

La investigación en la cosmética natural

Tatiana Mosquera Tayupanta



Universidad Politécnica Salesiana

La investigación en la cosmética natural

Tatiana Mosquera Tayupanta

La investigación en la cosmética natural



2015

La investigación en la cosmética natural

Tatiana Mosquera Táyupanta

Colaboradores: Sandra Ayala, Carina Hidalgo, Katherine Meza,
Paco Noriega, Edison Osorio, Gabriela Vargas,
Tatiana Vásquez, Teresa Veloz.

© Universidad Politécnica Salesiana
Av. Turuhuayco 3-69 y Calle Vieja
Casilla: 2074
P.B.X.: (+593 7) 2050000
Fax: (+593 7) 4088958
e-mail: rpublicas@ups.edu.ec
www.ups.edu.ec
Cuenca-Ecuador

Área de Ciencias de la Vida
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA DE
LOS RECURSOS NATURALES

Diseño
diagramación,
e impresión: Editorial Universitaria Abya-Yala
Quito Ecuador

ISBN: 978-9978-10-230-5

Impreso en Quito-Ecuador, diciembre 2015

Publicación arbitrada de la Universidad Politécnica Salesiana

Índice

Agradecimientos	9
Introducción	13
Capítulo I	
Cosmética natural	15
Antecedentes	15
Las plantas utilizadas en la cosmética	18
La cosmética natural	24
Definiciones	28
Regulación de los cosméticos naturales y orgánicos	32
América del Norte	33
Unión Europea	33
Latinoamérica	36
El mercado de cosméticos en el Ecuador	36
Formulaciones cosméticas	37
Capítulo II	
Determinación <i>in vitro</i> de actividad biológica de ingredientes naturales	41
Estudios de eficacia <i>in vitro</i>	42
Determinación de actividad antibacteriana	42
Determinación de actividad antifúngica	67
Capítulo III	
Evaluaciones <i>in vivo</i> en formulaciones cosméticas	81
Estudios de eficacia cosmética <i>in vivo</i>	82
Capacidad antibacteriana	84
Capacidad antioxidante	92
Evaluación instrumental	96
Bibliografía	101

Índice de tablas

Tabla 1. Determinación <i>in vitro</i> de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>)	51
Tabla 2. Análisis estadístico: Test de Tukey Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	53
Tabla 3. Actividad antibacteriana de la loción con Aceite Esencial (AE) de hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	54
Tabla 4. Análisis estadístico: Test de Tukey de la loción con Aceite Esencial (AE) de hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>)	56
Tabla 5. Fórmula Unitaria Colutorio A.....	60
Tabla 6. Fórmula Unitaria Colutorio B.....	60
Tabla 7. Actividad antibacteriana de Colutorios determinada en Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	62
Tabla 8. Análisis de Varianza No Paramétrico de una Vía de Kruskal-Wallis (Enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus mutans</i>)	63
Tabla 9. Test Kruskal-Wallis All Pairwise (Enjuagues bucales frente a <i>Streptococco mutans</i>)	64
Tabla 10. Análisis de Varianza No Paramétrico de una Vía de Kruskal-Wallis (Enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus pyogenes</i>).....	65
Tabla 11. Test Kruskal-Wallis All Pairwise (Enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus pyogenes</i>)	66
Tabla 12. Promedio de diámetro de halos de inhibición del extracto de marco (<i>Ambrosia arborescens</i>)	75

Tabla 13. Promedios de diámetro de halos de inhibición del aceite esencial de matico (<i>Aristeguietia glutinosa</i>)	76
Tabla 14. Test Tukey <i>a posteriori</i> (<i>Aristeguietia glutinosa</i>)	77
Tabla 15. Test Tukey <i>a posteriori</i> (<i>Aristeguietia glutinosa</i>)	78
Tabla 16. Escala de evaluación de eritema para test de irritabilidad	86
Tabla 17. Escala de evaluación de edema para test de irritabilidad	87
Tabla 18. Escala de evaluación de ampollas para test de irritabilidad.....	87
Tabla 19. Escala de evaluación de descamación para test de irritabilidad.....	88
Tabla 20. Escala de evaluación de detergente para test de irritabilidad.....	88
Tabla 21. Escala de evaluación de reflectividad para test de irritabilidad.....	89
Tabla 22. Clasificación del Índice de Irritación Primaria Cutánea.....	90
Tabla 23. Valores de los Índices de irritación primaria cutánea de las lociones de hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>)	90
Tabla 24. Disminución del porcentaje de porfirinas generadas por <i>P. acnes</i> después de la aplicación de la loción.....	91
Tabla 25. Evaluación dermatológica antes del tratamiento con la crema de <i>Plukenetia volubilis</i> (Sacha inchi).....	94
Tabla 26. Evaluación dermatológica luego de 28 días del tratamiento con la crema de <i>Plukenetia volubilis</i> (Sacha inchi).....	96
Tabla 27. Evaluación instrumental (Cutometer) en voluntarias tratadas con crema de <i>Plukenetia volubilis</i> (Sacha inchi)	97

Tabla 28. Mejoría promedio del tratamiento con crema de <i>Plukenetia volubilis</i> (Sacha inchi).....	99
---	----

Índice de gráficos

Gráfico 1. Actividad biológica identificada en investigaciones con aceites esenciales.....	21
Gráfico 2. Distribución de las plantas medicinales identificadas con su nombre científico de acuerdo a la actividad biológica reportada en la base de datos Scopus.....	22

Agradecimientos

“Agradece la luz de la llama pero nunca olvides el pie del candil que constante y paciente la sostiene en la sombra” a todas las personas e instituciones que han contribuido a las investigaciones presentadas en este libro.

“Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran” gracias queridos estudiantes colaboradores de estas investigaciones, compañeros docentes que han fortalecido con su experiencia al logro de resultados.

A la Universidad Politécnica Salesiana que ha permitido el desarrollo de la investigación en el campo de los Recursos Naturales, a través del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI centro de investigación en el cual confluyen pensamientos y conocimientos multidisciplinarios, que trabajan coordinadamente generando productos de alta calidad científica, investigaciones que buscan respuestas para el mejor aprovechamiento de la diversidad biológica, la protección de los recursos genéticos, y el apoyo a mejorar la calidad de vida de la población, siempre con la consideración de un desarrollo sostenible.

A todos ustedes, la razón de existir de este libro, lectores que se han tomado horas de su tiempo para leer lo que ha costado tanto trabajo, pero genera tanta satisfacción.

“Profundizar en el conocimiento científico
es una de las mejores vías para lograr
plenitud y libertad”

(Pilar Álvarez Pellicero)

Introducción

Esta obra recopila algunos estudios desarrollados en la línea de investigación de la tecnología aplicada a los recursos naturales, esperando puedan contribuir al desarrollo y manejo de herramientas técnicas que permitan aprovechar estos recursos, siempre dentro de un margen de desarrollo sostenible, que pueda generar un aumento de procesos productivos y productos fabricados en las diferentes ramas de la industria bien sea farmacéutica, alimenticia o cosmética; sin poner en riesgo el aprovechamiento de estos recursos a las futuras generaciones.

El objetivo principal de este documento es fundamentar el uso de los diferentes materiales vegetales, uso que nace del saber ancestral, en el que el hombre no necesitó de los modernos métodos de investigación para encontrarle aplicabilidad a lo que le ofrecía la naturaleza y mejorar su calidad de vida, de una forma u otra; pero que hoy en día con un conocimiento más amplio de diversas áreas, permiten que este saber ancestral sea respaldado por la ciencia médica o ciencia cosmética.

La tendencia hacia una cosmética natural y la falta de estudios de ingredientes naturales que puedan ser incorporados en formulaciones cosméticas, son los principales argumentos que han motivado a las investigaciones que se presentan.

CAPÍTULO I

Cosmética natural

Antecedentes

La cosmética natural representa todavía un segmento minoritario de consumo en comparación con la cosmética convencional. Sin embargo, los estudios de mercado confirman una gran tendencia de crecimiento en los próximos años; en esta categoría, se estima un crecimiento del 15% frente al 5% global de los restantes productos de cuidado personal (Alcalde, 2010). Tendencia que fundamenta la necesidad de aumentar la investigación de materias primas vegetales, que podrían ser consideradas alternativas en formulaciones cosméticas.

Esta nueva tendencia ha dado origen a una cosmética natural, categorizada bajo diferentes denominaciones: cosmética verde, biocosmética, cosmética orgánica, cosmética natural o fitocosmética; todas ellas con diferentes definiciones, cada una con mayores o menores exigencias, pero con un objetivo común, el retorno hacia lo natural.

“La proclamación de natural ha sido fuertemente orientada hacia formulaciones libres de aditivos o con fitoingredientes o materias primas vegetales, recogiendo las percepciones de segu-

ridad y pureza que son críticas en los productos para la salud” (Nadinic, 2009).

Y todo esto ha sido promovido:

Gracias al conocimiento químico de los componentes de las plantas, y al avance de las investigaciones clínicas que han demostrado su eficacia y fiabilidad y, en general, al mayor conocimiento de la fisiología de la piel, esto ha permitido el auge de la fitocosmética, de tal manera que hoy en día la industria cosmética, tiene la posibilidad de incorporar principios activos vegetales sea puros o como extractos (López, 2009).

En el siglo XXI, los desafíos para las industrias que utilizan procesos químicos, entre las cuales se encuentran los fabricantes de productos para el cuidado personal, son tan grandes como los enfrentados por casi todas las áreas industriales. Los propulsores de los cambios afectan todos los aspectos de la producción, especialmente las materias primas, los procesos de fabricación y la selección de las características claves de los productos (Clark & Summerton, 2010).

Dentro de este crecimiento, en el campo de los productos naturales, cualquiera que sea la denominación utilizada (bio, eco, natural, etc.), es importante analizar cuál es el comportamiento del mercado, en este análisis estudios realizados en Estados Unidos, uno de los países con mayor producción y consumo de cosméticos, se encuentra un estudio de Kline & Company importante empresa de investigación de mercado, que resalta una alta tasa de crecimiento en mercados bien establecidos como el de Europa Occidental y América del Norte, “se estima que la demanda de productos naturales crezca hasta el 10% más al año 2016” (Kline & Company, 2012).

Estudios realizados por Euromonitor, empresa internacional de inteligencia de mercado dedicada al consumo masivo; evidencian que Latinoamérica ha experimentado un incremento de la demanda del mercado cosmético en un 3,8% anual, aumento relacionado a la creciente demanda de productos en la categoría de cuidado para el cabello, piel y fragancias, cifras que corrobo-

ran a los Estados Unidos como líder en el sector cosmético, sin embargo Latinoamérica se visualiza como un mercado también en crecimiento, dentro de Latinoamérica, Colombia es un país con importantes avances e innovación en productos naturales, relacionado sin duda con la riqueza natural de Colombia, que lo ubica como el segundo país del mundo, después de Brasil, con mayor número de plantas existentes y, además, es el cuarto país de Latinoamérica con más áreas protegidas en relación a su área total después de: Venezuela, Bolivia y Ecuador (Proexport Colombia, 2008).

En cuanto a la realidad del mercado en nuestro país en el tema de cosméticos orgánicos, no se cuenta con datos exactos de esta tendencia, aunque existe presencia de algunas marcas internacionales de cosméticos orgánicos y naturales; por ejemplo: Oriflame con la línea Ecobeauty®, Zuii® con una línea de maquillaje 100% orgánico certificado, y Plante System® Dermocosmética Orgánica by Arkopharma con una línea certificada para el cuidado de la piel, no hay aún, una sólida presencia de mercado nacional, existen cifras programadas como resultado de estrategias gubernamentales en el cambio en la matriz productiva, del Ministerio de Industrias y Productividad y el sector de los Cosméticos, en incrementar la producción en el año 2015 a USD 64 millones 902 mil (Ministerio de Industrias y Productividad, 2014), este aumento de la producción nacional puede incrementar la presencia de productos dentro de la categoría natural, ya que es claro que tanto para empresas cosméticas internacionales y nacionales existe el interés por la fabricación de cosméticos orgánicos y naturales, considerándose oportunidades de desarrollo. También es claro que esta oportunidad de desarrollo generará nuevos desafíos a los cuales se enfrentarán los formuladores cosméticos, en la investigación y desarrollo de productos con activos naturales, que se puedan incorporar en esta creciente industria cosmética

El crecimiento en el campo de la cosmética natural es el resultado de un consumidor más exigente. Los nuevos consumi-

dores de productos cosméticos están muy bien informados, tienen conocimiento de qué cuidarse, y cómo hacerlo, este tipo de consumidor no está segmentado por clases sociales, grupos políticos y/o edades. Un estudio de este segmento de mercado indica que entre el 9 al 50% de consumidores escogen el producto amparados en el criterio de “formulación ecológica” del 25 al 72% de consumidores resaltan no la importancia no sólo que se mencione como natural sino que se certifique como ecológicamente sustentable, un 80% de consumidores probablemente dejarían de comprar una marca si no aplica prácticas de ética medioambiental en la elaboración de productos y el manejo de los residuos (Kline & Company, 2008). Es muy claro que es un consumidor no sólo informado sino responsable preocupado por el medio ambiente, amante de conceptos como “natural” u “orgánico”, interesado por la sustentabilidad. Son estos conceptos lo que ha dado apogeo a esta categoría “Cosmética Natural”, que busca satisfacer consumidores exigentes, que desean no sólo productos naturales sino que funcionen mejor que cualquier otro. Conceptos que fueron tomados como contradictorios algunos años atrás, pero se han desarrollado activos botánicos totalmente funcionales, lo que ha generado cambios radicales en la formulaciones que hoy en día permite conjugar bajos riesgos con mayor eficacia. Los desarrollos realizados demuestran que los activos botánicos no son vistos como inferiores en cuanto a su desempeño, si se compara con un producto cosmético convencional.

Las plantas utilizadas en la cosmética

Ecuador tiene un 10% de todas las especies de plantas que hay en el planeta. De este porcentaje, la mayor cantidad crece en la cordillera de los Andes, en la zona noroccidental, donde se calcula que hay aproximadamente 10 mil especies (China, 2012). La herbolaria ecuatoriana y latinoamericana han realizado importantes

contribuciones al desarrollo de la medicina científica y por ende a la salud humana, puesto que en nuestro país existen alrededor de 35 000 especies que tienen interés médico y potencial terapéutico para elaboración de nuevos productos; cerca del 30% de la población ecuatoriana está desprotegida de medicina, por esta razón la Asamblea Mundial de Salud recomendó aprovechar lo positivo y beneficioso de la medicina tradicional (Naranjo P., 2010).

En el Ecuador, dada su alta biodiversidad, a numerosas plantas se les ha otorgado la categoría de “medicinales”, siendo parte del patrimonio natural inmaterial, por lo que se plantea aprovechar el saber ancestral en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. El conocimiento actual de las plantas medicinales tiene dos objetivos fundamentales, una vez validado su valor terapéutico, el primero radica en descubrir la estructura molecular de los principios activos, el segundo es sentar bases científicas para el empleo directo de las plantas por parte de grandes sectores de la población (Chiriboga, 2010), el cumplimiento de estos objetivos permitirá la estandarización de su uso dentro de la industria alimenticia, farmacéutica y/o cosmética.

Así como se ha descubierto el valor alimenticio de ciertos productos vegetales a lo largo de los años, el hombre también ha ido descubriendo el valor curativo o analgésico de muchas plantas, la extinción de las plantas y la pérdida del saber cultural pone en riesgo nuevas aplicaciones aun no desarrolladas por la ciencia moderna, que puedan ser válidas, seguras y eficaces (Naranjo P., 2010). La investigación orientada por este saber ancestral podrá dirigir la utilización de biodiversidad tan variada en nuestro país.

Relacionando lo que ha ocurrido en el campo de medicamentos, las drogas de síntesis ofrecen indiscutibles ventajas, sin embargo se ha descubierto que se puede producir efectos indeseables y hasta graves, esto ha motivado el retorno al estudio de los vegetales en el intento de encontrar drogas naturales de mejor valor terapéutico y menor riesgo patológico y aunque el conoci-

miento empírico es valioso, no es suficientemente confiable, es necesaria la confirmación científica, lo mismo ocurre en el campo de la cosmética. Importante considerar que una vez encontrado y confirmado el valor terapéutico de las drogas vegetales, se plantea la necesidad de estimular su uso y la explotación racional de las plantas medicinales cultivables, beneficiando de esta manera tanto al sector agrícola como a la población en general ofreciendo alternativas naturales que permitan cuidar su salud y bienestar, siempre dentro de propuestas que permitan la sostenibilidad del recurso natural.

Ecuador cuenta con una alta gama de plantas que no han sido estudiadas y que son usadas por los grupos étnicos, el aval científico de su uso, enfoca el camino hacia el aprovechamiento racional y sustentable de los recursos vegetales y los saberes ancestrales.

Ecuador cuenta con 62 empresas relacionadas con varias etapas de la industrialización de las plantas medicinales en la región andina, de los cuales 42% se concentra en la producción de medicamentos a base de plantas, el otro 42% en la agricultura, la recolección y procesamiento, el resto de las empresas se dedican a producción de cosméticos o especias (Grupta, 2006).

Muchas plantas han sido identificadas para tratar varias enfermedades que han afectado a las poblaciones desde la antigüedad, entre las que se destacan alergias, dolores, infecciones y enfermedades cutáneas. Las lesiones de la piel más estudiadas están relacionadas con diferentes formas de dermatitis, alergias de la piel, acné e infecciones bacterianas de la piel; varias de las plantas medicinales, aceites esenciales o extractos naturales obtenidos de las mismas presentan relación con dichas enfermedades ya que poseen actividad curativa sobre estas patologías (Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, 2008).

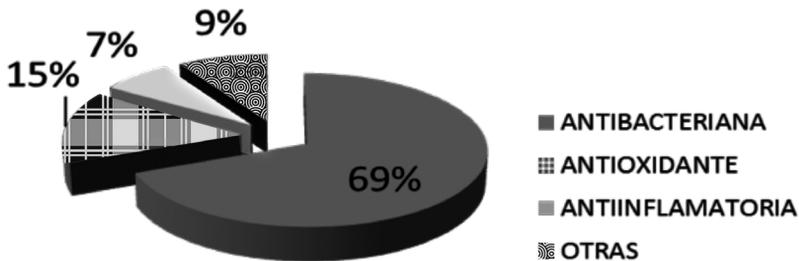
Alrededor del tema existen un sin número de investigaciones, actividad científica que se evidencia, en un estudio realizado

en el 2008 por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales y tropicales, Centro (CENIVAM). El estudio sintetiza con la ayuda de un programa Vantage Point, las investigaciones realizadas con componentes vegetales registradas en Scopus, encontrando 1 600 registros de trabajos de investigación, orientados a la determinación de la composición química y/o la actividad biológica de estos componentes. Dentro del estudio de actividad biológica la que se evalúa con más frecuencia es la antimicrobiana (69%). La confirmación de una actividad biológica en un componente vegetal, orienta su potencial uso dentro de una industria, es decir todas estas investigaciones se convierten en el fundamento para el aprovechamiento de estos recursos naturales.

Gráfico 1.

Actividad biológica identificada en investigaciones con aceites esenciales

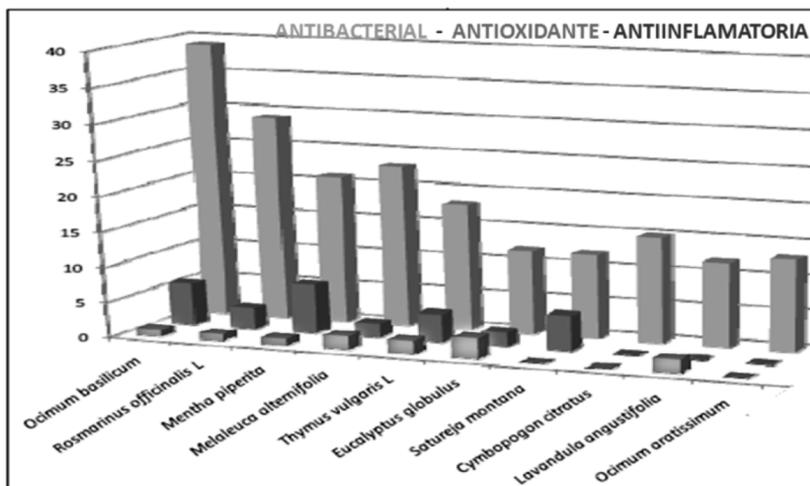
ESTUDIOS CIENTÍFICO-SCOPUS



Fuente: CENIVAM 2008

Existen especies de plantas muy estudiadas, con un gran número de investigaciones que confirman la actividad biológica que presentan; actividad biológica que genera un alto potencial de aplicación en cualquier tipo de industria bien sea cosmética, farmacéutica o alimenticia.

Gráfico 2.
Distribución de las plantas medicinales identificadas con su nombre científico de acuerdo a la actividad biológica reportada en la base de datos Scopus



Fuente: CENIVAM, 2008

De acuerdo a la recopilación bibliográfica realizada por CENIVAM, es claro que la actividad biológica más importante es la Antibacterial. Las plantas en su medio tienen un poder de auto conservación, pues a pesar de estar rodeadas de un ambiente que predispone a sufrir infestaciones de toda clase de microorganismos: bacterias, mohos, levaduras; resisten a estas fuerzas naturales de desintegración, gracias a las sustancias químicas presentes en las partes de la planta, que le permiten llevar a cabo eficientemente este mecanismo natural. Y son estas evidencias lo que ha generado que plantas sean utilizadas para diferentes patologías, dentro de la medicina tradicional, siendo esta a la vez; la base en la que se han fundamentado investigaciones, con el objeto de determinar los componentes responsables de las diferentes actividades atribuidas, he incorporarles como ingredientes activos en

productos cosméticos, farmacéuticos e incluso alimenticios, considerándose como ingredientes a toda la planta, partes específicas de ellas, o sus extractos.

Refiriéndome a esta actividad antibacteriana como la más resaltada en investigaciones, existen muchos estudios que demuestran la capacidad antibacteriana *in vitro* de plantas, “los resultados no son directamente comparables debido a las diferencias metodológicas, tales como la elección de la planta, extracto (s), microorganismo (s) de prueba y métodos antimicrobianos” (Janssen, 1987), todos estos resultados fundamentan científicamente el uso de estos materiales vegetales como ingredientes activos en la industria.

Otra de las propiedades que son atribuidas a las plantas es su poder antioxidante. Las plantas sufren de estrés oxidativo inducido por la radiación UV, de igual forma como los animales y los humanos, pero no pueden protegerse a sí mismos como lo hacen los humanos por medio exógenos, por lo tanto, han desarrollado múltiples estrategias y moléculas altamente eficaces para defenderse contra el estrés ambiental. Por ejemplo, los líquenes contienen sustancias naturales que absorben los rayos UVB y actúan como una “pantalla”. Las plantas contienen múltiples antioxidantes eficaces en combinaciones ideales, los llamados “fitoantioxidantes”, capaces tanto de la protección de sus propias células contra el estrés oxidativo inducido por la radiación UV, así como de conferir protección a otros organismos, mediante la ingestión o aplicación tópica.

Los antioxidantes naturales provenientes de un sin número de plantas, propiedad que está siendo aprovechada en los diferentes campos de la industria como preservantes en alimentos, en medicinas y anti edad en cosméticos; compuestos como la quercetina, tocoferol y carotenos, entre otros, están sustituyendo a los antioxidantes sintéticos de mayor uso como la vitamina A y C, el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutil-hidroxianisol

(BHA), debido a que estos presentan una actividad comparable a los sintéticos y con la gran ventaja de no ser tóxicos (Mesa, Quinto - Quinto, & Blair, 2013).

La cosmética natural

Antes de realizar una definición de las diferentes categorías existentes en la Cosmética Natural, es interesante contraponer algunos aspectos de la cosmética natural con la cosmética convencional, abordar estas dos tendencias diferentes en el consumo de cosméticos, que conlleva el desarrollo de dos tipos de producción cosmética, por un lado la cosmética convencional o de síntesis y por otro una cosmética en crecimiento, la cosmética natural.

La cosmética convencional es una industria química que ha venido produciendo cosméticos con un gran número de ingredientes, en su mayoría materias primas de bajo costo extraídas del petróleo, producción que hoy en día se encuentra: cuestionada y presionada a cambiar su orientación, por la nueva tendencia de los consumidores de cosméticos, hacia una cosmética más natural. Esta fuerte corriente, que al parecer está arrasando con los cosméticos convencionales, engloba un concepto “de lujo más abstracto, con privilegio en las sensaciones, y está representada por los objetos sencillos, artesanales (y originales), oriundos de comunidades distantes, productos rústicos, relacionados con la naturaleza, el medio ambiente y la tranquilidad hacia lo natural” (Franquilino, 2011).

Algunos podrían decir que los cosméticos naturales u orgánicos no ofrecen beneficios mayores que los cosméticos convencionales, pero los motivos por los que se prefieren este tipo de productos pueden nombrarse según la percepción del consumidor ya que proveen salud, bienestar, seguridad avalada por su uso tradicional, armonía entre cuerpo y mente, acercamiento a la naturaleza, y ofrecen gran tolerancia dermatológica, debido a

que contienen una base de aceites vegetales y extractos de plantas que estimulan las funciones vitales de la piel y son libres de compuestos sintéticos. Todos éstos beneficios, algunos subjetivos, otros empíricamente demostrables, avalan la tendencia en el aumento del interés por la salud y el medio ambiente. Un producto natural u orgánico da seguridad, genera confianza al estar relacionado con la ausencia de componentes sintéticos. Los consumidores explican que: “lo orgánico, lo natural es más sano”; “funciona mejor”; “por alguna razón es utilizado desde hace siglos”; “va de la mano con el medio ambiente”; y “son productos biodegradables” (Hermida, 2011).

Con este precedente, es importante acotar que desde el punto de vista técnico surge una nueva interrogante ¿Qué tan seguros y confiables son los cosméticos naturales?, al respecto es bastante clara la conclusión a la que llega la investigación realizada por Tolosa, en la que se expresan algunos de los inconvenientes de la cosmética natural, entre ellos: “la implementación del marketing ético, los problemas técnicos y de formulación, la diversidad de eco-sellos, y la incompatibilidad entre las normas existentes que generan desconcierto y confusión, no solo al consumidor sino también al productor”.

Los productos naturales legítimos, que han obtenido una certificación, están compitiendo contra los cosméticos convencionales que han sido etiquetados como “naturales” los cuales muchas veces no poseen una certificación que verifique su autenticidad. Lo que se pone en tela de juicio en este caso es la veracidad de los productos cosméticos de estas características, lo que confiere al consumidor cierta desconfianza e inseguridad (Tolosa, 2011).

Uno de los argumentos más utilizados en favor de lo natural es que no hace daño, como sí lo hacen los productos industrializados. La naturaleza representa la fuerza vital, lo que anima a los vivientes, la creación suprema, de tal manera que el adjetivo “natural” se ha convertido en superlativo de lo sano, benéfico,

recomendable y, por supuesto, inocuo. En oposición, lo que no es bueno es lo artificial, lo químico, lo sintético; si un medicamento o un alimento es producto de la química, si tiene aditivos artificiales resulta que no es bueno. Para los fanáticos de lo natural, el adjetivo más peyorativo es que algo contiene químicos. Al margen de la ignorancia que traduce el decir que algo no es químico, o que la química no es una ciencia natural, tal tendencia no resulta del todo favorable a la salud.

Es verdad que muchos productos sintéticos pueden representar el riesgo de efectos colaterales, pero no lo es menos a partir de los productos naturales. En otras palabras, lo natural no es garantía de efectividad o inocuidad e igual puede ser dañino lo totalmente natural (Lifshitz, 2003). Consideración que debe ser analizada no sólo por consumidores, sino mucho más por los desarrolladores y productores de esta categoría de productos.

Es claro que esta reflexión de Lifshitz, lleva a pensar que uno de los más grandes inconvenientes que tiene la Cosmética Natural, es la falta de estudios que permitan utilizar un ingrediente natural con total seguridad, conscientes tanto de sus potencialidades y sus riesgos. “No se debe limitar a la sabiduría popular la seguridad y la eficacia porque cada parte de una planta tiene numerosas sustancias con actividad biológica y potencialmente capaces de producir cualquier efecto indeseable” (García, 2009). En el estudio de García se concluye que durante los años estudiados 2003-2007, se reportó un total de 332 reacciones adversas en 2003 y de 359 en 2007. Especies como el Ajo (*Allium sativum* L.), Aloe (*Aloe vera* L.), fango medicinal y propóleos fueron los que acumularon mayor cantidad de reportes de sospechas de reacciones adversas, estas se evidenciaron más en el sistema digestivo y en la piel. En contra de lo que se piensa sobre la seguridad de los productos naturales, éstos sí producen reacciones adversas, y aunque en el mencionado estudio no se reportaron reacciones adversas graves, sí hay un elevado número de reacciones moderadas. Esto constituye una alerta para

la población que consume productos naturales por auto prescripción, para el profesional de la salud y para el sistema sanitario que deben advertir al consumidor de los riesgos a los que está sometido cuando emplea estos productos.

Con estos fundamentos, lo que se quiere recalcar es que las especies vegetales utilizadas en una formulación cosmética, no son ajenas al riesgo de producir una reacción adversa, concienciar que los productos naturales no ofrecen una completa seguridad de uso, siempre existirán riesgos inherentes a la diversidad de componentes químicos que posee un ingrediente natural. Argumentos que deben ser considerados dentro del crecimiento de la industria cosmética en la categoría de Cosmética Natural, el estudio científico de los ingredientes, las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, la estabilidad de la formulación, son aspectos que deben ser considerarse dentro del desarrollo del producto.

Se ha podido sintetizar las principales corrientes teóricas, sus posiciones y debates, destacando los aspectos o problemáticas principales en cada una de las categorías cosméticas, dejando claro que tanto ingredientes naturales como sintéticos tienen ventajas y desventajas y el reto de un formulador es equilibrar con conocimiento, las potencialidades y limitaciones para conseguir una formulación cosmética segura.

Ante la creciente demanda de cosméticos naturales, los consumidores de esta clase de productos se enfrentan principalmente con las siguientes dificultades:

1. Distinguir los auténticos productos naturales y/u orgánicos de los que no los son y que se publicitan como tales, y, 2. Conocer las diferencias entre la denominación natural y orgánica, y los requisitos de cada una de ellas en lo que respecta a la formulación, el etiquetado, etc.

Uno de los inconvenientes que se había definido dentro de la categoría de la cosmética natural, es la variedad de denominaciones que terminan confundiendo a los consumidores. Al respecto es

importante realizar una aclaración: el cosmético natural no es un cosmético orgánico.

A continuación se presentan algunas definiciones relacionadas a la Cosmética Natural.

Definiciones

Fitocosmética

Un fitocosmético es el término que define al producto cosmético (de higiene o tocador) que incluye casi exclusivamente materias primas de origen vegetal (fitoingredientes) en su formulación con el objetivo de ejercer una acción determinada. Entendiéndose como fitoingrediente a cualquier materia prima vegetal que ha sido procesada convenientemente para ser incluida en formulaciones cosméticas y farmacéuticas. Puede provenir de plantas frescas o desecadas, enteras o en partes, extractos, secreciones, aceites, etc. o puede ser un producto aislado de las mismas por metodologías especiales, de composición heterogénea (Nadinic, 2009).

Cosmético orgánico y cosmético natural

Todo producto de cosmética orgánica, si es verdaderamente orgánico, debe llevar un certificado de un organismo regulador que lo acredite como tal. En este aspecto existen algunas empresas que confieren el certificado de acreditación y no existe un certificado común, ni en el mercado Europeo y mucho menos en América, en donde esta categoría tiene menos años de desarrollo.

Las principales entidades regulatorias son: Ecocert y Cosmebio (ambas de Francia), BDIH (Alemania), Soil Association (UK), USDA (USA) y OFC (Australia). Otras certificaciones también conocidas son: Bioforum (Bélgica), ICEA (Italia), Demeter (Alemania). En la actualidad, estas asociaciones europeas están

trabajando para establecer unos estándares comunes en el proyecto COSMOS-standard. También han creado un sello standard llamado Natrue.

Los requisitos para certificación de un cosmético orgánico difieren de acuerdo a las certificadoras, la revisión de los más importantes son:

- ECOCERT (Francia)

Desde 2003, Ecocert impone los principios fundamentales del estándar Ecocert, que permiten garantizar un producto cosmético respetuoso con el medio ambiente. El sistema de referencia de Ecocert ha evolucionado en función de los avances científicos y de las modificaciones legislativas, pero siempre está basado en: la calidad, la legitimidad de los ingredientes, el respeto al medio ambiente y el respeto hacia el consumidor.

Ecocert certifica dos categorías de productos cosméticos:

1. Cosmético natural: Es el que reúne las siguientes condiciones:
Un mínimo del 95% del total de los ingredientes (incluyendo el agua) debe ser natural o de origen natural. Máximo el 5% restante pueden ser ingredientes de síntesis, que forman parte de una corta lista restrictiva que incluye algunos conservantes y sustancias auxiliares indispensables.
Mínimo el 5% del total de los ingredientes procede de agricultura orgánica, que representa como mínimo el 50% de los ingredientes vegetales.
2. Cosmético natural y orgánico: Debe estar libre de moléculas que se definen “no permitidas” como por ejemplo siliconas, parabenos, colorantes y perfumes sintéticos. Su producción debe guardar total respeto por la naturaleza y el medio ambiente. Deben estar libres de la experimentación con animales para probar su eficacia.
Además debe cumplir las siguientes exigencias: Mínimo el 95% del total de los ingredientes es natural o de origen

natural. Máximo el 5% restante pueden ser ingredientes de síntesis indispensables que forman parte de la lista restrictiva que consta en su norma de referencia. Mínimo del 10% del total de los ingredientes procede de agricultura orgánica, que representa como mínimo el 95% de los ingredientes vegetales (ECOCERT GROUP)

- COSMEBIO (Francia)

Esta certificación es sólo para marcas francesas. Los requisitos de la etiqueta BIO son:

El 95%, como mínimo, de los ingredientes deben ser de origen natural y haber sido transformados según procedimientos aprobados.

El 5% restante proceden de una lista muy restringida de ingredientes autorizados.

El 95%, como mínimo del total de los ingredientes vegetales deben ser ingredientes vegetales certificados BIO.

El 10%, como mínimo, de los ingredientes totales del producto acabado deben ser biológicos.

Asimismo, los productos certificados por Cosmebio no pueden contener ingredientes derivados de la petroquímica, ni materias primas animales, excepto la cera de abeja y la lanolina, tampoco contendrán aceites minerales (paraffinum), aceites sintéticos (siliconas), ni perfumes ni colorantes sintéticos. Además, limita el uso de tensioactivos de síntesis y el uso de conservantes sintéticos (parabenos, fenoxietanol) a una lista restrictiva de conservantes naturales, los productos no pueden ser ensayados sobre animales y los envases y embalajes deben ser biodegradables o reciclables (COSMEBIO, 2002).

- SOIL ASSOCIATION (Reino Unido)

Es una asociación sin ánimo de lucro que desde 1973 inspecciona y certifica granjas orgánicas, negocios y productos que cumplen sus estándares. Es el sello mayoritario en las islas britá-

nicas. Actualmente dedican su actividad a certificar, además de alimentos, productos cosméticos.

Para la certificación orgánica de Soil Association, un producto debe tener un 95% de composición orgánica.

Para la declaración “elaborado con X orgánico” debe tener un mínimo del 70% de su composición orgánica.

Además, debe tener un uso restringido de aditivos no orgánicos, que en ningún caso deben provenir de alteraciones genéticas. En su procesado debe respetar los niveles de ruido ecológicos. Este método excluye la utilización de aguas orgánicas para aumentar el porcentaje orgánico de su fórmula (Soil Association).

- BDIH (Alemania)

Creador de la primera certificación orgánica de “personal care”, sus requisitos son los siguientes:

Ingredientes autorizados a elegir entre una lista de 700 compuestos (entre ellos algunos conservantes de síntesis autorizados, que se deben indicar explícitamente en el embalaje).

No se impone un mínimo de productos biológicos, pero ciertos componentes deben proceder de la agricultura biológica.

Fabricados a partir de materias primas naturales (reino animal y vegetal).

Prioridad a los vegetales de cultivo biológico.

Pruebas sobre personas voluntarias o cultivos de células.

Prohíbe la petroquímica, colorantes, perfumes de síntesis, OMGs (Organismos Genéticamente Modificados), carne de ballena o colágeno animal y las pruebas en animales (BHID).

- USDA (USA)

La USDA regula el término “orgánico” que se aplica a los productos agrícolas a través de su Programa Nacional Orgánico (NOP). Si un producto cosmético contiene o está compuesto por ingredientes de origen orgánico debe ser certificado por un

agente de la USDA. Una vez certificado, puede optar a una de las cuatro categorías ecológicas en función de su contenido orgánico y otros factores:

100 por ciento orgánico: El producto debe contener (excluyendo agua y sal) sólo ingredientes producidos orgánicamente.

Orgánico: El producto debe contener por lo menos 95% de sus ingredientes de producción ecológica (excluyendo agua y sal). Los ingredientes restantes deben consistir en sustancias no agrícolas aprobadas en la Lista Nacional o de producciones agrícolas orgánicas.

Hecho con ingredientes orgánicos: El producto contiene al menos un 70% de ingredientes orgánicos y la etiqueta del producto puede incluir hasta tres de los ingredientes orgánicos en la etiqueta principal.

Menos del 70 por ciento de ingredientes orgánicos: El producto no puede utilizar el término “orgánico” en cualquier parte de la etiqueta principal. Sin embargo, pueden identificar los ingredientes que la USDA ha certificado como siendo producidos orgánicamente en la declaración de ingredientes en la etiqueta (USDA United States Department of Agriculture)

Regulación de los cosméticos naturales y orgánicos

A pesar de que no existe una normativa oficial para cosméticos orgánicos y naturales en cuanto a sustancias permitidas, relación entre los ingredientes de origen natural y orgánico dentro de una formulación cosmética, etc., existen organismos privados de certificación alrededor del mundo que han establecido sus propias normativas en pro de establecer parámetros para garantizar el origen de los mismos (Alcalde, 2010).

Los requerimientos que debe cumplir este tipo de cosméticos y los organismos que velan por su control varían según la región del mundo en la que se desee comercializar el producto, así:

América del Norte

En los Estados Unidos no existe una normativa específica para productos cosméticos orgánicos, por lo que las empresas cosméticas están utilizando los estándares establecidos para alimentación. Según el Programa Orgánico Nacional (NOP) del Departamento de Agricultura (USDA), el sello *USDA Organic* puede aparecer en ciertas condiciones en el etiquetado del producto, en concreto; cuando el 95% como mínimo de sus ingredientes procedan de agricultura ecológica. Si el porcentaje es inferior, la denominación *USDA Organic* no puede aparecer en el embalaje. Respecto al término “natural”, no está regulado por la FDA para productos cosméticos, por lo que cosméticos que se publicitan como “completamente naturales” o “derivados de plantas” pueden incluir otro tipo de ingredientes (De la Fuente, 2011).

Otra certificadora importante en América del Norte es la Fundación Nacional de Ciencia (NSF), la cual expide certificaciones para los productos que tienen menos contenido de materia orgánica, o para las empresas que no desean certificar sus productos bajo el sello del USDA. Este sello es una introducción relativamente reciente, desarrollado para proporcionar una distinción para los productos que contienen niveles más bajos de ingredientes orgánicos (Dubber - Smith, 2013).

Unión Europea

En la Unión Europea se dispone de una legislación muy clara que define y regula los alimentos “orgánico, ecológico y biológico” (alimentos producidos sin la utilización de productos químicos en todas las fases de su elaboración), su uso está regulado y protegido por Reglamentos Comunitarios 834/2007 y 889/2008; pero no ocurre lo mismo con los productos cosméticos. En la actualidad, no existe ninguna normativa europea oficial que

detalle los requisitos que deben cumplir los cosméticos orgánicos y naturales en cuanto a las sustancias permitidas y prohibidas, la proporción de ingredientes de origen natural y orgánico, las normas del etiquetado, etc. Ante la ausencia de legislación, los fabricantes de cosméticos y materias primas se someten a los criterios de empresas privadas de certificación, que garantizan el carácter natural y/u orgánico de los cosméticos y materias primas. Esto significa que los organismos certificadores sirven como aval o garantía al consumidor para diferenciar un producto supuestamente natural de un auténtico producto natural o de un auténtico producto orgánico. Cada organismo certificador tiene establecidos sus propios criterios de exigencia para los productos cosméticos y en consecuencia, algunos organismos tienen criterios más estrictos que otros. Un cosmético certificado muestra en su material de acondicionamiento el sello o logo del organismo certificador. Es posible obtener más de una certificación, y por tanto, varios sellos pueden aparecer en el mismo cosmético.

Los principales organismos certificadores europeos son: ECOCERT (marca registrada) de Francia, Federación de Industria y Comercio (BDIH, por sus siglas en alemán) de Alemania, Asociación de la Tierra (Soil Association) del Reino Unido y el Instituto para la Certificación Ética y Ambiental (ICEA) de Italia.

Se ha realizado un avance importante en el tema de los cosméticos orgánicos y naturales en Europa, ya que se han armonizado los criterios de los diferentes entes certificadores en cuanto a la certificación de estos productos, con el fin de evitar la confusión entre los consumidores y en la propia industria cosmética. Para ello, representantes de los principales organismos certificadores europeos, han creado un estándar europeo llamado COSMOS (marca registrada) con el fin de definir los requisitos y definiciones comunes para los cosméticos orgánicos y/o naturales.

Con esta norma bien establecida, el mercado europeo tiene un medio para asegurar la legitimidad de los productos que se

proclaman como orgánicos y naturales. A medida que más y más organismos de certificación están aplicando para convertirse en parte de la organización COSMOS, estas normas pueden ayudar a establecer una definición unificada y criterio para el etiquetado de productos cosméticos orgánicos y naturales (Pawel & Ross-Fichtner, 2014).

Una de las certificadoras con mayor renombre a nivel mundial es ECOCERT, empresa que ha categorizado a dos de las más importantes corrientes de Cosmética Natural, y que además avala y define a los productos como cosméticos naturales y cosméticos orgánicos.

El sistema de referencia para los cosméticos naturales y orgánicos de Ecocert, garantiza el respeto al medio ambiente en toda la cadena de fabricación del cosmético, incluida la distribución.

Ecocert es un organismo que desarrolla operaciones de control y certificación en 85 países del mundo. Ante la dificultad de los consumidores para diferenciar los verdaderos cosméticos naturales y orgánicos, ha elaborado un sistema de referencia propio con el que se han certificado más de 80 000 productos en todo el mundo.

El sistema de referencia para cosméticos naturales y orgánicos de Ecocert, implica un nivel de exigencia superior al de la reglamentación convencional de los productos cosméticos porque garantiza un verdadero respeto al medio ambiente en toda la cadena de fabricación del cosmético, incluida la distribución (ECOCERT, 2012).

Los elementos controlados por Ecocert son:

1.- El producto terminado: El origen de sus ingredientes, procedimientos utilizados, porcentajes mínimos de ingredientes de origen natural y orgánico, el compromiso de los proveedores sobre las materias primas entregadas, la verificación del embalaje utilizado y el control del etiquetado.

2.- El fabricante: Se realiza seguimiento al fabricante del producto cosmético certificado puesto que hay un control del

transporte y almacenamiento de las materias primas y de los productos terminados. Hay un estricto control a las Buenas Prácticas de Manufactura y normativa ambiental así como la evaluación del sistema de calidad para garantizar la trazabilidad del producto y de los controles internos que realice el fabricante.

Ecocert comprueba que se respetan las exigencias de su sistema de referencia a través de un inspector, el cual realiza dos auditorías al año al fabricante. Luego de la auditoría si el fabricante satisface los requerimientos del sistema de referencia de Ecocert, se le entrega una licencia relativa a la empresa autorizándolos a fabricar y/o distribuir los cosméticos certificados por Ecocert.

Latinoamérica

En Latinoamérica todavía no hay normas para la certificación de cosméticos orgánicos. El Instituto Biodinámica (IBD), una de las mayores certificadoras de América Latina con sede en Brasil, tiene su propia norma para el mercado de los países del Mercosur, que, según la certificadora, sigue las normas más avanzadas del exterior para cosméticos orgánicos. El fabricante que utilice mínimo el 95% de ingredientes orgánicos puede tener el sello IBD Orgánico y si contiene del 70 al 95%, el producto es certificado como EcoSocial. Quien utiliza menos que el 70% de ingredientes orgánicos, puede tener el sello “Ingredientes Naturales” y aún ser certificado con el sello “Integra” (Neves, 2010).

El mercado de cosméticos en el Ecuador

El aumento en los ingresos de los consumidores ecuatorianos, así como un cambio en sus estilos de vida, han provocado que los cosméticos dejen de ser bienes suntuarios y se hayan convertido en artículos básicos. Según datos de Euromonitor, la venta de cosméticos ascendió en 2012 a USD 1 014,9 millones, lo que representó un crecimiento promedio anual de 8,6% desde

el 2007. Las fragancias encabezan la lista de las principales categorías de cosméticos vendidos en Ecuador, con una participación de 21,6%, además fue la segunda de mayor crecimiento, con un 11,2% promedio anual entre 2007 y 2012. Productos para el cuidado de la piel, el cabello y maquillaje continúan en la lista de los más vendidos. Los productos para depilar, aunque son los que tienen una menor participación en el mercado, presentaron la tasa de crecimiento promedio anual más alta en el período analizado, casi 15%. Las categorías de productos para la piel, maquillaje y desodorantes, tuvieron una tasa de crecimiento promedio anual mayor a la del sector en total.

Aunque estos crecimientos ya están siendo aprovechados por grandes laboratorios en el caso de la industria farmacéutica e importantes transnacionales productoras de cosméticos, en ambos sectores, los empresarios ecuatorianos se encuentran en la búsqueda de productos diferenciados, sin descartar potenciales oportunidades en la venta de bienes convencionales, como es el caso de los medicamentos genéricos, nicho que sigue creciendo gracias a esfuerzos gubernamentales por promoverlos. En la búsqueda de productos diferenciados cobran un papel relevante aquellos naturales en cualquiera de las categorías medicamento natural o cosmético natural, ambos impulsados por tendencias guiadas por la salud y el bienestar que ofrecen y buscan aquellas sociedades que ganan sofisticación paralelamente a su nivel de ingresos.

Los productos naturales además tienen la particularidad de no estar sometidos al control de precios, lo que sin duda flexibiliza las oportunidades en el mercado y podría representar mayores ganancias (Calderón, 2014).

Formulaciones cosméticas

Tanto dentro de la Cosmética Convencional como en la categoría de Cosmética Natural, los productos se pueden presen-

tar en diferentes formas cosméticas. La clasificación presentada a continuación está basada el estado físico de las mismas.

- a. Soluciones: Son sistemas homogéneos, monofásicos, líquidos, por dispersión molecular de uno o más componentes en otro, llamándose al/los primeros soluto/s y al último solvente, lo que exige una cierta afinidad, dependiente de los caracteres de ambos.
- b. Geles : Son soluciones monofásicas sólidas que se distinguen de los sólidos y de los líquidos por su permanente rigidez elástica y su alto contenido de líquidos, hidrófilos o lipófilos, que les confiere un carácter blando, fácilmente deformable, pero no derramable, generalmente transparentes.
- c. Suspensiones: Son sistemas heterogéneos bifásicos, en los que una fase monofásica líquida o semilíquida externa, dispersa una fase interna sólida insoluble, cuyo reducido tamaño de partículas condiciona la eficacia cosmética.
- d. Emulsiones: Son sistemas heterogéneos de dos (simples) o más fases líquidas (múltiples), constituidas por una fase continua hidrófila o lipófila, y al menos una segunda fase dispersa en la primera bajo la forma de finísimas partículas, que se oponen y se rechazan entre sí, sin mezclarse en reposo, separándose por una intercapa lo más pequeña posible. Cuando se agitan se obtiene una mezcla inestable de gotitas (fase dispersa, discontinua o interna) en el seno de una fase continua (fase dispersante o externa) con la intercapa que tiende a reducirse progresivamente, lo que explica la inestabilidad del estado.
- e. Polvos: Son sólidos orgánicos o inorgánicos, reducidos a partículas minúsculas. Cuando los polvos se someten a presión pueden hacerse compactos, permitiendo una estructura permanente que facilita la utilización en localizaciones precisas y en cantidades determinadas.
- f. Pastas: Son formas bifásicas, semisólidas, formadas por un sistema monofásico líquido en el que se dispersa un sólido inso-

luble, es decir polvos, que suelen estar micronizados y según la cantidad puede ser pasta oleosa o acuosa (Olmos, 2005).

Estos seis tipos de formas cosméticas, se pueden reclasificar en tres categorías consideradas por (Martini, 2005), como: productos totalmente anhidros que representan el 20% del total de productos cosméticos presentes en el mercado, productos totalmente acuosos que representan un 20% del mercado y emulsiones o dispersiones que representan el 60% restante.

CAPÍTULO II

Determinación *in vitro* de actividad biológica de ingredientes naturales

Se había mencionado que las plantas en su medio tienen un poder de auto conservación, que les permite resistir a fuerzas naturales de desintegración, esta capacidad de la planta su relación con el ecosistema ha sido el argumento para su uso dentro de la medicina tradicional en diferentes patologías, y a la vez este uso ancestral ha despertado el interés de la ciencia para identificar las sustancias químicas y mecanismos responsables de llevar a cabo eficientemente este mecanismo natural.

Muchas plantas han sido consideradas como una alternativa interesante de compuestos antibacterianos, que no sólo puede reducir riesgos a la salud, sino por la diversidad de componentes, incluso otorgarle beneficios adicionales a un producto. Y aunque existen muchas investigaciones que prueban la capacidad antibacteriana *in vitro* de plantas, “los resultados no son directamente comparables debido a las diferencias metodológicas tales como: la elección de la planta, extracto (s), microorganismo (s) de prueba y métodos antimicrobianos” (Janssen, 1987).

Estudios de eficacia *in vitro*

Determinación de actividad antibacteriana

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes antimicrobianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, provocando que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Los problemas generales inherentes a los ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores (Vanden Berghe & Vlietinck, 1991), de allí la importancia de conocer algunos de los métodos existentes para la determinación de actividad biológica *in vitro*.

De los procedimientos conocidos, algunos han sido adaptados para evaluar la eficacia antibacteriana en compuestos vegetales. En el trabajo de Ramírez & Marín, 2009 se presentan algunas metodologías utilizadas, esta revisión presenta los criterios más relevantes que deberían considerarse para estandarizar los procesos en la evaluación de la actividad antibacteriana, criterios que también podrían permitir una selección adecuada de la metodología, considerando la naturaleza del activo a evaluar, si es extracto o aceite, las características de polaridad o no polaridad, e incluso los microorganismos de ensayo. La revisión de Ramírez & Marín menciona algunos métodos que podrían considerarse como una alternativa para la evaluación, entre ellos:

- Método de difusión en disco: el fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias ensayadas individualmente sobre las cepas bacterianas que tiene una cantidad específica de antimicrobiano. El disco es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo, el antimicrobiano difunde

desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición es medida y se relaciona con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) definida como la mínima concentración de activo que ejerce acción antibacteriana.

- Método de dilución: Se colocan diferentes concentraciones del agente antimicrobiano diluidas en caldo o en agar y se añade un inóculo conocido de la cepa bacteriana. En este caso la CMI hace referencia a la menor concentración de una dilución seriada de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de una bacteria, son interpretadas como: susceptible, intermedio o resistente. Esta interpretación se realiza una vez que se confirma el crecimiento en tubos, con las concentraciones presumiblemente más eficientes.
- Método de microdilución. Se utilizan placas que tienen 96 pocillos (12 mm x 8mm), en los que se coloca el mismo microorganismo, pero con diferentes características del antimicrobiano, 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. Las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, a 1, 3,5-trifenilformazán, o simplemente formazán, reacción redox que se evidencia con un cambio de color de amarillo a rojo, evidenciando de esta forma su actividad metabólica, el pozo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la CMI (Ramírez & Marín, 2009).
- Bioautografía: Es una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa

de cromatografía de capa fina TLC. El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que dé mejor separación y posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium (Colorado, Galeano, & Martínez, 2007).

A parte de los métodos descritos también se puede utilizar: análisis conductimétrico, que detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Ramírez & Marín, 2009), y sistemas automatizados, utilizando como método de detección la fluorimetría, turbidimetría y colorimetría, se han fabricado equipos que permiten detectar el desarrollo bacteriano en una suspensión, con y sin antimicrobianos, mediante la medida de turbidez que tenga la suspensión (García, 2009).

El método elegido en la mayoría de investigaciones, es el método de difusión en disco, considerando tanto las ventajas como las desventajas del método. Entre las ventajas se puede mencionar que sus resultados son altamente reproducibles (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach, & Thornsberry, 1979). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), de Estados Unidos. “El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre las cepas” (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966).

Una de las desventajas del método, constituye la composición del papel filtro Whatman que se utiliza en los discos de sensibilidad, estos están compuestos de celulosa (uniones β 1-4 de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica. Esto provoca que exista interferencia directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar. Los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar; por lo que es muy importante conocer exactamente cuál es la característica química del compuesto responsable de la actividad (Grant Burgess, Jordan, Migena Bregu, Mearns-Spragg, & Boyd, 1999). Siendo esta la razón de utilización de la técnica al menos cuando se trata de evaluar la eficiencia antibacteriana de aceites esenciales, su característica apolar.

Otra desventaja es que hay muchas variables que afectan el diámetro del halo de inhibición, entre ellas, las relacionadas con el agar Mueller- Hinton (espesor, pH, contenido de cationes timina y timidina). Los resultados también varían según el operador que haga la lectura del halo de inhibición siendo importante la necesidad de que estas pruebas sean realizadas por personas con un alto grado de experiencia en microbiología. Otras variables que afectan los resultados están relacionadas al método de análisis como: forma de hisopado, temperatura y tiempo de incubación, preparación del inóculo bacteriano entre otras (Clinical Laboratory Standards Institute, 2003).

Estudios realizados en el 2008, determinaron el efecto del pH en el diámetro del halo de inhibición, concluyendo que éste depende más del antimicrobiano ensayado que de la cepa estudiada. Un pH fuera del rango aceptable (7,2 a 7,4) altera el resultado dependiendo del antimicrobiano ensayado; en cambio el efecto del espesor del agar, afecta siempre independientemente

del agente antimicrobiano o la cepa analizada, generando un diámetro de halo de inhibición menor, mientras más espeso está el agar y un diámetro de halo de inhibición mayor, mientras menos espesor tenga el agar. (Riera, Chamorro, Zárate, Falcón, & Franco, 2008).

A pesar de estas desventajas, priman las ventajas del método, consciente que cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar, controlando las variables presentadas anteriormente, es posible obtener resultados confiables.

Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus (DC) STAPF), POACEAE en una formulación cosmética

- Antecedentes y justificación

El uso del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF) como una opción de agente antibacteriano natural que permita inhibir el crecimiento de *P. acnes*, principal bacteria causante del acné. El estudio se desarrolló *in vitro* mediante el método de difusión en medio sólido.

El aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) es rico en compuestos aromáticos con propiedades bactericidas. La principal acción del aceite esencial es sobre el aparato digestivo, por lo que puede aplicarse en casos de colitis, gastroenteritis y otras afecciones como la gastritis causada por la bacteria *Helicobacter pylori*, como se demuestra en un estudio realizado en Kyoto donde se inhibió totalmente el crecimiento de la bacteria mediante administración oral del aceite (Ohno, 2003).

Es también útil en afecciones de la piel como acné, pie de atleta, para desbloquear los poros y sarna, ya que en ensayos *in vitro* el aceite esencial inhibe el 80% de las cepas de dermatofitos como es el caso de *M. canis* (Kishore, 1993), mientras que, otros

ensayos demuestran actividad en algunas especies del genero *Aspergillus* (Mishra & Dubey, 1994).

El acné es un padecimiento inflamatorio habitual que está asociado con la proliferación anormal de las bacterias que conforman la flora normal del folículo sebáceo, se identifica por la aparición de comedones, pápulas, pústulas y quistes purulentos superficiales o profundos y en unos casos por presentar descamación e hiperpigmentación (Gómez & Molina, 2012).

El acné es la dermatosis más frecuente, pues afecta al 80-85% de la población mundial en algún momento de su vida. En la mayoría de los casos se inicia entre los 11 y 12 años. Las estadísticas señalan que un 40% de las mujeres entre 14 y 17 años y un 35% de los hombres entre 16 y 19 años son afectados por el acné (Gómez C., 2003).

En el 10% de los casos el acné persiste después de los 25 años, después de los 35 años es del 3% pero en estos pacientes otros factores como el hiperandrogenismo, precipitan la patología dermatológica. En la adultez, en algunas personas continúa apareciendo erupciones menores en el periodo premenstrual o en situaciones estresantes. Es más severo en varones que en mujeres (Coello, De la Torre, & Iglesias, 2012).

Esta patología cutánea se presenta en el rostro, frente, mejillas, espalda, y puede provocar baja autoestima, mayoritariamente en los adolescentes su bienestar e imagen corporal es crítica, por lo que debe tener un tratamiento adecuado para mejorar su aspecto, controlarlo y dar lugar a una mejor calidad de vida.

El acné es una patología cutánea, que puede controlarse con el correcto uso de las formulaciones cosméticas tanto para tratarlo como para prevenirlo, disminuirlo y mejorar el estado físico y psíquico del paciente.

Una formulación cosmética debe tener características muy concretas para que sea inocua y eficaz, debe ser libre de grasa, no comedogénica, no acnegénica, no irritante, no fotosensibilizante

y uno de los ingredientes importantes en ésta es la presencia de una sustancia con actividad antibacteriana; en este caso la incorporación de un activo natural con probada acción sobre algunos microorganismos el aceite de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) se prueba la eficiencia *in vitro* sobre uno de los patógenos responsable de la patología el *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*).

La resistencia de *P. acnes* a los antibióticos constituye un problema muy importante en el tratamiento del acné; por ello, se han realizado diversos estudios para esclarecer esta situación. Uno es la correlación entre la disminución de la población de *P. acnes* y la mejoría clínica y otro la falta de respuesta clínica a los antibióticos tópicos y orales, útiles en el tratamiento del acné, en especial la eritromicina. A comienzos de 1980, muy pocas cepas de *P. acnes* eran resistentes a los antibióticos utilizados contra el acné. En los últimos años se encontró un aumento considerable que llegó a un 60% en los pacientes tratados con eritromicina y clindamicina y a un 22% en los que usaron tetraciclinas. Para reducir esta resistencia debe limitarse el uso de antibióticos a períodos cortos; emplear terapias combinadas, en especial con peróxido de benzoilo y antibióticos tópicos (Kaminsky & Lago, 2004).

Expertos del Centro de Investigación sobre Fitoterapia (INFITO) y la Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ) afirman que las plantas medicinales pueden convertirse en una alternativa válida a los antibióticos sintéticos en infecciones producidas por bacterias o virus resistentes a los tratamientos tradicionales (Medicina Tradicional China, 2005).

Investigadores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Khon Kaen Thailand confirman el uso de siete aceites esenciales, entre ellos el aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* DC), con propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes. Este aceite posee actividad pronunciada frente a *P. acnes*, tiene muy buena actividad de eliminación de radicales libres e inhibe la enzima 5-lipoxigenasa, que

podría ser responsable de la formación de queloides mediante la supresión de la síntesis de colágeno de los fibroblastos. (Lertsattithanakorna, Taweechaisupapong, & Aromdee, 2006).

El aceite esencial de hierba luisa *Cymbopogon citratus* (DC), químicamente presentó entre un 70-80 % de citral, exhibió actividad antimicrobiana cuando se ensayó contra cuarenta y dos microorganismos (veinte bacterias, siete levaduras y quince hongos), las bacterias aisladas presentan una superior susceptibilidad en comparación con los hongos, y es muy eficaz contra los mosquitos *Anopheles culcifacies* y *Anopheles quinquefasciatus* (Negrelle & Gómez, 2007).

La investigación de Luangnarumitchai, presenta que diecinueve aceites esenciales pueden inhibir el crecimiento del *Pacnes* siendo el aceite esencial *Cymbopogon citratus* (DC), uno de mayor actividad antibacteriana con zona de inhibición de más de 20 mm, y que la concentración mínima inhibitoria MIC fue de 0,125 % v/v. Los aceites que contienen como componente principal el citral muestran actividad contra los microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Candida albicans* (Luangnarumitchai, Lamlerthon, & Tiyaboomchai, 2007).

Guerra en su investigación del Aceite esencial y Crema de *Cymbopogon citratus* (DC), utilizando el método de diluciones en medio líquido, frente a ocho bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 7001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10033, *Serratia sp.*, y *Salmonella typhimurium*; cuatro hongos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* y una levadura: *Candida albicans*, muestra el potencial antibacteriano del aceite y la crema con valores de CMI que oscilaron en un rango de 0,1 a 5,00 mg/mL. La acción resultó ser bactericida excepto para *S. aureus* para la cual fue bacteriostática y los microorganismos más sensibles fueron los Gram positivos. La crema produjo

daño letal sobre las especies bacterianas usadas y la especie más sensible fue *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. Para el caso de los hongos fue más sensible a las concentraciones del producto evaluado, particularmente *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Los valores de CMI oscilaron entre 0,04 y 2,50 mg/mL. La acción resultó ser fungicida, salvo para la levadura *C. albicans*, para la cual fue fungistática. Aunque la crema mostró menor actividad, se mantuvo la acción que sobre la célula microbiana ejerció el aceite esencial (Guerra, Rodríguez, & García, 2004).

En cada una de estas investigaciones se puede evidenciar la actividad antimicrobiana que resulta el fundamento para la incorporación del aceite esencial de hierba luisa en una formulación que puede ser eficaz frente a *P. acnes*, principal responsable de la patología dérmica acné.

Entre las ventajas de utilizar antibióticos naturales, se ha resaltado la probabilidad de no generar resistencia por parte de las bacterias, además de favorecer el proceso de regeneración epitelial, estimular los mecanismos naturales de eliminación, favorecer el funcionamiento de los órganos en general, inhibir el crecimiento de patógenos y aumentar las defensas del organismo (Cabrera, 2005).

Por esta razón, esta investigación tuvo como objetivo demostrar el poder antibacteriano del aceite esencial de hierba luisa, incorporado en una formulación cosmética básica (loción tópica) que permita demostrar la eficiencia del aceite *in vitro* en la patología cutánea, considerándola como una alternativa en el tratamiento de esta dermatosis y un excelente representante de la cosmética natural.

- Resultados y discusión

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que define la eficiencia antibacteriana del aceite esencial de Hierba Luisa contra *P. acnes* se utilizó el método de difusión en

agar, mencionado en este documento, que consiste en enfrentar a la bacteria en estudio en este caso *P. acnes* responsable de la patología dérmica acné, a diferentes concentraciones de aceite esencial, un rango amplio de concentraciones desde 0,02% concentración que resultaría muy eficiente en la aplicación de una fórmula hasta 5% máxima concentración permitida en formulaciones tópicas (5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05% y 0,02%), estas concentraciones fueron diluidas en Dimetilsulfoxido (DMSO).

Tabla 1.
Determinación *in vitro* de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*).

Concentración de aceite esencial (%)	Halos de inhibición (mm)			
	1	2	3	4
5	16.8	17.3	17.8	17.1
2	14.9	13.8	14.1	13.9
1	11.8	12.1	11.1	12.8
0.5	9.5	9.7	8.9	9.3
0.2	8.2	8.5	8.1	7.9
0.1	7.4	7.9	7.2	7.1
0.05	6.9	7.1	6.3	6.5
0.02	6.0	6.0	6.0	6.0
BP (Tetraciclina)	36.2	35.8	33.8	33.4
BN (Dimetilsulfóxido)	6.0	6.0	6.0	6.0

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Meza, & Vargas, Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (dc) stapf), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica, 2013)

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la CMI del aceite esencial de hierba luisa para *P. acnes*. Una vez que la bacteria fue sembrada en las ocho concentraciones preestablecidas de aceite esencial, se observó la existencia de inhibición en concentraciones de aceite esencial superiores a 0,02 %, por tanto la CMI, es la mínima concentración de aceite esencial que presentó halo de inhibición, es decir, 0,05 µg/ml.

Además, se puede evidenciar que el Blanco Positivo (Tetraciclina), posee una actividad antibacteriana notablemente alta con respecto al aceite esencial; su valor promedio de inhibición es de 34, 8 mm. En contraste con esto, el blanco negativo (disco vacío) muestra ausencia de inhibición.

- **Análisis estadístico de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hierba luisa *Cymbopogon citratus***

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la determinación *in vitro* de la CMI del aceite esencial se realizó mediante el Software Statistix 8.0. Los datos fueron analizados y se identificaron como normales, por lo tanto se utilizó la prueba estadística paramétrica Análisis de Varianza de una vía.

- **Análisis de varianza de una vía contrastando los halos de inhibición generados por las ocho concentraciones de aceite esencial**

Para este análisis se plantearon las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula: Las ocho concentraciones de aceite esencial de hierba luisa utilizadas en la determinación *in vitro* de la CMI, tienen promedios del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares.
- Hipótesis alternativa: Al menos una concentración de aceite esencial genera un promedio del diámetro del halo de inhibición diferente al de las otras concentraciones de aceite.
- Nivel de significancia (alfa): 0,05

Los resultados presentados por Statistix 8.0 concluyen que, al menos una de las concentraciones de aceite esencial está generando un halo de inhibición mucho más fuerte que los otros.

Para determinar cuál de las concentraciones de aceite esencial está generando tal halo de inhibición, se realizó una prueba a posteriori (Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test), la cual al comparar los promedios de todos los pares posibles de concentraciones de aceite esencial, permite discriminar cuál o cuáles grupos son diferentes entre sí.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2.
Análisis estadístico: Test de Tukey Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

TEST DE TUKEY		
CONCENTRACIÓN DE ACEITE ESENCIAL (Variable)	PROMEDIO DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	GRUPOS HOMOGÉNEOS
BP (Tetraciclina)	34,8	A
5%	17,25	B
2%	14,18	C
1%	11,95	D
0,50%	9,35	E
0,20%	8,18	EF
0,10%	7,4	FG
0,05%	6,7	G
0,02%	6,0	H
BN (DMS)	6,0	H

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Meza, & Vargas, Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (dc) stapf), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica, 2013)

Como se observa hay ocho grupos de concentraciones de aceite esencial estadísticamente afines entre sí, por tanto, también afines en su eficacia antibacteriana *in vitro* contra *P. acnes*.

- Sin duda, el Blanco Positivo (Tetraciclina) tiene mayor eficacia antibacteriana que el resto de sustancias.
- La concentración más eficaz de aceite esencial es al 5%, seguido de la concentración al 2% y al 1%.
- La concentración al 0,5% y al 0,2% tienen eficacias muy similares entre sí.
- Las concentraciones al 0,2% y 0,1% tienen eficacias muy similares entre sí.
- Las concentraciones al 0,1% y 0,05% tienen eficacias muy similares entre sí.
- La concentración de aceite al 0,02% y el Blanco Negativo (Disco vacío) tienen valores iguales entre sí, ya que no generaron inhibición.
- **Actividad antibacteriana de la loción cosmética elaborada con aceite esencial de hierba luisa *Cymbopogon citratus***

Tabla 3.

Actividad antibacteriana de la loción con Aceite Esencial (AE) de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

Indicadores	Halos de inhibición (mm)			
	1	2	3	4
BP: Aceite esencial 5%	17.0	15.4	14.8	15.5
BN: Loción sin aceite esencial	6.0	6.0	6.0	6.0
Loción formulada	16.2	13.8	14.1	15.2

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Meza, & Vargas, Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (dc) stapf), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica, 2013)

En la tabla 3, se muestran los resultados de los halos de inhibición (mm) que presentó la loción elaborada, el Blanco Positivo (BP: Aceite esencial al 5%) y el Blanco Negativo (BN: Loción sin aceite esencial). La loción y el Blanco Positivo presentan halos de inhibición similares, un valor promedio de 14,83 mm y 15,68 mm, respectivamente. En contraste, el Blanco Negativo no presenta ningún halo de inhibición, esto debido a que no posee ningún excipiente con actividad antibacteriana; lo que demuestra evidentemente que el aceite esencial de hierba luisa es la sustancia que inhibe el crecimiento de la bacteria.

- **Análisis estadístico de la actividad antibacteriana de la loción**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de la loción se realizó de la misma manera que con el aceite esencial, utilizando el Software Statistix 8.0. Los datos analizados demostraron ser normales y por tanto se utilizó la prueba Análisis de Varianza de una vía. Esta prueba fue realizada para determinar diferencias entre las medias de los halos de inhibición que presentan las siguientes muestras: Blanco positivo (aceite esencial 5%), Blanco negativo (Loción sin aceite esencial) y la Loción formulada. Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula: Las muestras utilizadas en la determinación de la actividad antibacteriana, tienen promedios del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares.
- Hipótesis alternativa: Al menos una de las muestras tiene un promedio del diámetro del halo de inhibición diferente al de la otra loción.
- Nivel de significancia (α): 0,05

Con estos resultados obtenidos por Statistix 8.0 se puede concluir que, al menos una muestra está generando un halo de inhibición mucho más fuerte que la otra.

Para determinar qué muestra está generando tal halo de inhibición, se realizó la prueba a posteriori (Tukey HSD All – Pairwise Comparisons Test), los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.
Análisis estadístico: Test de Tukey de la
loción con Aceite Esencial (AE) de hierba luisa
(*Cymbopogon citratus*)

TEST DE TUKEY		
CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL (Variable)	PROMEDIO DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	GRUPOS HOMOGÉNEOS
BP(5%de aceite esencial)	15,68	A
Loción con 5% de aceite esencial	14,83	A
BN (Loción sin aceite)	6,00	B

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Meza, & Vargas, Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (dc stapf), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica, 2013)

Existen dos grupos en los cuales sus promedios son similares; el primer grupo está conformado por el Blanco Positivo y la loción formulada, mientras que el segundo grupo de datos pertenece al Blanco negativo. Entonces, se concluye que:

1. La loción formulada y el Blanco Positivo (Aceite esencial al 5%) tienen eficacias antibacterianas *in vitro* contra *P.acnes*. muy similares entre sí.
2. El Blanco negativo (Loción elaborada sin aceite esencial) evidentemente refleja que no produjo inhibición.

- **Conclusión**

1. Al realizar la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hierba luisa contra *Propionibacterium*

acnes, utilizando concentraciones desde 0.02% a 5% de aceite se determinó que existe inhibición desde la concentración de 0.05% hasta la concentración del 5%. Por tanto, la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial es 0.05 ug/ml.

2. De acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante el análisis de varianza de una vía y test de Tukey, la concentración de aceite esencial que posee mayor eficacia antibacteriana es al 5%, pues presenta un halo de inhibición superior al de las demás concentraciones. Por tal motivo, sería la concentración ideal para una formulación cosmética, sin descartar porcentajes ligeramente menores como 3% o 4% que aunque con una actividad bacteriana reducida, podrían ofrecer mayor seguridad cutánea, es decir la concentración adecuada sólo podrá determinarse con estudios *in vivo*, partiendo desde un test de irritabilidad cutánea de la fórmula hasta un test de eficacia cosmética con un estudio de estabilidad de la fórmula.

Eficacia in vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (LAM.) Kostern. Ex O.C.Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry

- Antecedentes y justificación

Las caries, así como las infecciones de garganta, son de las enfermedades más comunes en el mundo. Los microorganismos presentes en la placa dental o placa bacteriana están íntimamente relacionados a estas patologías, siendo *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* los agentes etiológicos que causan la caries y las infecciones de garganta respectivamente; por lo cual, el control de estos microorganismos es de mucha importancia para evitar la enfermedad y en la actualidad se lo realiza mediante el uso de productos tópicos o locales (enjuagues bucales y colutorios)

que contienen sustancias antimicrobianas para eliminar la flora bacteriana de la placa dental. En los últimos años, el uso de las plantas como fuente de principios activos antimicrobianos es de gran interés para los investigadores puesto que las ventajas son diversas: fácil acceso, bajo costo y sobre todo, pocos efectos colaterales indeseables. La especie *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. Ex O.C.Schmidt, pertenece a la familia Lauraceae y es conocida en Ecuador con diferentes nombres: ishpink, ispingu, ishpingo o canelón. El hábitat natural de este árbol es el bosque húmedo tropical de la Amazonía ecuatoriana, crece entre los 310 y 1.250 msnm, destaca por ser endémico de este lugar. Por otro lado, la especie *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, pertenece a la familia Myrtaceae y es conocida con diferentes nombres vernáculos como: clavo de olor, árbol del clavo, clavo, claverero.

Existen investigaciones previas que demuestran el elevado poder antibacteriano de los aceites esenciales de las hojas de ishpingo y clavo de olor (Noriega & Dacarro, 2008).

- Resultados y discusión

La determinación *in-vitro* de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y de clavo de olor sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* se realizó mediante técnica de dilución en medio líquido, que contempla enfrentar a los microorganismos mencionados a diferentes concentraciones de los aceites. El procedimiento se realizó según la metodología general propuesta por el Manual de Microbiología de Gamazo (Gamazo, Díaz, & López, 2000).

Los resultados de la CMI del AE. *Ocotea quixos* y AE. *Syzygium aromaticum* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Se evidencian una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA (Brain and Heart Infusión Agar), realizándose diluciones desde el 100% de AE hasta 0,07%, de este ensayo con 20 diluciones, se conclu-

ye que el AE *Ocotea quixos* es más eficaz para *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 ya que logra una inhibición en concentraciones mayores de 0,097%, mientras que para *Streptococcus mutans* ATCC 25175 la concentración debería ser mayor a 0,13%, considerando el valor mayor a esta dilución como la concentración mínima que podría tener la formulación para que ejerza efecto sobre los dos patógenos, es decir se define la CMI del aceite del AE. *Ocotea quixos* frente *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en 0,26%.

De igual forma se identificó la CMI con el AE *Syzygium aromaticum* sobre *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se utilizó una serie de diluciones desde 100% hasta 0,07%. Una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA se observó crecimiento de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 en concentraciones del AE *Syzygium aromaticum* $\leq 0,78\%$, en el caso de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en concentraciones $\leq 0,13\%$. Con estos datos, se define como la CMI del AE *Syzygium aromaticum* frente a los dos patógenos la concentración mayor a la dilución en la que se observa el crecimiento en este caso la CMI es $\geq 0,78\%$, la dilución siguiente a este valor es 1,56%.

Tomando en cuenta la CMI de los aceites esenciales y habiendo establecido un prototipo de preferencia sensorial (enjuague bucal comercial), se procedió a formular el colutorio. Dentro de la fórmula se consideraron las materias primas más importantes: un tensioactivo o detergente (lauril éter sulfato de sodio), sustancias humectantes (sorbitol y glicerina), un saborizante (sabor menta), un edulcorante (sacarina sódica), y como componentes activos (AE *Syzygium aromaticum* y AE *Ocotea quixos*). Las concentraciones utilizadas de cada materia prima están dentro de los rangos sugeridos por la ficha técnica de cada ingrediente. Se elaboraron dos formulaciones, una con mayor y otra con menor contenido alcohólico con el objeto de evaluar si el alcohol ejerce algún efecto bactericida en la fórmula, la presentación de la fórmula es de 80 ml

Tabla 5.
Fórmula Unitaria Colutorio A

Ingrediente (INCI)	Porcentaje
Lauril éter sulfato de sodio	3,75
Glicerina	18,38
Sorbitol	5,63
Sabor Menta	4
Sacarina Sódica	0,04
Alcohol 96%	12,5
AE. <i>Ocotea quixos</i>	0,26
AE. <i>Syzygium aromaticum</i>	1,56
Agua	33,88

Fuente: La autora Tesis (Mosquera & Veloz, Eficacia *in-vitro* de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. ex OC Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry, 2011)

Tabla 6.
Fórmula Unitaria Colutorio B

Ingrediente (INCI)	Porcentaje
Lauril éter sulfato de sodio	3.75
Glicerina	18.38
Sorbitol	5.63
Sabor Menta	4
Sacarina sódica	0.04
Alcohol 96°	6.25
AE. <i>Ocotea quixos</i>	0.26
AE. <i>Syzygium aromaticum</i>	1.56
Agua	33.88

Fuente: La autora Tesis (Mosquera & Veloz, Eficacia *in-vitro* de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. ex OC Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry, 2011)

Los dos Colutorios elaborados se compararon con cuatro enjuagues bucales comerciales identificados como Muestras. C, D, E, F. Los resultados obtenidos indican que la Muestra C no es capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* ni de *S. pyogenes*, ya que no se observa ningún halo de inhibición. Estos datos concuerdan con la investigación realizada por Valentina Camejo y publicada en la revista Acta Odontológica Venezolana, Volumen 37, N° 2, Venezuela, 1999.

Tanto el Colutorio A como el B, presentan un halo de inhibición promedio de 7,06 mm frente a *S. mutans*. El Colutorio A muestra un halo de inhibición promedio de 7 mm frente a *S. pyogenes* mientras que el Colutorio B, para este mismo microorganismo muestra un halo de inhibición promedio de 7.02 mm. La Muestra D presenta un halo de inhibición promedio de 9,86 mm frente a *S. mutans*, y 10.88 mm frente a *S. pyogenes*. Estos halos, son superiores frente a los presentados por los Colutorios A y B; y la Muestra E presenta un halo de inhibición promedio de 6,3 mm frente a *S. mutans* y 6.36 mm frente a *S. pyogenes*. Los halos de inhibición de los Colutorios A y B son superiores a estos.

La Muestra F exhibe un halo de inhibición promedio de 6.2 mm frente a *S. mutans* y 20.68 mm frente a *S. pyogenes*. Los Colutorios A y B presentan un halo superior frente a *S. mutans* pero al mismo tiempo inferior para *S. pyogenes*.

El blanco negativo (Fórmula del Colutorio A sin A. E) no presenta ningún halo de inhibición lo que demuestra que efectivamente los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor son las sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos.

Tabla 7.
Actividad antibacteriana de Colutorios
determinada en Concentración
Mínima Inhibitoria (CMI)

Nº	Microorganismo	Diámetro del halo de inhibición (mm)						
		Muestra C	Muestra D	Muestra E	Muestra F	Colutorio A	Colutorio B	Blanco Negativo
1	S. mutans	6	10	6,3	6,2	7	7	6
2	S. mutans	6	9,7	6,4	6,3	7	7	6
3	S. mutans	6	10	6,3	6,2	7,2	7	6
4	S. mutans	6	10	6,3	6,2	7	7	6
5	S. mutans	6	9,6	6,2	6,1	7,1	7,3	6
	Promedio	6	9,66	6,3	6,2	7,06	7,06	6
1	S. pyogenes	6	11	6,4	21	7	7	6
2	S. pyogenes	6	11	6,4	19,6	7	7	6
3	S. pyogenes	6	10,4	6,3	20,8	7	7,1	6
4	S. pyogenes	6	11	6,3	21	7	7	6
5	S. pyogenes	6	11	6,4	21	7	7	6
	Promedio	6	10,88	6,36	20,86	7	7,02	6

Fuente: La autora Tesis (Mosquera & Veloz, Eficacia *in-vitro* de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. ex OC Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry, 2011)

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antibacteriana de los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales se realizó mediante el Software Statistix 8.0. Frecuentemente para este tipo de casos se realiza la prueba estadística paramétrica del Análisis de Varianza de una Vía sin embargo, esta prueba es útil siempre y cuando los

datos obtenidos sean normales. En esta investigación, los datos obtenidos no cumplen con esta premisa por tal razón, se procedió a realizar la prueba de Kruskal Wallis ya que reemplaza a la paramétrica Análisis de Varianza de una Vía.

La primera prueba de Kruskal Wallis contrarresta los diámetros del halo de inhibición generados por los enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans*. En esta prueba se plantea como hipótesis nula (H₀) que los seis enjuagues bucales utilizados en el estudio de la actividad antibacteriana tienen medianas del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares. Por otra parte, la hipótesis alternativa (H_a) será que el valor de la mediana del diámetro del halo de inhibición generado por al menos de uno de estos enjuagues bucales es diferente a los generados por los otros enjuagues. Se trabajó con un nivel de significancia (alfa) del 0.05. Los datos ingresados al programa Statistix 8.0 son los valores netos del diámetro inhibitorio es decir restando el valor del disco de prueba (6mm) y los resultados son los siguientes:

Tabla 8.
Análisis de Varianza No Paramétrico de una Vía de Kruskal-Wallis (Enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans*)

Enjuague bucal (Variable)	Mean Rank	Sample Size (Tamaño de la muestra)
Colutorio A	20.8	5
Colutorio B	20.2	5
MUESTRA C	3.0	5
MUESTRA D	28.0	5
MUESTRA E	12.2	5
MUESTRA F	8.8	5
Total	15.5	30

Fuente: La autora

Se halló un valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) de 27.61 y un valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) de 0.00 (cero) por tal razón, se concluye que al menos uno de los enjuagues bucales está generando un halo de inhibición mucho más fuerte que los otros frente a *Streptococcus mutans*

Para determinar cuál de los enjuagues está generando tal halo de inhibición se realizó una prueba extra de comparaciones entre las medianas de todos los pares posibles de enjuagues (Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test, Statistic 8.0), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 9.
Test Kruskal-Wallis All Pairwise
(Enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans*)

Enjuague bucal	Perteneciente o afín al grupo
MUESTRA D	A
Colutorio A	AB
Colutorio B	AB
MUESTRA E	ABC
MUESTRA F	BC
MUESTRA C	C

Fuente: La autora

Por tanto, hay tres grupos de enjuagues estadísticamente afines entre sí (por consiguiente también afines en su eficacia inhibitoria *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*) y son: grupo A: Muestra D, el Colutorio A, el Colutorio B y Muestra E; grupo B: El Colutorio A, el Colutorio B, Muestra E y Muestra F; grupo C: Muestra E, Muestra F y Muestra C.

En otras palabras, separándose, por tanto, nítidamente la eficacia de los siguientes enjuagues: se obtiene que entre Muestra D y Muestra F: el primero es absolutamente mejor que el segundo.

Entre Muestra D y Muestra C: el primero es absolutamente mejor. Mientras que entre el Colutorio A con Muestra C: el primero es mejor, y entre el Colutorio B con Muestra C: el primero es mejor.

El mismo análisis se realiza contrastando los diámetros del halo de inhibición generados por los enjuagues bucales frente a *Streptococcus pyogenes*. En esta prueba se plantea como hipótesis nula (H0) que los seis enjuagues bucales utilizados en el estudio de la actividad antibacteriana tienen medianas del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares. Por otra parte la hipótesis alternativa (Ha) será que el valor de la mediana del diámetro del halo de inhibición generado por al menos de uno de estos enjuagues bucales es diferente a los generados por los otros enjuagues. Se trabajó con un nivel de significancia (alfa) del 0.05. Los resultados emitidos por Statistix 8.0 son los siguientes:

Tabla 10.
Análisis de Varianza No Paramétrico de una
Vía de Kruskal-Wallis (Enjuagues bucales
frente a *Streptococcus pyogenes*)

Enjuague bucal (Variable)	Mean Rank	Sample Size (Tamaño de la muestra)
Colutorio A	15.0	5
Colutorio B	16.0	5
Muestra C	3.0	5
MUESTRA D	23.0	5
MUESTRA E	8.0	5
MUESTRA F	28.0	5
Total	15.5	30

Fuente: La autora

Se halló un valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) de 28.46 y un valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) de

0.00 (cero) por tal razón, se concluye que al menos uno de los enjuagues bucales está generando un halo de inhibición mucho más fuerte que los otros.

Para determinar cuál de los enjuagues está generando tal halo de inhibición, se realizó una prueba extra de comparaciones entre las medianas de todos los pares posibles de enjuagues (Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test, Statistic 8.0), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 11.
Test Kruskal-Wallis All Pairwise (Enjuagues bucales frente a *Streptococcus pyogenes*)

Enjuague bucal	Perteneciente o afin al grupo
MUESTRA F	A
MUESTRA D	AB
Colutorio B	ABC
Colutorio A	ABC
MUESTRA E	BC
MUESTRA C	C

Fuente: La autora

Por tanto, hay tres grupos de enjuagues estadísticamente afines entre sí (por consiguiente también afines en su eficacia inhibitoria *in vitro* frente a *Streptococcus pyogenes*) y son: grupo A: Muestra F, Muestra D, el Colutorio A y el Colutorio B; grupo B: Muestra D, el Colutorio B, el Colutorio A y Muestra E; grupo C: Colutorio B, Colutorio A, Muestra E y Muestra C.

En otras palabras, separándose, por tanto, nítidamente la eficacia de los siguientes enjuagues: se obtiene que entre Muestra F y Muestra E: el primero es absolutamente mejor que el segundo. Entre Muestra F y Muestra C: el primero es absolutamente

mejor. Mientras que entre Muestra D y Muestra C: el primero es mejor.

- Conclusiones

Tanto *Streptococcus mutans* como *Streptococcus pyogenes* mostraron susceptibilidad frente al colutorio elaborado con AE *Ocotea quixos* y AE *Syzygium aromaticum*. El colutorio elaborado es más eficaz que Muestra C y Muestra E en el control del crecimiento de *S. mutans* y *S. pyogenes*.

El enjuague bucal Muestra D es más eficiente que el colutorio elaborado en el control del crecimiento de *S. mutans* y *S. pyogenes*.

El enjuague bucal Muestra F es más eficiente que el colutorio elaborado en el control del crecimiento de *S. pyogenes* pero es menos eficiente en el control de *S. mutans*.

Determinación de actividad antifúngica

- Definición antifúngico

Antifúngico es una sustancia que elimina o detiene el crecimiento de hongos. Agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal, de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

- Pruebas de sensibilidad de antifúngicos

Las pruebas de sensibilidad tienen como objetivo conocer si los hongos patógenos ensayados son sensibles o resistentes a los antifúngicos. Los procedimientos de prueba *in vitro* con agentes antifúngicos son de diseño similar a los empleados con agentes antibacterianos, pero existen diferencias que hacen más difíciles

las pruebas con agentes antifúngicos, como por ejemplo: crecimiento lento, temperaturas específicas, tiempo de incubación y medio de cultivo, estas pruebas se hacen para obtener datos confiables que permitan elegir el agente más activo para usarlo en el tratamiento de infecciones humanas (Murray, Jorgensen, Landry, & Pfaller, 2007).

- Método de Barry

En este método, el medio de cultivo se mezcla con el inóculo, al solidificar las colonias crecen en diferentes niveles, los cuales servirán para contaje. Para ello, en el medio de cultivo previamente fundido (de 20 a 25 ml de medio a una temperatura de 45 a 50°C) en el tubo, se adicionará la cantidad de inóculo que oscila entre 0,1 a 0,4 ml y se homogenizará la muestra en el tubo mediante el vibrador. Una vez, constituida la muestra, se vierte ésta en la placa petri estéril y se dejará solidificar, la mezcla también se podría realizar en la misma placa petri, aunque la homogenización en este caso es más difícil. Esta técnica es utilizada, por ejemplo, para la determinación de CMI (concentración mínima inhibitoria) de un antibiótico frente a determinados microorganismos (García, Fernández, & Paredes, 1997).

- Método de Kirby-Bauer

La prueba de Kirby-Bauer, conocido como el método de difusión del disco, es la prueba de susceptibilidad a los antibióticos más utilizada en el tratamiento de una infección. Este método se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano medido en condiciones estándar. Para esta prueba, un medio de cultivo, específicamente el agar de Mueller-Hinton, se inocula uniformemente y de forma aséptica con el organismo de ensayo y después se coloca en el medio discos de papel impregnados con una concentración específica de un antibiótico particular. El organismo crece en la placa de agar mientras que el antibiótico

inhibe el crecimiento. Si el organismo es susceptible a un antibiótico específico, no habrá crecimiento alrededor del disco que contiene el antibiótico. Por lo tanto, se puede observar una “zona de inhibición” y se mide para determinar la susceptibilidad de un antibiótico para un microorganismo en particular. (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966).

- Método modificado de Kirby-Bauer

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (National for Clinical Laboratory Standards, 1998).

Evaluación de la actividad antifúngica in vitro del Marco (Ambrosia arborescens Mill.) y Matico (Aristeguietia glutinosa Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomycosis

- Antecedentes y justificación

Los hongos productores de micosis superficiales son oportunistas, siendo mayormente susceptibles los pacientes diabéticos, pacientes con SIDA, pacientes con cáncer o cualquier otra afec-

ción debilitante o crónica. A nivel mundial, se indica una prevalencia de 5% a 10% de micosis producida por *Cándida* en los servicios de dermatología, sin embargo existen otras afecciones también comunes como: tinea corporis y tinea capitis, con prevalencia de los siguientes hongos: *Microsporum canis* (9%), *Trichophyton mentagrophytes* (8,8%), *Trichophyton. rubrum* (8,6%). En nuestro país las infecciones dérmicas no es un tema tratado con todo el interés que este lo requiere, es así que dichas infecciones han proliferado rápidamente apareciendo entonces cuadros graves de dermatomycosis especialmente en pacientes diabéticos (Villares, 2012).

El medicamento más utilizado para este tipo de lesiones es Clotrimazol (compuesto derivado de la familia de los imidazoles) comúnmente usado para el tratamiento de infecciones por levaduras, candidiasis oral, y dermatofitosis (tiña); también se utiliza para tratar el pie de atleta y tinea corporis. Es un agente antifúngico de amplio espectro. *In vitro* el Clotrimazol exhibe actividad fungistática y fungicida contra especies aisladas de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum canis*. Entre los efectos secundarios del uso de este medicamento están: el eritema, picazón, ampollas, peladuras, edema, prurito, urticaria y en general irritación de la piel; sensación de quemadura, irritación, sequedad, picazón, foliculitis, erupciones acneiformes, hipopigmentación, dermatitis perioral, dermatitis de contacto alérgica, maceración de la piel, infección secundaria, atrofia de la piel, estrías y miliaria. No se recomienda su aplicación durante el embarazo, por lo que lo que se busca es dar una alternativa para evitar estas lesiones (Food Drug Administration FDA, 2011).

No se ha probado su efectividad y seguridad en niños menores de 12 años de edad (OMS, 1999).

Afortunadamente en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida

menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar nuestras afecciones, con un mayor interés por los productos naturales, orgánicos y ecológicos. Las propiedades antimicrobianas o antifúngicas de plantas medicinales pueden ser aprovechadas para tratar afecciones de la piel como tinea, pie de atleta, candidiasis, entre otras.

Ambrosia arborescens (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* (Matico) pertenecen a la familia de las Asteraceae, que se caracterizan por ser plantas aromáticas, con propiedades medicinales. Marco es una especie muy difundida entre los pobladores de nuestra región para mitigar dolores de cabeza y migraña, reumatismos, baños vaginales, fiebre, estreñimiento, desórdenes de próstata, fracturas y lesiones (Vera, 2008); dentro de la agricultura utilizada como control biológico de plagas, relacionado a la protección o defensa respecto ataques de microorganismo e insectos. Mientras que *Aristeguietia glutinosa* (Matico) es una especie nativa del callejón interandino y se encuentra solamente en el Ecuador, se le atribuye propiedades antiinflamatorias, expectorantes, antitusígena, cicatrizante, desinfectante, además es utilizada como emoliente y protector de la piel (Varela, 2011) .

Estas dos especies reportan varios estudios sobre su actividad, Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) es una planta medicinal andina más reconocida en el Ecuador, la etnofarmacia atribuye algunas propiedades como: las hojas se usan para propiciar la labor de parto y aliviar los dolores en el parto y postparto, se emplean en bebida, emplastos para aumentar el flujo menstrual, dolor de hígado, evitan la formación de lesiones internas producidas por golpes, llagas ulcerosas, verrugas, regular presión arterial y combate la formación de abscesos. La planta macerada se usa como: antimicótico, anestésico, para sarampión tratar granos, sarpullidos, caries, hemorroides y sarna, en Ecuador se le atribuyen efectos emenagogos, así como antisépticos y antiparasitarios intestinales. Es tóxico para otros microorganismos, razón por la

cual las hojas y ramas se usan como insecticidas, para eliminar principalmente pulgas, piojos, moscos y chinches, al ambiente la planta se aprovecha en sistemas agroforestales, como cerca viva (De la Torre, Navarrete, Muriel, Marcía, & Balslev, 2008).

Investigaciones *in vitro* demuestran la actividad antibacteriana del componente vegetal, estudios como el de Naranjo 2010, concluye que el Marco presenta acción bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y sobre *Candida albicans* y más hongos de tipo patógeno gracias a la presencia de flavonoides y fenoles y sus derivados mencionados anteriormente. La marcha fitoquímica y cromatográfica de extracto de *Ambrosia arborescens* fue evaluada por Alvarado, 2007 demostrando la presencia de antraquinonas, azúcares reductores, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, taninos, alcaloides, aminoácidos libres.

De igual forma, *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico), reporta algunos usos etnomédicos, se recomienda infusión de hojas para tratar afecciones renales, inflamaciones, heridas, fracturas, mal de orina, dolor de hígado, dolencias reumáticas, úlceras, golpes, dolor de estómago, lavados vaginales, diarreas.

Las hojas maceradas o en emplasto son usadas para tratar heridas de la piel, granos, sarna, como cicatrizante y desinfectante, contra la gonorrea (De la Torre, Navarrete, Muriel, Marcía, & Balslev, 2008) se le atribuye efecto antiséptico (Grupta, 1995).

Estudios realizados en el laboratorio, han confirmado la acción cicatrizante, antiinflamatoria, antiséptica del matico e inhibitoria de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y los hongos *Cryptococcus neoformans* (Buestan & Guaraca, 2013) . En ensayos *in vitro* se ha encontrado que la planta tiene actividad antibacteriana contra gram-positivos (Grupta, 1995). La investigación de Varela, 2011 sobre el fraccionamiento bioguiado de extracto hidro-etanólico de esta especie y la elución estructural de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*, demostró la presencia de diterpenos tipo copalanos; Yáñez y Velasteguí, en la Investi-

gación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extracto de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* determinan la presencia de actividad antimicrobiana a concentraciones de 5000 ppm (Yáñez & Velasteguí, 2014).

- Resultados y discusión

Se utilizaron para la evaluación cepas Microbiologics-KWIK-STIK™ *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231, se realizó una activación de las cepas liofilizadas y un cultivo posterior. En los tres primeros microorganismos se preparó una suspensión de esporas evaluando la concentración de las mismas con la cámara de recuento de Neubauer; el valor de siembra o inóculo para los tres microorganismos fue 10^6 UFC/ml. En el caso de *Candida albicans* ATCC 10231 la preparación del inóculo se realizó mediante el Método para la cuantificación del crecimiento de poblaciones microbianas en base a la masa celular por turbidimetría mediante un Espectrofotómetro UV marca Shimadzu modelo mini 1240, las condiciones referenciadas bibliográficamente determinan que la longitud de onda de 625 nm un valor de absorbancia de 0,08 a 0,11 es equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml para bacterias, y a una longitud de onda de 530 nm un valor de absorbancia de 0,13 a 0,16 es equivalente a $1-5 \times 10^6$ células para hongos y levaduras (Rosato, 2013).

Se realizaron siete diluciones sucesivas de extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco), en concentraciones de 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm y 700ppm (partes por millón) utilizando como diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO) líquido polar miscible y sin actividad antifúngica. Se realizaron 10 diluciones de Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico), en porcentajes de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%,

3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5% y 100% utilizando como diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO).

La siembra se realizó en placa por homogenización en masa para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*; se depositó 1 ml de inóculo del hongo y se añadió 19 ml de medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) fundido, temperado aproximadamente a 45°C y estéril. Se mezclaron ambos por rotación suave de las placas. De esta forma los microorganismos se distribuyeron de forma homogénea en el medio de cultivo permitiendo el crecimiento por todo el agar (Quiroz, 2012).

Una vez sembrados los inóculos se procedió a colocar los extractos naturales en las concentraciones indicadas siguiendo la metodología de Kirby-Bauer, método modificado por difusión en pozo de agar. Se realizaron los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se vertió 50 µl de concentraciones diferentes de extracto, concentraciones diferentes de aceite, blanco positivo (clotrimazol) y blanco negativo (Dimetilsulfóxido-DMSO). Las placas se incubaron de 2 a 5 días a 25°C para permitir el crecimiento fúngico confluyente. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se midieron los halos de inhibición con un calibrador o pie de rey (mm) considerado desde el punto de completa inhibición según se aprecie a simple vista. Se realizó la lectura por el reverso de la placa con un fondo negro con luz reflejada. La interpretación de la lectura está fundamentada en el método Kirby- Bauer, que relaciona la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana con el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar (Ramírez & Marín, 2009).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías y el Test de Tukey (HSD) con la utilización del Programa Statistix 10.0 General AOV/ AOCV y Programa Statistix 10.0 Tukey HSD All- Pairwise Comparisons Test

Tabla 12.
Promedio de diámetro de halos de inhibición del
extracto de marco (*Ambrosia arborescens*)

Concentración (ppm)	Diámetros de los halos de inhibición (mm)			
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Candida albicans</i>
100	13,7	13,5	17,5	11,2
200	14,7	22,0	19,4	11,1
300	22,5	24,9	28,2	10,8
400	25,9	27,6	29,1	10,9
500	26,9	29,7	40,1	11,3
600	30,8	32,9	43,5	13,1
700	32,1	35,6	40,6	10,4
Clz (+)	48,8	53,2	30,6	24,9
DMSO (-)	6,0	6,0	6,0	6,0

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Ayala, & Vásquez, Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y matico (*Aristeguetia glutinosa* Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, 2014)

En la tabla 12 se muestra el resultado de un promedio de tres determinaciones cuyo límite de desviación está entre el 95%. Los resultados evidencian actividad antifúngica en cada una de las concentraciones y el blanco positivo (Clz) empleadas sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Candida albicans*.

Tabla 13.
Promedios de diámetro de halos de inhibición del
aceite esencial de matico (*Aristeguietia glutinosa*)

Concentración (%)	Diámetros de los halos de inhibición (mm)			
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Candida albicans</i>
0,5	6,0	6,0	6,0	9,2
1	6,1	10,7	6,9	10,2
1,5	9,1	12,3	11,5	10,5
2	9,9	12,6	13,8	11,9
2,5	11,3	14,0	13,8	10,7
3	12,3	13,7	17,9	10,9
3,5	14,2	15,6	30,7	10,7
4	11,3	15,2	33,5	10,4
4,5	12,7	17,7	37,0	10,9
5	13,2	19,0	37,8	10,7
100	16,4	22,0	15,7	6,0
Clz (+)	49,9	52,0	37,5	24,5
DMSO (-)	6,0	6,0	6,0	6,0

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Ayala, & Vásquez, Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, 2014)

En la Tabla 13 se muestra el resultado de un promedio de tres determinaciones cuyo límite de desviación está entre el 95%. El resultado evidenció actividad antifúngica en cada una de las concentraciones y el blanco positivo (Clz) empleadas sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*.

El análisis estadístico ANOVA de dos factores dio como resultado un probabilístico de $p=0,0004$ que es menor al $\alpha(0,05)$ y el estadístico de la prueba F es de 8,23 mayor al Ft de 5,41 valores

que permiten aceptar la hipótesis alternativa, es decir, el AE de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.), presenta actividad antifúngica. Una vez aceptada la hipótesis alternativa se realizó el Test de Tukey a posteriori para demostrar si existe o no, una diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Tabla 14.
Test Tukey a posteriori (*Aristeguietia glutinosa*)

Concentración (%)	Promedio de halos (mm)	Perteneciente o a fin al grupo	Sample size
0,5	6,800	B	3
1	9,663	B	3
1,5	9,663	B	3
2	12,250	AB	3
2,5	12,250	AB	3
3	13,750	AB	3
3,5	13,750	AB	3
4	18,588	A	3
4,5	18,588	A	3
5	20,175	A	3
Cepas de estudio	Mean rank (promedio halos)	Perteneciente o a fin al grupo	Sample size
<i>Microsporum canis</i>	20,813	A	3
<i>Trichophyton rubrum</i>	13,603	B	3
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	10,533	B	3
<i>Candida albicans</i>	10,533	B	3

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Ayala, & Vásquez, Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, 2014)

El test evidenció la existencia de dos grupos: A y B. El grupo A conformado *Microsporum canis*, el grupo B conformado por *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

El promedio de inhibición más evidente se vio sobre *Microsporum canis* con un promedio de 20,81 mm.

El análisis estadístico ANOVA de dos factores dio como resultado un probabilístico de $p= 0,000$ que es menor al $\alpha (0,05)$ y el estadístico de la prueba F es de 24, 16 mayor al Ft de 4,76 de los valores de F valores que permiten aceptar la hipótesis alternativa, el extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.), presenta actividad antifúngica.

Una vez aceptada la hipótesis alternativa se realizó el Test de Tukey *a posteriori* para demostrar si existe o no una diferencia significativa entre los halos de inhibición

Tabla 15.
Test Tukey *a posteriori* (*Aristeguietia glutinosa*)

Concentración ppm	Mean rank (promedio halos)mm	Sample size (tamaño de la muestra)	Pertenciente o afin al grupo
700	29,675	3	A
600	30,075	3	A
500	27,000	3	AB
400	23,375	3	ABC
300	21,600	3	ABC
200	16,800	3	BC
100	13,975	3	C
Cepas de estudio	Mean rank (promedio halos)	Sample size (tamaño de la muestra)	Pertenciente o afin al grupo
<i>Microsporum canis</i>	31,200	3	A
<i>Trichophyton rubrum</i>	26,600	3	AB
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	23,800	3	B
<i>Candida albicans</i>	11,257	3	C

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Ayala, & Vásquez, Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del marco (*Ambrosia arborescens* Mill) y matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, 2014)

El test evidenció la existencia de tres grupos: A, B y C. El grupo A conformado por *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum*, el grupo B *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* y el grupo C conformado por *Candida albicans*. El promedio de inhibición más evidente se vio sobre *Microsporum canis* con un promedio de 31,20 mm.

- Conclusión

La evaluación de la actividad antifúngica del extracto *Ambrosia arborescens* demostró inhibición en los dermatofitos de estudio, en cada una de las concentraciones planteadas (100 a 700 ppm), la discriminación de datos del test de Tukey, posterior al Anova de una vía, demostró que las concentraciones más efectivas fueron a 700 ppm para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, y de 600 ppm para *Microsporum canis* y *Candida albicans*. El análisis estadístico Anova de dos vías probó que el extracto presentó una mayor homogeneidad a concentraciones de 300 y 400 ppm sobre los dermatofitos de estudio respecto a las otras concentraciones obteniéndose un promedio de halos de 23,37 mm.

La evaluación de la actividad antifúngica del AE de *Aristeguietia glutinosa* demostró inhibición en los dermatofitos de estudio, en cada una de las concentraciones planteadas (0,5 a 5%), la discriminación de datos del test de Tukey, posterior al Anova de una vía, demostró que las concentraciones más efectivas fueron a 5% para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, de 4,5 y 5% para *Microsporum canis* y de 2% para *Candida albicans*. El análisis de varianza Anova de dos vías probó que el AE posee mayor uniformidad de inhibición a 2; 2,5 y 3 % en relación a las demás concentraciones, por lo que se determinó un promedio de halos de 15,75 mm sobre los dermatofitos estudiados.

Evaluaciones *in vitro* en formulaciones cosméticas

Los tipos de pruebas que deben superar un producto cosmético, en función de su naturaleza y antes de ser comercializado, son:

- Estudios clínicos de tolerancia: Utilizados para el estudio de la compatibilidad cutánea del cosmético, de irritación o sensibilización, tanto en condiciones extremas o en condiciones normales, así como para valorar otros aspectos como la comedogenia, fotosensibilización, fotoirritación, etc. (PORTALFARMA, 2012).
- Perfil toxicológico de los ingredientes: Esto significa que los ingredientes se deben incorporar a la fórmula del producto cosmético en un nivel de concentración que presente un margen de seguridad adecuado (ANVISA, 2003).
- Estudios clínicos de eficacia: Tienen como objetivo evaluar la eficacia y seguridad de un producto cuando es administrado bajo una dosis y una indicación terapéutica determinada, bajo condiciones reales de campo. Dicha evaluación puede

realizarse a través de test *in vitro*, *in vivo* y técnicas no invasivas (Sabate, 2003).

- Estudios de complacencia/sensoriales: Para conocer la opinión del consumidor sobre el cosmético (PORTALFARMA, 2012).
- Con el fin de evaluar estos controles los test se podrían realizar de tres modos diferentes: con animales de experimentación, *in vitro* e *in vivo* con voluntarios humanos bajo control dermatológico u otro especialista en función del tipo de cosmético. Sin embargo, los productos cosméticos necesitan ensayos clínicos en humanos, para que las empresas puedan ofrecer a los consumidores el máximo de seguridad con el menor riesgo, garantizando las mejores condiciones de uso del producto (ANVISA, 2003).

Estudios de eficacia cosmética *in vivo*

Tras la valoración de la seguridad del producto cosmético, se puede proceder a la evaluación de sus propiedades cosméticas mediante estudios de su eficacia con ensayos en voluntarios humanos seleccionados según determinados criterios de inclusión. Se pueden diseñar protocolos experimentales específicos según la tipología de producto, sus propiedades y claims (un claim se define como la información pública de la naturaleza, las propiedades y estudios de eficacia de un producto (CDC de Bio Basic Europe S.r.l., 2002).

La eficacia se apoya en tres enfoques: sensorial, clínico e instrumental. La investigación de tipo instrumental, generalmente utiliza métodos no invasivos, que están destinados a la exploración de las propiedades de la piel y a medir de manera objetiva el efecto de un producto cosmético. Los métodos de exploración no invasivos (MENI), no afectan a la integridad de la piel y son reproducibles y fiables, se emplean para explorar las propiedades

de la piel mediante la medición de características como: pérdida de agua, secreción de sebo, flujo sanguíneo, entre otras características que permiten evaluar de manera objetiva el efecto de un cosmético (Del Cañizo, 2005).

Últimamente están aumentando los test clínicos que valoran la eficacia de los cosméticos empleando como “punto final” los resultados de dispositivos de bioingeniería, conocidos como MENI (Métodos de exploración no invasivos). Con el avance de la tecnología en bioingeniería, se han desarrollado varios métodos para medir de modo no invasivo las propiedades físicas y fisiológicas de la piel.

Las determinaciones van desde propiedades físicas cutáneas, como las propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas, ópticas y ultrasonográficas, hasta propiedades fisiológicas, como la pérdida transepidérmica de agua, sudoración, secreción de sebo y flujo sanguíneo.

La bioingeniería de la piel permite determinar entre otras muchas propiedades cutáneas la topografía de la superficie cutánea, la hidratación cutánea, la función barrera cutánea, el tiempo de recambio del estrato córneo, la presencia de paraqueratosis, los aminoácidos libres en el estrato córneo, imágenes ultrasonográficas de la piel o la microscopía confocal de la misma.

Con la determinación de estas propiedades se puede evaluar la utilidad de los cosméticos empleados.

Entre los numerosos MENI descritos para estudiar las diversas condiciones de la piel, se conocen los siguientes: visión directa o con lupa, epiluminiscencia directa o con lupa, réplicas, fotografías, digitalización de imagen, pHmetro, colorimetría, termografía, sonometría con ultrasonidos, resonancia magnética de imagen, flujometría, corneometría, sebometría, evaporimetría y elastometría (Olmos, 2005)

Algunas de las evaluaciones más comúnmente analizadas se describen a continuación

Capacidad antibacteriana

- Eficiencia antiacné

Se lo realiza mediante una cámara análoga no invasiva que debe estar conectada a una computadora con el hardware de uno de los siguientes dispositivos (vídeo digitalizador VD 300, Visiometer SV 600, Dual de Imágenes, el Analizador de belleza CM 2010 o Multidermacope. Esta cámara es utilizada para detectar lesiones de acné ya que determina porfirinas generadas por la bacteria *Propionibacterium acnes*, la cual promueve la inflamación de las lesiones de acné a través de la producción de mediadores inflamatorios, ácidos grasos libres y las porfirinas propiamente dichas. La presencia de porfirinas se puede demostrar por fluorescencia de naranja a rojo en las aberturas de los folículos mediante el examen de la piel con luz ultravioleta. Por último, es importante recalcar que la intensidad de la fluorescencia folicular y la medida de la participación de la cara son proporcionales a la densidad de población de *P. acnes* y el contenido de porfirinas en la superficie de la piel (CK electronic, 2012).

Este método puede revelar de modo prematuro lesiones invisibles, visualizar pequeñas lesiones, demostrar la eficacia de productos antibacterianos y fármacos contra *P. acnes* y determinar la actividad comedogénica y comedolítica de productos de aplicación tópica (Microcaya, 2012).

Evaluación de la actividad antibacteriana in vivo del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus (DC) STAPF), POACEAE

Una vez realizada la determinación de la actividad biológica del aceite esencial de hierba luisa explicada anteriormente, las formulaciones son sometidas primeramente a una prueba de Irritación Primaria Cutánea para garantizar la seguridad de uso de la loción en voluntarios.

a. Test de irritabilidad de las lociones formuladas

Las pruebas epicutáneas o “Patch test simple y único” constituyen un método sencillo y accesible para averiguar o confirmar la inocuidad de un producto en la piel (Salazar, 2006). Consiste en la aplicación oclusiva de un producto sobre una zona de la piel generalmente el brazo, durante 48 horas que permite verificar, en 10 a 20 sujetos, la buena compatibilidad cutánea después de una sola aplicación, seguida de un examen macroscópico realizado según una escala numérica establecida (Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007).

En la prueba se consideran algunos aspectos:

A. Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres de 19 a 25 años de edad.
- Fototipos de la piel de I a IV.
- Ausencia de cualquier enfermedad visible en la piel que pueda ser confundida con una reacción cutánea causada por el producto estudiado.
- Firma y entendimiento de la aceptación de la Carta de Consentimiento.
- Capacidad y confiabilidad para seguir las instrucciones impartidas (Bravo & Luque, 2010).

B. Criterio de exclusión

- Cualquier marca en la piel en el sitio de prueba que pueda interferir con la evaluación de posibles reacciones cutáneas (desórdenes de pigmentación, malformaciones vasculares, escaras, pilosidad aumentada, quemaduras solares).
- Dermatitis activa (local o diseminada) que pueda interferir con los resultados del estudio.
- Sujetos con trasplante de riñón, corazón o hígado.
- Embarazadas y madres lactantes.
- Panelistas con auto-reconocimiento de piel sensible.

- Personas que hayan usado esteroides tópicos o sistémicos y/o antihistamínicos por al menos 7 días antes del inicio del estudio o si se está aplicando cualquier medicamento en el sitio de aplicación del parche.
- Si presenta diabetes y está tomando insulina.
- Si presenta asma severa o algún tipo de alergia respiratoria que requiere de una terapia crónica o frecuente con administración de medicamentos.
- Planes de exposición intensa a la luz solar o a sesiones de bronceado durante el periodo de estudio.
- Planes de baño en el mar, ir a la piscina o al sauna durante el estudio.
- Cualquier otra condición que el investigador considere pueda comprometer la evaluación del estudio.
- Historia de falta de adherencia o falta de disposición para adherirse al protocolo del estudio (Bravo & Luque, 2010).

C Lectura

- Se evalúan los resultados de acuerdo a las siguientes escalas utilizadas por el Instituto Español de Experimentación clínica 2007.

Tabla 16.

Escala de evaluación de eritema para test de irritabilidad

Eritema	
Ausencia de eritema	0
Eritema muy ligero (apenas visible) en al menos las 3/4 partes de la zona de aplicación, o bien visible en una superficie inferior	1
Eritema bien visible, repartido de manera uniforme en al menos las 3/4 partes de la zona de aplicación	2
Eritema importante (rojo oscuro)	3
Eritema purpúrico	4

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 17.
Escala de evaluación de edema para test de irritabilidad

Edema	
Ausencia de edema	0
Edema muy ligero y palpable en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o bien visible en una superficie inferior	1
Edema ligero (contornos netos bien definidos) en al menos las 3/4 de la zona de aplicación	2
Edema importante (espesor de un mínimo de 1 mm) en una superficie más grande que la zona de aplicación	3

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 18.
Escala de evaluación de ampollas para test de irritabilidad

Pápulas/vesículas/ampollas/pústulas	
Ausencia de pápulas, vesículas, ampollas, pústulas	0
Pápulas, o pequeñas vesículas (menos de 1 mm aproximadamente de diámetro)	1
Vesículas de 1 a 2 mm de diámetro	2
Pústulas	3
Ampollas con líquido claro	4

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 19.
Escala de evaluación de descamación para test de irritabilidad

Sequedad/descamación	
Ausencia de sequedad y de descamación	0
Ligera sequedad = aspecto mate, en al menos las 3/4 de la zona de aplicación.	1
Sequedad neta = aspecto pulverulento en al menos las 3/4 de la zona de aplicación.	2
Descamación moderada = aspecto de escamas en al menos 3/4 de la zona de aplicación.	3
Descamación importante = presencia de escamas espesas en al menos las 3/4 de la zona de aplicación.	4

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 20.
Escala de evaluación de detergente para test de irritabilidad

Efecto detergente	
Ausencia de rugosidad	0
Rugosidad ligera = aspecto ligeramente arrugado sobre al menos 3/4 de la zona de aplicación.	1
Rugosidad neta = aspecto neto de arrugado sobre al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o muy arrugado (presencia de arrugas con crestas bien marcadas) sobre una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación.	2
Rugosidad moderada = aspecto muy arrugado sobre al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o presencia de arrugas profundas en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación.	3
Rugosidad importante = presencia de arrugas profundas en al menos las 3/4 de la zona de aplicación.	4

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 21.
Escala de evaluación de reflectividad para test de irritabilidad

Reflectividad	
Ausencia de reflectividad	0
Ligera reflectividad = aspecto ligeramente brillante en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o claramente brillante en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación	1
Reflectividad neta = aspecto brillante en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o aspecto barniz en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación	2
Reflectividad moderada = aspecto barniz en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o aspecto “helado” en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación	3
Reflectividad importante = aspecto helado, fuertemente reluciente, en al menos las 3/4 de la zona de aplicación	4

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Estos datos permiten evaluar el índice de Irritación Primaria Cutánea (I.P.C.), que es la media de la suma ponderada de las valoraciones obtenidas en el conjunto de (eritema “E”, del edema “O”, de la presencia de pápulas/vesículas/ampollas/ pústulas “P”, de la sequedad/descamación “S”, del efecto detergente “D” y de la reflectividad “R”):

$$I.P.C = \frac{1 \times \text{valoración } E + 2 \times \text{valoración } (O + P) + 0.5 \times \text{valoración } (S + D + R)}{\text{Número de panelistas}}$$

El índice de Irritación Primaria Cutánea (I.P.C.) permite clasificar al producto del modo siguiente:

Tabla 22.
Clasificación del Índice de Irritación
Primaria Cutánea

I.P.C	Aplicación
0	Muy bien tolerado
>0 y ≤0,5	Bien Tolerado
> 0,5	Mal tolerado

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

- Resultados

Después de la aplicación única de tres lociones con diferentes concentraciones de aceite esencial (3%, 4% y 5%) bajo parches oclusivos sobre la piel del antebrazo, durante 48 horas consecutivas en 50 voluntarios adultos, se procedió con la evaluación macroscópica de las siguientes reacciones: eritema (E), edema (O), reflectividad (R), pápulas/vesículas/ampollas/ pústulas (P), sequedad/descamación (S) y detergencia (D), cada una con su respectiva escala de evaluación. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 23.
Valores de los Índices de Irritación Primaria cutánea
de las lociones de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

Loción	I.P.C	Aplicación
A	0.49	Bien tolerado
B	0.46	Bien tolerado
C	0.47	Bien tolerado

b. Disminución del porcentaje de porfirinas generadas por *P. acnes*

Tabla 24.
Disminución del porcentaje de porfirinas generadas por *P. acnes* después de la aplicación de la loción

Disminución de porfirinas (N° / %)					
Voluntario N°	Evaluación Inicial (N° Porfirinas)	Evaluación a las 24h (N° Porfirinas)	Evaluación a los 7 días (N° Porfirinas)	Disminución de Porfirinas	Porcentaje de Disminución
1	7	5	2	5	71,4
2	8	3	1	7	87,5
3	4	2	0	4	100,0
4	5	2	0	4	80,0
5	4	0	0	4	100,0
6	1	0	0	1	100,0
7	10	3	3	7	70,0
8	12	7	3	9	75,0
9	4	7	3	9	75,0
10	1	0	0	1	100,0
11	1	0	0	1	100,0
12	1	0	0	1	100,0
13	20	0	0	20	100,0
14	15	0	0	15	100,0
15	1	1	0	1	100,0
16	1	1	0	1	100,0
17	2	0	0	2	100,0
18	14	10	4	10	71,4
19	9	7	5	4	44,4
20	3	0	0	3	100,0

Fuente: La autora Tesis (Mosquera, Meza, & Vargas, Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (dc) stapf), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica, 2013)

Tras la aplicación puntual de la loción con una concentración de 5% de aceite esencial de Hierba Luisa en las lesiones de acné en una zona específica de la cara (frente) durante 7 días consecutivos, se cuantificó la cantidad de porfirinas al inicio, 24 horas después y al final del estudio en voluntarios adolescentes con la ayuda del equipo Visiopor PP34N®. En la Tabla 27 se observa una notable disminución de porfirinas desde la primera aplicación de la loción formulada, teniendo como máximo porcentaje de disminución el 100%, un mínimo de 44,4%. Estos datos revelan la efectividad antibacteriana de la misma contra de *P. acnes*.

Capacidad antioxidante

Este tipo de determinación emplea el Cutometer MPA 580® (Courage & Khazaka), Alemania, un equipo que permite visualizar las modificaciones en la elasticidad y firmeza cutánea.

Las evaluaciones se realizan en función del siguiente protocolo:

Atributos a analizar:

En la evaluación clínica se analizan los siguientes atributos:

- Luminosidad: Resultado de la evaluación del tono o color de la piel y la forma como se reflejan los rayos luminosos sobre la superficie de la piel (tono y resplandor).
- Suavidad: Piel lisa y agradable al tacto.

En la evaluación instrumental se analizan los siguientes atributos:

- Firmeza de la piel: Estabilidad en el mantenimiento de sus características que le permiten mantener su resistencia y estructura.
- Elasticidad de la piel: Parámetro viscoelástico que varía en gran medida a lo largo del proceso del envejecimiento o por el efecto de diversas dolencias cutáneas.

Evaluación in vivo de la actividad cosmética de una crema elaborada con aceite de Plukenetia volubilis (sacha inchi)

- Antecedente

Utilizando como fundamento científico investigaciones anteriores que demuestran la actividad antioxidante del aceite de *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi), se realizó una crema de aplicación cosmética, emulsión básica, evitando que el uso de demasiados ingredientes puedan interferir en lo que se considera activo dentro de la formulación cosmética (aceite con potencial antioxidante).

La muestra fue evaluada en un estudio *in vivo* no invasivo, utilizando como muestra 30 mujeres que presentaban cierto grado de fotoenvejecimiento; se realizó una evaluación clínica dermatológica y una evaluación instrumental utilizando el Cutometer MPA 580, equipo que permite visualizar las modificaciones en la elasticidad y firmeza cutánea; se evaluó al inicio (tiempo= 0 días) y luego de cuatro semanas de utilizar el producto (tiempo= 28 días), los datos fueron sometidos a análisis de varianza.

- Resultados y discusión

- Evaluación clínica

Se realizó una evaluación clínica dermatológica del estado de la piel del rostro de las voluntarias en la condición inicial, es decir, antes del inicio del tratamiento y luego de 28 días.

En la evaluación clínica realizada antes de comenzar el tratamiento, la dermatóloga evaluó los siguientes atributos de la piel del rostro de las voluntarias: luminosidad y suavidad.

Los atributos se evaluaron utilizando una escala estructurada de 5 puntos denominada Impresión General del Paciente (PGI). En la escala utilizada los puntajes corresponden a las

siguientes descripciones: 1 - ausente, 2 – leve, 3 – moderada, 4 – severa y 5 - extrema.

En la Tabla 25 se presenta la distribución de puntajes otorgados por la dermatóloga a los atributos evaluados en la piel del rostro de las voluntarias antes del comienzo del tratamiento con la crema TM001, considerando que la luminosidad de la piel del rostro en todas las voluntarias era leve, calificándola con el puntaje 2.

Por su parte, la dermatóloga consideró que en la condición inicial el 80% de las voluntarias presentó una suavidad de la piel de su rostro leve (puntaje 2), el 13% una suavidad moderada (puntaje 3), mientras que para el restante 7% la suavidad fue calificada con el mínimo puntaje de la escala, descrito como ausente. El puntaje promedio de este atributo fue cercano al puntaje 2, correspondiente a la descripción leve.

Considerando los resultados anteriores puede afirmarse que antes de comenzar el tratamiento con la crema TM001, la piel del rostro de la mayoría de las voluntarias se caracterizó por presentar una luminosidad y suavidad leves.

Tabla 25.
Evaluación dermatológica antes del tratamiento con la crema de *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi)

Atributo	Puntaje					Promedio
	1	2	3	4	5	
Luminosidad	0%	100%	0%	0%	0%	2,0
Suavidad	7%	80%	13%	0%	0%	2.1

Fuente: Informe CLAIM 2011

Luego de 28 días de tratamiento, la dermatóloga evaluó cambios en estado de la piel del rostro de las voluntarias respecto al estado inicial. En esta instancia, la dermatóloga evaluó los siguientes atributos: Mejoría en la luminosidad y Mejoría en la suavidad.

Para la evaluación de estos atributos se utilizó la Escala de Mejoramiento Estético Global – GAIS (Global Aesthetic Improvement Scale). Esta escala corresponde a una escala nominal de 5 puntos (0-4) con la siguiente descripción: 4= Totalmente mejorado, 3= Muy mejorado, 2= Mejorado, 1= Sin cambios, 0= Peor.

Utilizando dicha escala se considera que un atributo mejoró respecto al comienzo del tratamiento si el puntaje otorgado por la dermatóloga es mayor o igual a 2. Sobre los datos obtenidos se aplicó el test del signo para determinar si las mejorías identificadas por la dermatóloga luego de 28 días de tratamiento, fueron significativas respecto a la evaluación realizada en la condición inicial para cada uno de los atributos evaluados.

En la Tabla 26 se presenta la distribución de puntajes asignados por la dermatóloga a la mejoría de los dos atributos de la piel del rostro de las voluntarias evaluados luego de 28 días de tratamiento con la crema elaborada con aceite de *sacha inchi*.

Para un nivel de confianza del 99,9% puede concluirse que luego de 28 días de tratamiento con la crema se registró una mejoría significativa en los dos atributos evaluados. En esta instancia de evaluación, todas las voluntarias experimentaron mejoría en la luminosidad y suavidad de la piel de su rostro (Tabla 26).

Como se observa en la Tabla 26, luego de 28 días de tratamiento la mejoría en la luminosidad de la piel del rostro del 60% de las voluntarias fue calificada por la dermatóloga con el máximo puntaje de la escala (4), descrito como totalmente mejorado y correspondiente a un resultado cosmético óptimo. Mientras tanto, la mejoría del restante 40% fue calificada con el puntaje 3, descrito como muy mejorado y correspondiente a una mejoría marcada respecto a la condición inicial.

Tabla 26.
Evaluación dermatológica luego de 28 días
del tratamiento con la crema de *Plukenetia volubilis*
(Sacha inchi)

Atributo	Puntaje					Porcentaje de voluntarias con mejoría	Promedio
	0	1	2	3	4		
LUMINOSIDAD	0%	0%	0%	40%	60%	100 %	3,6
SUAVIDAD	0%	0%	0%	67%	33%	100 %	3,3

Fuente: Informe CLAIM 2011

En lo que respecta a la mejoría de la suavidad de la piel del rostro de las voluntarias, luego de 28 días de tratamiento con la crema, la dermatóloga consideró que ésta correspondía mayoritariamente a una mejoría marcada respecto a la condición inicial. Como se muestra en la Tabla 29, la dermatóloga consideró que la mejoría de la suavidad de la piel del rostro del 67% correspondía a una mejoría marcada respecto a la condición inicial (puntaje 3), mientras que para el restante 33% la mejoría fue calificada como correspondiente a un resultado cosmético óptimo (puntaje 4).

Estos resultados permiten concluir que luego de 28 días de tratamiento la crema elaborada con Aceite de Sacha Inchi, provocó una mejoría significativa de la luminosidad y suavidad de la piel del rostro de las voluntarias. La mejoría en la luminosidad fue calificada mayoritariamente como correspondiente a un resultado cosmético óptimo, mientras que la mejoría en la suavidad fue calificada mayoritariamente como marcada respecto a la condición inicial.

Evaluación instrumental

Se realizaron medidas instrumentales con un cutometer en la piel del antebrazo de las voluntarias al inicio del tratamiento y luego de 28 días de tratamiento con la crema.

Se realizó una caracterización de la firmeza y la elasticidad de la piel a través de los parámetros R0, R2 y R5. El parámetro R0 mide la firmeza de la piel, mientras que los parámetros R2 y R5 miden la elasticidad de la piel. Para evaluar la influencia del tratamiento en estos parámetros, se realizó un análisis de varianza sobre los datos obtenidos, considerando tiempo y voluntaria como factores de variación.

Como se observa en la Tabla 30, en la evaluación realizada luego de 28 días de tratamiento se registró una disminución significativa en el parámetro R0 y un aumento significativo en los parámetros R2 y R5. Estos resultados indican que luego de 28 días de tratamiento la crema provocó un aumento significativo de la firmeza y de la elasticidad de la piel de las voluntarias.

Como se muestra en la Tabla 31, luego de 28 días de tratamiento la disminución promedio en el parámetro R0 alcanzó un 29,8% respecto a la condición inicial, lo que corresponde a un aumento en la firmeza de la piel.

Mientras tanto, luego de 28 días de tratamiento los parámetros R2 y R5 aumentaron significativamente un 20,4% y 22,0% respecto a la condición inicial, correspondiendo a un aumento de la elasticidad de la piel.

Tabla 27.

Evaluación instrumental (Cutometer) en voluntarias tratadas con crema de *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi)

Parámetro	Instancia de evaluación	
	Inicial	28 días después
R0 ***	0,29b	0.20a
R2 ***	0.75a	0.91b
R5 *	0.78a	0.96b

Fuente: Informe CLAIM 2011

Parámetros indicados con *** corresponden a aquellos en los cuales el tratamiento ocasionó cambios significativos para un nivel de confianza del 99,9%. Parámetros indicados con * corresponden a aquellos en los cuales el tratamiento ocasionó cambios significativos para un nivel de confianza del 95%.

Valores promedio para un parámetro con letras diferentes corresponden a valores que son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

En la Tabla 28 se presenta el porcentaje de voluntarias que presentó mejoría con respecto a la evaluación inicial en cada uno de los tres atributos evaluados con el cutometer, luego de 28 días de tratamiento con la crema TM001. Se considera mejoría una disminución en el parámetro R0 y un aumento en los parámetros R2 y R5, lo que corresponde con un aumento de firmeza y elasticidad de la piel de las voluntarias respecto al comienzo del tratamiento.

Como se observa, todas las voluntarias experimentaron mejoría en el parámetro R0, es decir que luego de 28 días de tratamiento con la crema, todas las voluntarias experimentaron un aumento en la firmeza de su piel.

En lo que respecta a los parámetros R2 y R5, luego de 28 días el porcentaje de voluntarias que experimentó mejoría luego de 28 días de tratamiento fue de 93% y 80% respectivamente. Esto indica que luego de 28 días de tratamiento con la crema, la gran mayoría de las voluntarias experimentaron un aumento en la elasticidad de su piel.

Tabla 28.
**Mejoría promedio del tratamiento con
crema de *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi)**

Instancia de evaluación	Mejoría promedio	Porcentaje de voluntarias con mejoría (%)
R0	29,8 %	100 %
R2	20,4 %	93 %
R5	22,0 %	80 %

Fuente: Informe CLAIM 2011

Estos resultados permiten concluir que luego de 28 días de tratamiento la crema elaborada con aceite de Sacha Inchi, logró aumentar significativamente la firmeza y elasticidad de la piel de las voluntarias.

Bibliografía

- Alcalde, T. (2010). Cosmética natural y ecológica regulación y clasificación. *El Portal de la industria Estética*.
- Alzamora, L. (2001). Medicina Tradicional en el Perú Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 62, 156-161.
- ANVISA (2003). *Guía para evaluación de seguridad de productos cosméticos*. Brasilia.
- Barry, L., Amsterdam, D., Coyle, M., Gerlach, C., & Thornsberry, H. (1979). Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *Journal Clinical and Microbiology*, 910.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4).
- BHID (s.f). *Certified Natural Cosmetics*. Obtenido de BHID: http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/e/natural_cosmetics.htm
- Bravo, C., & Luque, J. (2010). Estudio clínico doble ciego controlado para determinar la capacidad potencial de producir irritación primaria o acumulativa y/o sensibilización alérgica por contacto de una crema reductora de estrías (*BEL-0300509*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Buestan, A., & Guaraca, A. (2013). “Actividad anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el Austro ecuatoriano en el modelo de Danio rerio”. Tesis de Bioquímico Farmacéutico Universidad de Cuenca. Cuenca, Azogues, Ecuador.
- Cabrera, Y. (2005). Antibióticos naturales mito o realidad. *Revista Cubana de Medicina General*, 3.
- Calderón, J.C. (2014). Oportunidades para productos farmacéuticos y cosméticos en Ecuador. *PROCOMER*.
- CDC de Bio Basic Europe S.r.l. (2002). *Bio Basic Europe*. Recuperado el 15 de Marzo de 2013, de http://www.biobasiceurope.it/es/studi-efficacia-vivo.asp#PATCH_TEST
- Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (2008). *Aplicaciones de los aceites esenciales y compuestos naturales en productos cosmecéuticos para el cuidado de la piel*. Bogotá: Colciencias.

- China, E. d. (31 de Octubre de 2012). *Embajada del Ecuador en la República de China*. Recuperado el 21 de Abril de 2014, de www.ecuadorencina.org/ec/ecuador/clima-flora-y-fauna
- Chiriboga, X. (2010). *Validación de plantas medicinales del Ecuador*. Quito: Abya-Yala.
- CK electronic (2012). *Courage + Khazaka electronic GmbH*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2013, de Visiopor® PP 34 N: <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/dermatology/257-visiopor-2>
- Clark, James H. & Summerton, Louise (2010). Tornando verde la química del cuidado personal. *Cosméticos & Toiletries Latinoamérica*, 26-29.
- Clinical Laboratory Standards Insitute (2003). *Performance Standards for Antimicrobial Disc*. Pennsylvania: NCCLS document M2 - A8.
- Coello, A., De la Torre, D., & Iglesias, P. (2012). Transtornos adaptativos en pacientes con acné en consulta externa de dermatología del Hospital Vicente Corral Moscoso Cuenca Año 2011. Tesis. Universidad de Cuenca. Facultad de Medicina. Cuenca-Ecuador.
- Colorado, J., Galeano, E., & Martínez, A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra la Escherichia coli. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, ISSN 0121-4004 Volumen 14 número1*, 67-71.
- COSMEBIO (2002). *Reglementation*. Obtenido de COSMEBIO: <http://www.cosmebio.org/en/reglementation-professionnels.php>
- De la Fuente, S. (2011). *Estudio de Mercado de Cosmética Natural y Aromaterapia en Estados Unidos*. Madrid - España: Cámara de Comercio de Madrid.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Marcía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del ecuador*. Quito: Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad del Ecuador.
- Del Cañizo, C. (2005). La evaluación de la actividad de los cosméticos. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 33(3), 135-141.
- Dubber-Smith, D. (2013). Labelling for Legitimacy: Certifications for Natural and Organic Personal Care. *Cosmetics & Toiletries*.
- ECOCERT (Mayo de 2012). *Ecocert*. Recuperado el 18 de Marzo de 2015, de Norma Ecocert Cosméticos Naturales y Ecológicos: <http://www.ecocert.com/sites/default/files/u3/Norma-Ecocert.pdf>
- ECOCERT GROUP (s.f.). *Cosméticos naturales y ecológicos*. Obtenido de Ecocert: <http://www.ecocert.org/es/cosméticos-naturales-y-ecológicos>

- ECOCERT GROUPE (s.f.). *Cosméticos Naturales y Ecológicos*. Recuperado el 20 de 03 de 2014, de Ecocert Group: <http://www.ecocert.org/es/cosmeticos-naturales-y-ecologicos>
- EQUINLAB S.R.L. (2008). *La importancia de la aw – Actividad del Agua*. Capital Federal - Argentina: EQUINLAB.
- Food Drug Administration FDA (2011). *Clotrimazole official FDA informatio, side effects and uses*. Sellersville.
- Franquilino, E. (2011). Universo de lujo. *Cosméticos & Tecnología Latinoamérica*, 7-10.
- Gamazo, C., Díaz, R., & López, I. (2000). *Manual Práctico de Microbiología*. Barcelona: Masson.
- García, A.J. (2009). Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- García, P. (2002). Ventajas y problemas de los métodos automatizados. *Rev Chil Infect (Supl. 2)*, 96-100.
- García, P., Fernández, M., & Paredes, F. (1997). *Microbiología clínica aplicada*. Díaz de Santos S.A.
- Gómez, C. (2003). *El acné y su tratamiento*. Costa Rica: CIMED Centro de Información de Medicamentos.
- Gómez, G., & Molina, W. (2012). Tratamiento del acné. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXIX*, 91-97.
- Grant Burgess, J., Jordan, E., Migena Bregu, Mearns-Spragg, A., & Boyd, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Progress en Industrial Microbiology*, 27.
- Grupta, M. (1995). *270 Plantas medicinales iberoamericanas*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- _____ (2006). Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador, Perú. *United Nations Industrial Development Organization*.
- Guerra, M., Rodríguez, M., & García, G. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Rev Cubana Plant Med*, 9, 1-6.
- Hermida (2011). *The Whole Body at Whole foods market Europe*. Brighton: Natural Beauty.
- Instituto Español de Experimentación Clínica (2007). *Estudio de compatibilidad: Patch test simple y único*. Barcelona.
- International Organization for Standardization (2012). *ISO 11930:2012*.

- Jaliman, D. (2014). www.webmd.com/skink-problems-and-treatments/teem-acne-13/10-tips-for-preventing-pimples?page=2. Recuperado el 4 de Mayo de 2014.
- Janssen, A.M. (1987). Antimicrobial activity of essential oils. *Planta Médica*, 395-398.
- Kaminsky, A., & Lago, R. (2004). Tratamiento del acné. *Dermatología Argentina*, 3, 173.
- Kishore, N. (1993). Fungitoxicity of essential oils against Dermathophytes. *Mycoses*, 211.
- Kline & Company (2008). *The Greening of personal care*. Amsterdam: Kline Global Headquarters.
- _____ (2012). *Natural and Organic Beauty Maintains Strong Demand, Expected to Grow 10% Through 2016*. Estados Unidos: GCI Natural & Organic.
- Lertsattithanakorn, P. S., Taweechaisupapong, C., & Aromdee, W. (2006). In vitro biactivities of essential oils used for acne control. *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 43-49.
- Lifshitz, A. (2003). La pretendida supremacía de lo natural. *Gaceta Médica México*, 294-298.
- López, M.T. (2009). Higiene corporal y fitoterapia. *Farmacia Profesional*, 56-59.
- Luangnarumitchai, S., Lamlerthon, S., & Tiyaboomchai, W. (2007). Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Five Strains of Propionibacterium acnes. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 60-64.
- Mesa, A., Quinto-Quinto, A., & Blair, S. (2013). Cuantificación de quinina en extractos de Cinchona pubescens y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12.
- Microcaya (2012). *Microcaya*. Recuperado el 20 de Febrero de 2013, de <http://www.microcaya.com/productos.php?tipo=4&sec=1&sub=46&id=416>
- Ministerio de Industrias y Productividad (17 de enero de 2014). www.industrias.gob.ec. Recuperado el 13 de 03 de 2015, de <http://www.industrias.gob.ec/bp005-sector-cosmeticos-se-comprometio-a-incrementar-su-produccion-durante-este-ano/>
- Mishra, A., & Dubey, N. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stores food commodities. *Appl Environ Microbiol*, 1101.
- Murray, P., Jorgensen, E., Landry, J., & Pfaller (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM PRESS.

- Nadinic, J. (2009). Fitocosméticos más productos con ingredientes naturales. *Safybi*, 54-57.
- Naranjo, M., Dávalos, M., Batallas, B., Granja, J., Velarde, E., Rosales, O., Arias, P., Yépez, L., Beltrán, G., Portilla, K. (2013). *Proyecto análisis de vulnerabilidades a nivel municipal: perfil territorial cantón San Miguel de Ibarra*. Cotopaxi: Universidad Técnica del Norte.
- Naranjo, P. (2010). La Etnomedicina en el Ecuador. *Etnomedicina y etnobotánica : avances en la investigación*, 61-71.
- National for Clinical Laboratory Standards (1998). *Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico*. Miami: National Medical Laboratory.
- Negrelle, R., & Gómez, E.C. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: Chemical composition and biological activities. *Rev. Bras. Pi.Med*, 9, 80-92.
- Neves, K. (2010). Belleza ecológicamente correcta. *Cosméticos & Tecnología Latinoamericana*, 8-10.
- Noriega, P., & Dacarro, P. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja* 7, 3-8.
- Ohno, T. (2003). Antimicrobial Activity of Essencial against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 3, 207-215.
- Olmos, L. (2005). *Dermocosmos*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2013, de Historia clínica y métodos de exploración no invasivos en dermocosmética: <http://www.dermocosmos.com/espanol/libros/Dermocosmetica%202.htm>
- Penning, A. (2013). Demand for Organic Beauty to Grow to Over 13 billion. *Cosmetics&Toiletries*.
- Portalfarma (2012). *Portalfarma*. Recuperado el 18 de 03 de 2015, de Eficacia e incuidad de los cosméticos: <http://pfarmamx1.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/gneral/gp00019.nsf/0/3F636FE41134F3D8C12574E40041A709/>
- Proexport Colombia (2008). *SECTOR COSMETICOS*. Bogotá: Fiducoldex – Fideicomiso Proexport Colombia.
- Quiroz, M. (2012). *Manual de procedimiento de laboratorio docente de microbiología clínica en base a la normativa ISO 9001:2008*. Quito: Universidad Central del Ecuador Facultad de Ciencias Químicas.
- Ramírez, L., & Marín, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 15(42), 263-268.
- Riera, E., Chamorro, G., Zárate, M., Falcón, M., & Franco, R. (2008). Efecto del espesor y del pH del agar Mueller-Hinton en el antibiograma. *Rev Panam Infectology*, 64-69.

- Rosato, A. (2013). *Microbiología farmacéutica*. Segunda edición. Napoli: EdiSES.
- Sabate, D. (2003). El tamaño de muestra en los estudios de eficacia. *Epidemiología Médica*, 29.
- Salazar, L. (2006). *Concepto actual y clasificación de las dermatosis profesionales* (E. N. II, Ed.) Recuperado el 29 de Abril de 2013, de <http://www.ladep.es/ficheros/documentos/Concepto%20actual%20y%20clasificaci%F3n%20de%20las%20dermatosis%20profesionales.pdf>
- Soil Association (s.f.). *Organic beauty*. Obtenido de Soil Association: <http://www.soilassociation.org/whatisorganic/organicbeauty>
- Soto, R.G. (2002). Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. *Rev Cubana Plant Med*, 7, 89-95.
- Tolosa, V. (2011). *Propuesta de modelo de norma para certificar/acreditar productos cosméticos “naturales”, con “contenido orgánico” y “orgánicos” sustentables*. Buenos Aires: Departamento de Investigaciones Universidad de Belgrano.
- USDA United States Department of Agriculture (s.f.). *Organic Certification and Accreditation*. Obtenido de USDA United States Department of Agriculture: <http://www.ams.usda.gov/services/organic-certification>
- Vanden Berghe, D., & Vlietinck, A. (1991). Screening for antibacterial and antiviral agents. En Hostettmann, K. (ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, 47-69.
- Varela, J. (2011). Fraccionamiento bioguiado del extracto hidroetanólico de *Aristeguietia glutinosa* Lam y elucidación estructural de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*. Tesis de Bioquímica y Farmacia Universidad de la República Montevideo. Montevideo, Uruguay.
- Vera, M. (2008). Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: *Ambrosia arborescens*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Villares, M. P. (2012). Identificación de hongos asociados a infecciones dérmicas en pacientes diabéticos tipo II que acuden al Hospital Provincial Docente Ambato Junio-Noviembre 2010. Tesis Universidad Técnica de Ambato, Tungurahua, Ecuador.
- Yáñez, G., & Velasteguí, R. (s.f.). *Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos Escherichia coli y Candida albicans*. Recuperado el 16 de Julio de 2014, de www.buscagro.com

Cuando el consumidor comienza a marcar una tendencia en el mercado obliga a los productores a buscar información que permita cubrir el producto demandado. En el campo de la cosmética natural hay mucho por definirse, y esta publicación pretende incentivar la curiosidad del personal técnico que se encuentra enfrentando retos de investigación y desarrollo.

Uno de los mayores retos que se debe considerar frente al crecimiento de esta categoría de cosméticos, es que su producción implica mayor responsabilidad en el área de investigación, pues las especies vegetales utilizadas en una formulación no son ajenas al riesgo de producir reacciones adversas. Los productos naturales no ofrecen una completa seguridad de uso, siempre existirán riesgos inherentes a la diversidad de componentes químicos que posee un ingrediente natural.

Entre los aspectos que deben ser considerados en el proceso de desarrollo se destacan: la confirmación científica de la actividad de los ingredientes, estudios clínicos de tolerancia a las formulaciones, evaluaciones de eficacia del producto *in vitro* e *in vivo*, la estabilidad de la formulación. Algunos de estos aspectos son desarrollados en esta publicación.