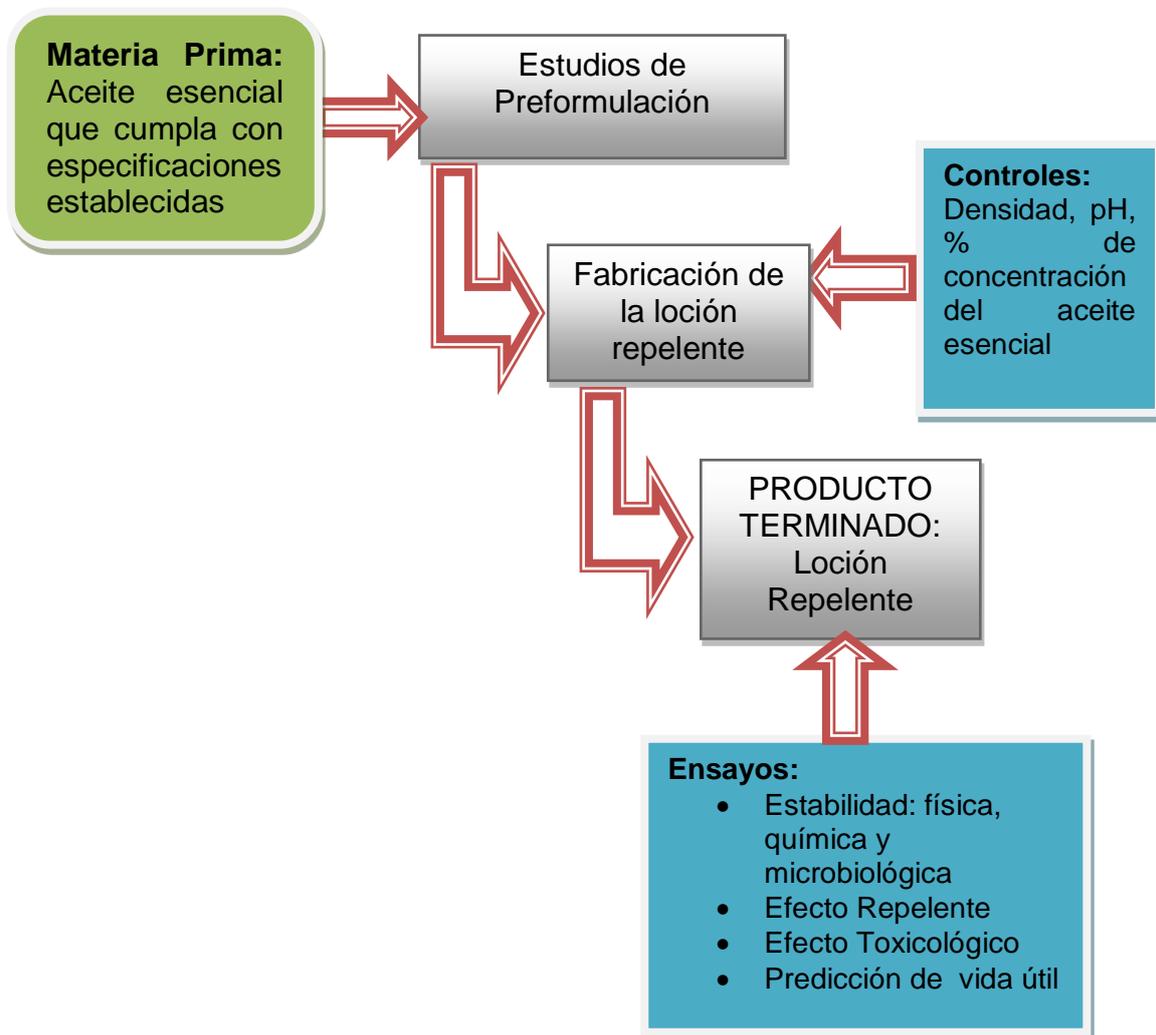


Gráfico 4. Esquema general de los componentes de la investigación.
Elaboración: La autora

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES MEDIANTE GC-MS:

La caracterización del aceite se refleja mediante comparación computarizada de sus espectros de masas (Gráfico 5) y la identificación de sus componentes mediante índices de Kóvats que se detallan en la Tabla 6.

Gráfico 5. Cromatograma del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) por GC-MS

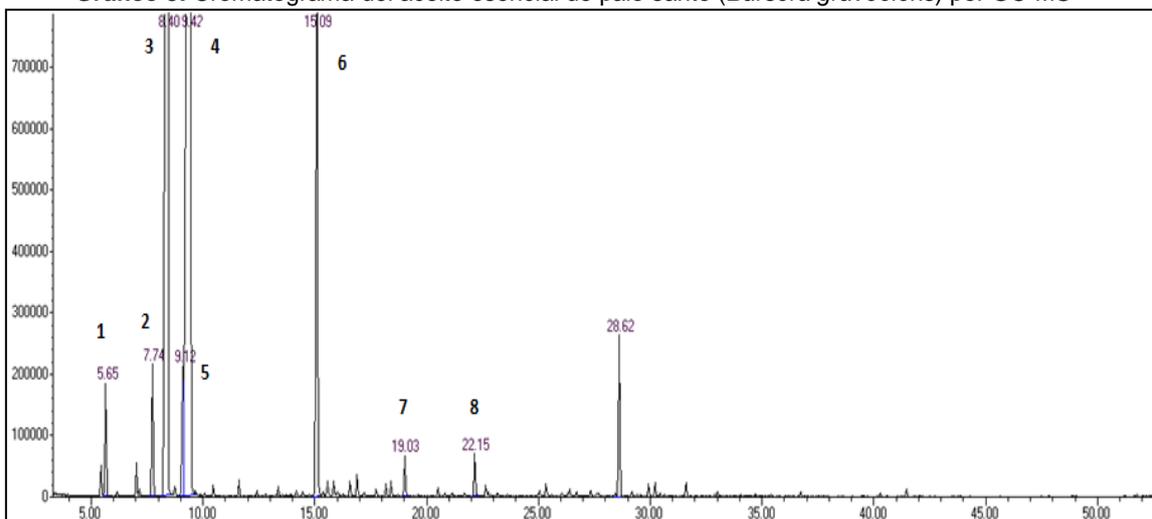


Tabla 6. Compuestos identificados del aceite de palo santo (*Bursera graveolens*) mediante Índice de Kóvats

Picos	Compuestos	Índices de Retención		% Cantidad Relativa
		RI ^a	RI ^b	DB5-MS
1	α -Thujene	866	905	0,26
2	α -pinene	871	907	0,99
3	α -Phellandrene	1006	1002	1,51
4	Limonene	1029	1029	52,82
5	Sabinene	923	966	0,29
6	p-Cymene	1022	1024	35,55
7	Menthofurano	1158	1164	5,32
8	Germacrene- D	1469	1451	1,28
Total				98,02

Elaboración: La autora

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

a= Componentes ordenados según el orden de detección de la columna DB5-MS

b= Porcentaje promedio calculado en base al % área de los picos reportados en la columna DB5-MS

Según estos valores, los elementos principales que componen el aceite esencial de palo santo se encuentran en un porcentaje óptimo a ser utilizado.

4.2 CONTROL DE CALIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE PALO SANTO (*Bursera graveolens*)

Los datos obtenidos a partir de los estudios de preformulación del aceite esencial son los siguientes:

➤ **Densidad:** 0.845 g/mL

➤ **Solubilidad:**

Alcohol 70 %: Poco soluble o insoluble

Propilenglicol: Poco soluble o insoluble

Glicerina: Muy soluble

➤ **Contenido Volátil:** 92 %

Según la investigación realizada por Salas M., y Zaragocín R. (2006) estos valores concuerdan con los estándares establecidos para el aceite esencial de palo santo.

Por lo tanto, la calidad del aceite de palo santo (*Bursera graveolens*) es el apropiado para el desarrollo de la investigación.

4.3 COMPATIBILIDAD EXCIPIENTES-ACEITE ESENCIAL: DISEÑO FACTORIAL PLACKETT Y BURMAN

La composición general de las mezclas es la siguiente:

Principio activo (aceite esencial).....3 %

Factores o excipientes.....97 %

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

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

Factor	Nivel	Componente	Concentración % (p/v)
A	+	Lauril sulfato de sodio	1
	-	Lauril sulfato de sodio	0,8
B	+	Alcohol cetoestearilico	2
	-	Alcohol cetoestearilico	1,5
C	+	Propilenglicol	14
	-	Propilenglicol	10
D	+	Vitamina E	0,06
	-	Vitamina E	0,03
E	+	Vaselina liquida	2
	-	Vaselina liquida	0,5
F	+	Aceite de silicona	1
	-	Aceite de silicona	0,3
G	+	BHT	0,05
	-	BHT	0,03

Elaboración: La autora

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

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

Así por ejemplo, el efecto de A (E_A) se calculó sumando y restando las respuestas obtenidas para las diferentes mezclas. Los signos vienen marcados por la columna "A" de la matriz:

$$E_A = (Respuestas +) / 6 - (Respuestas -) / 6$$

Tabla 8. Matriz "Plackett y Burman", se relaciona la potencia del principio activo para cada mezcla

Número de mezclas	FACTORES (EXCIPIENTES)							VARIABLES DUMMIES				Potencia o % ID P.A
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	78
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	87
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	78
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	78
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	91
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	65
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	69
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	89
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	79
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	92
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	81
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81
Suma (+)	491	485	505	483	479	500	464	494	493	457	471	
Suma (-)	477	483	463	485	489	468	504	474	475	511	497	
Efecto promedio	2,4	0,27	6,93	-0,27	-1,73	5,27	-6,73	3,4	3,07	-8,93	-4,4	
								X ²	11,56	9,406	79,798	19,36

Elaboración: La autora

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

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

$$S^2_{exp} = \frac{66.746}{4}$$

$$S^2_{exp} = 16.687$$

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

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

$$S = 4.0849$$

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

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

Con estos valores se realiza la Tabla 9, misma que permite observar los valores de " t " que más se alejan de 0 representando así a los excipientes que de manera directa o indirecta influyen en la potencia del aceite esencial.

Tabla 9. Matriz "Plackett y Burman" donde se relaciona la potencia del principio activo para cada mezcla

MEZCLA	RESPUESTA	FACTOR	EFECTO	X2	" t "	SIGNIFICANCIA			
						95	97,5	99	99,5
						p= 0,05	p= 0,025	p= 0,01	p= 0,005
						2,132	2,776	3,747	4,604
1	78	1							
2	87	A	2,40		0,240	*	*	*	*
3	78	B	0,27		0,251	*	*	*	*
4	78	C	6,93		0,669	*	*	*	*
5	91	D	-0,27		0,441	*	*	*	*
6	65	E	-1,73		1,030	*	*	*	*
7	69	F	5,27		0,532	*	*	*	*
8	89	G	-6,73		2,949	**	**	*	*
9	79	H	3,40	11,560	0,153	*	*	*	*
10	92	J	3,07	9,425	0,562	*	*	*	*
11	81	K	-8,93	79,745	0,081	*	*	*	*
12	81	L	-4,40	19,360	1,912	*	*	*	*

Elaboración: La autora

(*) NO SIGNIFICATIVO, (**) SIGNIFICATIVO

La mezcla 8 resaltada, representa la formulación con un valor de " t " significativo

Se observa claramente que el factor que más influyó dentro de la formulación con respecto al aceite esencial, es el factor "G" que corresponde al excipiente BHT.

El BHT dentro de la formulación cumple la función de antioxidante, es decir, inhibe la oxidación de aceites y grasas, contribuyendo de esta forma a la estabilidad química de la formulación. Sin embargo, estudios realizados por Venereo J. (2002), demuestran que el BHT debe ser utilizado junto con BHA debido a que potencian mutuamente sus efectos.

Además, según Avello M, Suwalsky M. (2005), se debe tener en cuenta que la función antioxidante implica el sacrificio de su propia integridad molecular, esto es para evitar alteraciones de otras moléculas de interés.

Esto justifica el efecto que el BHT posee dentro de la formulación de la loción repelente planteada en esta investigación.

En el análisis por GC-MS de la mezcla "8" se detectaron también ciertas sustancias o productos de degradación tales como: 1-Ethyl-2,4-dimethylbenzene; 3,5-dimethyl-4-oxo-4h-pyrazole 1-oxyde; caprylic aldehyde, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos insaturados, aldehídos, entre otros, que probablemente corresponden a la fase oleosa de la mezcla, y aunque no son productos tóxicos su presencia dentro de la formulación probablemente es lo que provoca la interacción con los componentes de aceite esencial provocando un descenso en su concentración.

Como alternativa del BHT, para el producto final se utilizará Vitamina E como antioxidante y la fórmula definitiva a elegir corresponde a la Mezcla 5, excluyendo el factor 8 (BHT).

Tabla 10. Fórmula escogida para la elaboración de la loción repelente.

Fórmula 5	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	1
Alcohol cetosteárico	1,5
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	0,1
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

4.4. ELABORACIÓN DE LA LOCIÓN REPELENTE

La loción formulada para repeler mosquitos ha sido elaborada en el laboratorio de tecnología del Departamento de Química (DQ) y presenta las siguientes características como se detallan en la Tabla 11 y Tabla 12. El producto prototipo se muestra en el Gráfico 6.

Gráfico 6. Producto terminado



Elaboración: La autora

4.4.1 Fórmula de composición

Cada 100 g contiene:

Aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*).....3%

Excipientes.....C.S

4.5 PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE LA LOCIÓN REPELENTE

4.5.1 Análisis organoléptico

Como se puede apreciar en la Tabla 11 la loción presenta un aspecto homogéneo y un color blanco lechoso debido a los excipientes utilizados tal como el alcohol cetosteárico que actúa aumentando su viscosidad, sólo se registró un ligero cambio de color en el segundo mes en las lociones

almacenadas a 40 °C y al tercer mes en las lociones almacenadas al ambiente, 30 °C y 40 °C.

Tabla 11. Resultados de los análisis organoléptico de la loción

Análisis	Condiciones	Meses			
		0	1	2	3
Aspecto	Ambiente	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	30 °C	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
	40 °C	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Color	Ambiente	Blanco lechoso	Blanco lechoso	Blanco lechoso	Blanco Opaco Lechoso
	30 °C	Blanco lechoso	Blanco lechoso	Blanco lechoso	Blanco Opaco Lechoso
	40 °C	Blanco lechoso	Blanco lechoso	Blanco Opaco Lechoso	Blanco Opaco Lechoso
Olor	Ambiente	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce
	30 °C	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce
	40 °C	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce	Cítrico-Dulce

Elaboración: La autora

4.5.2 Análisis físico-químico

En la Tabla 12 se indican los resultados de los análisis físico-químicos de la loción repelente al ambiente, a 30 °C y a 40 °C, los mismos que han sido evaluados durante 3 meses.

Tabla 12. Resultados del análisis físico-químico de la loción

Parámetro	Condiciones	Meses			
		0	1	2	3
Densidad g/mL	Ambiente	1	1	0,99	1
	30 °C	-	1	1	1,009
	40 °C	-	1	1	1
pH	Ambiente	5,5	5,1	4,5	4,3
	30 °C	-	4,6	4,5	4,2
	40 °C	-	4,5	4,3	4
% Concentración aceite esencial	Ambiente	98,02	91	75,15	70,30
	30 °C	-	91	74,19	72,66
	40 °C	-	91	83,70	71,24

Elaboración: La autora

Al realizar un análisis estadístico de la Tabla 12 mediante el programa XLSTAT, se obtienen los resultados que se encuentran detallados en las tablas 12, 13 y 14.

Tabla 13. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre densidad vs. tiempo

Contraste	Diferencia	Pr > Dif	Significativo
30 °C vs Ambiente	0,005	0,247	*
30 °C vs 40 °C	0,002	0,701	*
40 °C vs Ambiente	0,003	0,648	*

(*) NO SIGNIFICATIVO, (**) SIGNIFICATIVO

Elaboración: La autora

Tabla 14. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre pH vs. tiempo

Contraste	Diferencia	Pr > Dif	Significativo
Ambiente vs 40 °C	0,275	0,791	*
Ambiente vs 30 °C	0,150	0,931	*
30 °C vs 40 °C	0,125	0,952	*

(*) NO SIGNIFICATIVO, (**) SIGNIFICATIVO

Elaboración: La autora

Tabla 15. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre % concentración de aceite vs. tiempo

Contraste	Diferencia	Pr > Dif	Significativo
30 °C vs Ambiente	5,144	0,894	*
30 °C vs 40 °C	1,975	0,981	*
40 °C vs Ambiente	3,169	0,958	*

(*) NO SIGNIFICATIVO, (**) SIGNIFICATIVO

Elaboración: La autora

Los resultados mostrados en la Tabla 14 nos indican que el pH durante los 3 meses no muestra una diferencia significativa.

En cuanto a la densidad existe una diferencia no significativa, pero si existe una ligera variación como puede observarse en la Tabla 12 al comparar las condiciones entre 40 °C - ambiente y 40 °C – 30 °C, ya que la densidad depende de la composición de la fase oleosa, la proporción de las fases y la concentración del emulsificante, reflejadas en el grado de emulsificación, por tanto la densidad varía, ésto según Ponce *et al.* (1981).

De la misma manera en la Tabla 12 se observa que el pH varía ligeramente y aunque según Orlandi M. (2004), los valores no se alejan del rango normal comprendido entre 4 – 6 se deduce que la variación se debe a la ausencia de un amortiguador de pH dentro de la formulación tales como los fosfatos.

En cuanto a los valores obtenidos por GC-MS para determinar la concentración del aceite esencial dentro de la fórmula de la loción repelente, luego del análisis se puede deducir que, el tipo de envase utilizado para almacenar la loción

influyó para que ésta haya disminuido; según la USP 32, las especificaciones para envases deben ser elegidos de acuerdo con las características del producto a almacenar, por lo tanto para evitar la rápida volatilización del aceite. El envase más idóneo a elegir es un envase de vidrio.

4.5.3 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de las muestras, se realizó en el laboratorio de Bioactividad del Departamento de Química de la UTPL, los resultados se muestran en la Tabla 16 y los ensayos en agar se muestran en el Anexo 5.

Tabla 16. Resultado de análisis microbiológico de la loción

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

Elaboración: La autora

Realizado el análisis microbiológico de la loción repelente, se pudo descartar algún tipo de contaminación significativa en las 3 condiciones; solo existió un ligero crecimiento a partir del mes 2 y el mes 3 en cuanto a bacterias aerobias mesófilos, y hongos y levaduras, sin embargo son valores que se encuentran dentro de los límites permitidos por la USP 32.

4.6 DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LA LOCIÓN REPELENTE MEDIANTE EL MÉTODO DE ARRHENIUS

En la presente investigación la predicción de la vida útil de la loción repelente no pudo determinarse puesto que el método de Arrhenius es un método muy riguroso en el cual se trabajan con datos que deben cumplir con ciertas especificaciones, tal como es el caso del valor para T90 %, el mismo que hace referencia al tiempo necesario para que el principio activo se degrade un 10 %, ésto según la Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional (2009) USP-NF.

En este caso, trabajar con un principio activo que se volatiliza fácilmente y que además, puede llegar a degradarse por la acción de calor, requiere que la loción sea envasada y conservada luego de su manufactura en envases de vidrio y así evitar al máximo que los elementos que componen el aceite esencial se pierdan.

Sin embargo, en contraste a ésto pudo deducirse un punto muy interesante luego de haber realizado esta investigación, puesto que cuando se realizó el estudio de compatibilidad del aceite esencial-excipientes mediante el diseño experimental de Plackett y Burman, las mezclas (mezcla 5 elegida por presentar mejor compatibilidad de los excipientes con respecto a la concentración del aceite) fueron colocadas en viales de vidrio para la realización del análisis y luego de transcurrido el tiempo establecido (2 meses) se pudo apreciar que la concentración del aceite esencial se mantuvo hasta en un máximo del 94 % y un mínimo del 91 % como puede observarse en la Tabla 17, lo cual nos confirma que el único factor responsable para que exista una variación significativa en la concentración del aceite esencial es el tipo de envase utilizado para almacenar la loción repelente.

Tabla 17. Concentración del aceite esencial de la mezcla 5 luego del estudio de Plackett y Burman

MEZCLA 5	
Condiciones	%
Temperatura Ambiente	94,9124
30 °C	94,3262
40 °C	91,0887

Elaboración: La autora

4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE

Los datos obtenidos de los mosquitos presentes en la mitad testigo, así como de los mosquitos tratados con la loción repelente luego del conteo fueron convertidos en porcentaje de repelencia (PR), tal como se muestra en la Tabla 18. Los valores medios fueron categorizados según la siguiente escala:

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

Tabla 18. Resultados del efecto repelente de la loción evaluada mes a mes

% DE REPELENCIA						
	Hora1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Repelencia Media	Grado de repelencia
Mes 0	74,36	71,29	63,49	68,49	69,41	IV
Mes 1	71,29	74,36	68,49	68,49	70,66	IV
Mes 2	77,83	71,29	61,21	65,91	69,06	IV
Mes 3	74,36	74,36	63,49	63,49	68,92	IV

Elaboración: La autora

Estos datos nos indican que las propiedades de la loción formulada en la presente investigación son las ideales para cumplir con su función, que es repeler mosquitos o zancudos, vectores responsables de la transmisión de enfermedades infecciosas como dengue y malaria.

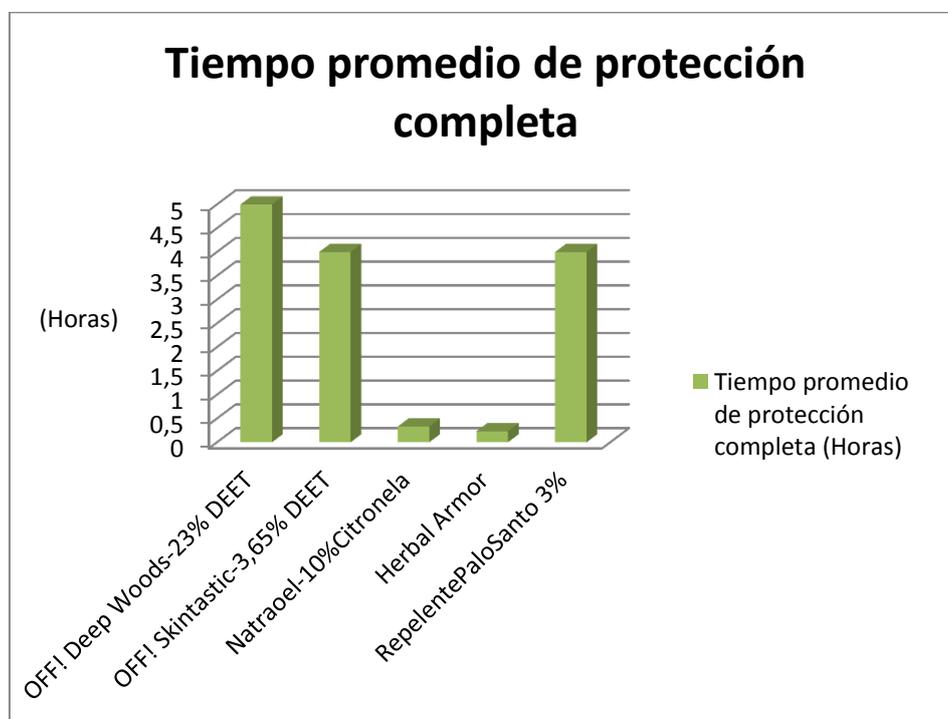
Mediante este ensayo además de comprobar el grado de repelencia, se pudo determinar también el período aproximado de duración de la loción repelente, pues al comparar los datos de esta investigación con los obtenidos por Faccioli V. *et al.* 2010 (Gráfico 7) en donde analiza los periodos de duración de diferentes repelentes comerciales resulta fácil deducir que la loción desarrollada a partir del aceite esencial de palo santo constituye una buena

alternativa en cuanto a su efectividad así como también respecto al tiempo de protección que proporciona su aplicación.

Siendo un repelente de origen natural formulado con una concentración del 3 % de aceite esencial proporciona una protección de hasta 4 horas contra mosquitos, en contraste con repelentes comerciales de origen sintético a base de DEET en donde utilizan altas concentraciones tal como es el caso del repelente OFF[®] que contiene un 23 % de este compuesto y el cual ofrece un periodo de protección de 5 horas aproximadamente.

Haciendo una comparación entre la loción formulada a base de palo santo vs. Herbal Armor[®], repelente formulado a partir de una mezcla de aceites esenciales se observa que a pesar que este último constituye una mezcla compleja de aceites esenciales de citronella, hierbabuena, cedrón entre otros, no brinda una protección prolongada contra mosquitos.

Gráfico 7. Comparación del periodo de duración de diferentes repelentes comerciales y la loción repelente de palo santo



Elaboración: La autora

4.8 EFECTO TOXICOLÓGICO POR LA VÍA DÉRMICA DE LA LOCIÓN REPELENTE

Variación en Peso

En las diferentes pesadas realizadas en los días 1, 7, 14, no hubo decremento en el peso medio de los animales y comparando la pesada inicial con la final se nota que hubo ganancia de peso.

Tabla 19. Variación en peso (g) de los animales (hembras) sometidos al estudio de la toxicidad aguda dérmica

GRUPO	1	7	14
A Control (solución salina ClNa 0,9 %)	204,2±5,2a*	202,5±9,1a	213,1±11,7a
B (loción palo santo)	205,6±4,6a	214,3±10,4a	224,9±6,7a

Fuente: Informe de Ensayo Toxicológico. Estudio de toxicidad aguda por la vía dérmica del producto loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*).

*Columna con la misma letra no presentaron diferencia significativa con una probabilidad de $p < 0.5$

Mortalidad

Los registros de la posible mortalidad diaria en el grupo sometido a prueba, a la dosis de 2000 mg/Kg, no mostró presencia de animales muertos (0 % mortalidad).

Signos toxicológicos

Entre los signos presentados durante el periodo de estudio se encuentran: moderado eritema en el grupo B (grupo tratado con la loción de palo santo), sin embargo a partir del cuarto día la severidad fue disminuyendo paulatinamente hasta el séptimo día, hasta la desaparición total del eritema en el día 8; entre la primera y cuarta hora de iniciado el estudio presentaron acicalamiento leve; y entre la primera y segunda hora movimiento en círculos, tanto para el grupo tratado de hembras como para el grupo de los machos. Los grupos control no presentaron ningún signo.

Patología Macroscópica

Al término del ensayo, esto es a los 14 días después de la dosificación, se sacrificaron a todos los animales, se les practicó la necropsia macroscópica, se procedió a observar si existían alteraciones a nivel de órganos y tejidos. A la dosis de 2000 mg / Kg, no se observaron alteraciones en ninguno de los órganos observados.

Tabla 20. Observaciones macroscópicas

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

Fuente: Informe de Ensayo Toxicológico. Estudio de toxicidad aguda por la vía dérmica del producto loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*).

(0) Ausencia de anormalidad

(P) Presencia de anormalidad

Por tanto los resultados aquí descritos demuestran que la dosis aguda dérmica de 400 mg / 200 Kg peso corporal en ratas, bajo las condiciones detalladas según la OECD 402 demuestran que es un producto que produjo una leve afección en los animales de experimentación, es una afección leve puesto que a pesar de que se observa ésto en los animales, al término de unos días desaparece sin generar algún otro efecto significativo en los animales de experimentación ⁽⁴⁰⁾.

⁴⁰ Informe de Ensayo Toxicológico. Estudio de Toxicidad Aguda por la vía dérmica del producto loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*) procedente del Departamento de Química Aplicada-UTPL, realizado por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil. 2012.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- ✚ Los estudios de preformulación con respecto a la valoración del principio activo proporciona una información valiosa para el diseño de la fórmula de la loción repelente puesto que permite conocer los excipientes que puede ser incluidos en la fórmula de composición.
- ✚ El diseño factorial de Plackett y Burman empleado en ésta investigación, es un diseño de máxima precisión que permite evaluar la potencia del principio activo en presencia de varios excipientes, además proporciona información más específica de la forma en que cada excipiente influye en la disminución de la potencia del principio activo.
- ✚ La formulación más estable física y químicamente es aquella en la que no se incluye el BHT como antioxidante, pues de lo contrario la potencia del aceite esencial se ve disminuido.
- ✚ Luego de los ensayos aplicados, la loción repelente formulada demuestra ser estable a nivel físico, y microbiológico, mientras que a nivel químico el factor influyente para un descenso en la concentración del aceite esencial es el tipo envase.
- ✚ La determinación de la vida útil de la loción repelente mediante el método de Arrhenius es posible realizarlo siempre y cuando no exista una degradación significativa del principio activo. En la presente investigación la concentración del aceite esencial se vio influenciada por el tipo de envase empleado para el estudio de estabilidad química.

- ✚ El grado de repelencia, así como el período de duración que proporciona la loción repelente formulada en la presente investigación se encuentran entre los rangos satisfactorios, demostrando así que la loción a partir del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) constituye una alternativa innovadora frente a los repelentes sintéticos tradicionales.
- ✚ La toxicidad aguda dérmica evaluada en la loción repelente es leve y desaparece al cabo de unos días, sin embargo es posible que se requiera mejorar la fórmula de composición para evitar cambios en el pH ya que muy probablemente sea el factor responsable de este tipo de afecciones.
- ✚ Los aceites esenciales son fácilmente extraíbles, amigables con el medio ambiente al ser biodegradables y a diferencia de los pesticidas sintéticos, son mezclas complejas de compuestos que actúan de manera sinérgica como una defensa estratégica, por lo que dificultan el desarrollo de la resistencia a plagas, por lo tanto todas estas propiedades beneficiosas de los aceites esenciales hacen que la propuesta planteada en ésta investigación sea de gran aporte al conocimiento de nuevas aplicaciones de la biodiversidad a la industria farmacéutica.

5.2 RECOMENDACIONES

- ✚ En el diseño factorial de Plackett y Burman para el análisis de las mezclas, se debe utilizar el mismo método que se emplea para el aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*), es decir mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS).
- ✚ Realizar un estudio de compatibilidad con excipientes mediante el diseño factorial de Plackett y Burman en donde se incluya un sistema amortiguador o excipiente como regulador de pH para así mantener estos valores dentro del rango estipulado (pH: 4 - 6).
- ✚ Se debe excluir de la formulación el excipiente BHT para evitar posibles interacciones con el aceite esencial y por lo tanto producir una disminución en su concentración.
- ✚ Realizar un estudio de estabilidad de la loción repelente empleando diversos tipos de envase con el fin de conservar al máximo las propiedades del aceite esencial evitando la disminución de su concentración.
- ✚ Finalmente luego de tomar en cuenta los puntos anteriores, se debe realizar un nuevo estudio de toxicidad aguda dérmica para descartar posibles efectos nocivos producidos a nivel de la piel al momento de aplicar la loción repelente obtenida a partir del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*).

VII. ANEXOS

ANEXO 1

EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES AGILENT SERIES 6890 N, ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS AGILENT SERIES 5973 INERT



Elaboración: La autora

ANEXO 2

MEZCLAS GENERADAS A PARTIR DE LA MATRIZ DE EXPERIMENTACIÓN.

FÓRMULA 1	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	1
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,06
Aceite de vaselina	2
Aceite de silicona	0,3
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 2	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	1
Alcohol cetosteárilico	1,5
Propilenglicol	14
Vitamina E	0,06
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	1
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 3	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	14
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	2
Aceite de silicona	0,3
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 4	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	1
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,06
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	0,3
BHT	0,05
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 5	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	1
Alcohol cetosteárilico	1,5
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	0,1
BHT	0,06
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 6	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	2
Aceite de silicona	1
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 7	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	1
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,06
Aceite de vaselina	2
Aceite de silicona	1
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 8	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	1,5
Propilenglicol	14
Vitamina E	0,06
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	1
BHT	0,5
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 9	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	14
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	2
Aceite de silicona	1
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 10	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	1,5
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	0,3
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 11	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	2
Propilenglicol	14
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	2
Aceite de silicona	1
BHT	0,05
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

FÓRMULA 12	
Componentes	% (p/v)
Principio activo	3
Lauryl sulfato de sodio	0,8
Alcohol cetosteárilico	1,5
Propilenglicol	10
Vitamina E	0,03
Aceite de vaselina	0,5
Aceite de silicona	0,3
BHT	0,03
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Glicerina	3
Agua para aforo	c.s

Elaboración: La autora

ANEXO 3

VIALES PARA LA DISTRIBUCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ACUERDO AL DISEÑO FACTORIAL DE PLACKETT Y BURMAN



Elaboración: La autora

ANEXO 4

TRAMPAS DE LUZ EMPLEADAS PARA LA RECOLECCIÓN DE MOSQUITOS PARA EL BIOENSAYO DE ACTIVIDAD REPELENTE



Elaboración: La autora

ANEXO 5

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN AGAR REALIZADOS AL PRODUCTO

Fotografía de Aerobios mesófilos



Elaboración: La autora

Fotografía de Staphylococcus aureus



Elaboración: La autora

Fotografía Hongos, mohos y levaduras



Elaboración: La autora

Fotografía de Pseudomona aeruginosa



Elaboración: La autora

Fotografía de *Escherichia coli*



Elaboración: La autora