

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRESERVANTE
DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO VERSUS EL
SORBATO DE POTASIO EN UNA EMULSIÓN DE USO
FACIAL**

Trabajo de graduación presentado por Alexia Deneb Higueros Mijangos
para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala,

2019

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD PRESERVANTE
DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO VERSUS EL
SORBATO DE POTASIO EN UNA EMULSIÓN DE USO
FACIAL**

Trabajo de graduación presentado por Alexia Deneb Higueros Mijangos
para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala,

2019

Vo.Bo.:

(f) _____
M.Sc. Mario Rolando Sarceño Carrillo

Tribunal Examinador:

(f) _____
M.Sc. Mario Rolando Sarceño Carrillo

(f) _____
Dr. Elfego Rolando López

(f) _____
Lic. Víctor Hugo Jiménez

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2019.

PREFACIO

El cambio climático es real y cada día nos afecta más. Ha sido de interés económico y social encontrar alternativas ecológicas y naturales a la mayoría de recursos sintéticos que hoy utilizamos. La industria cosmética no se ha quedado atrás, pues se han modificado infinidad de productos para dar fin al uso de materias primas sintéticas, tal y como lo son los conservantes. Cada día las empresas de esta industria se renuevan para estar en línea con las necesidades del mundo y las demandas del consumidor, que cada vez más son mas conscientes sobre los productos que consumen y los ingredientes que están en ellos.

Agradezco al Licenciado Víctor Jiménez por su invaluable contribución a este trabajo, por su apoyo en las incontables horas dentro del laboratorio, por enseñarme el mundo de la microbiología y por hacerme reír cuando ya estaba rendida. Gracias por no desistir del proyecto cuando los obstáculos fueron demasiados y por ayudarme a encontrar la solución. Gracias por ser un catedrático ejemplar, apasionado por su trabajo y por hacernos mejores estudiantes.

Agradezco al M.Sc. Mario Sarceño por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo. Gracias por enseñarme las tantas opciones que existen en el mundo cosmético y por exhortarme a seguir mis sueños.

Agradezco al Doctor Rolando López por su apoyo para la realización de este trabajo, por su continua motivación y gestión de permisos y solicitudes para que este proyecto fuese posible.

Agradezco a la Licenciada Ana Luisa Mendizábal por ayudarme en las etapas iniciales de este trabajo y por transmitirme su conocimiento sobre cuantificación analítica en aceites esenciales.

Agradezco a mis amigos, quienes me apoyaron hasta el último momento, sin ustedes no lo hubiese logrado.

Agradezco a todos aquellos quienes directa o indirectamente aportaron y facilitaron la realización de este trabajo de graduación.

ÍNDICE

Prefacio	IV
Lista de figuras	VIII
Lista de cuadros	X
Resumen	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO CONCEPTUAL	2
2.1. Antecedentes	2
2.2. Justificación	3
2.3. Planteamiento del problema	5
2.4. Alcances y límites	5
2.4.1. Alcances	5
2.4.2. Límites	5
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1. Situación financiera de los productos cosméticos	7
3.2. Cosméticos naturales y orgánicos	8
3.3. Aceites esenciales	10

3.4. Aceite esencial de eucalipto	12
3.5. Aceite esencial de romero	12
3.6. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales	14
3.7. Eucaliptol	18
3.7.1. Propiedades fisicoquímicas del eucaliptol	19
3.7.2. Efecto del eucaliptol en la piel	20
4. MARCO METODOLÓGICO	22
4.1. Objetivos generales	22
4.2. Objetivos específicos	22
4.3. Hipótesis	23
4.4. Variables	23
4.5. Procedimiento	24
4.5.1. Revisión bibliográfica	24
4.5.2. Elaboración del plan de investigación	24
4.5.3. Determinación del porcentaje de eucaliptol en la muestra de aceite esencial	24
4.5.4. Ensayo <i>in vitro</i> : determinación de la CMI del aceite esencial de eucalipto	24
4.5.5. Formulación de la emulsión	27
4.5.6. Ensayo <i>in-vitro</i> : crecimiento bacteriano en placa de la emulsión facial .	27
4.5.7. Pruebas físicas	30
4.6. Diseño de investigación	30
4.7. Análisis estadístico	31
5. MARCO OPERATIVO	32
5.1. Recabación y colecta de datos	32
5.2. Recursos	32
6. RESULTADOS	36
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
8. CONCLUSIONES	48
9. RECOMENDACIONES	49

10.BIBLIOGRAFÍA	50
11.ANEXOS	57
11.1. Síntesis del eucaliptol	57
12.GLOSARIO	65

LISTA DE FIGURAS

1.	Estructura química del eucaliptol	18
2.	Curva calibración eucaliptol	37
3.	Síntesis inicial del Geranil Pirofosfato	57
4.	Síntesis mentil α -terpenil	57
5.	Síntesis cineol	58
6.	Espectro GC/MS del eucaliptol 1	59
7.	Espectro GC/MS del eucaliptol 2	59
8.	Espectro GC/MS del eucaliptol 3	60
9.	Espectro GC/MS del eucaliptol 4	60
10.	Espectro GC/MS del eucaliptol 5	61
11.	Colorimetría microplaca	61

LISTA DE CUADROS

1.	Límites permitidos de aceite esencial de eucalipto en cosméticos	6
2.	Componentes AEE	13
3.	Componentes AER	14
4.	Resumen CMI	15
5.	Distribución diluciones en microplaca	26
6.	Formulación de la emulsión	27
7.	Datos curva calibración eucailptol	36
8.	Concentración solución cineol	36
9.	Concentración de cineol en la muestra	37
10.	<i>S. aureus</i> absorbancia	38
11.	<i>S. aureus</i> absorbancia duplicado	38
12.	<i>P. aeruginosa</i> absorbancia	39
13.	<i>P. aeruginosa</i> absorbancia duplicado	39
14.	pH emulsiones	40
15.	Conteo <i>P. aeruginosa</i>	40
16.	Conteo <i>S. aureus</i>	41
17.	SRHT <i>P. aeruginosa</i>	41
18.	SRHT <i>S. aureus</i>	42

RESUMEN

Esta investigación tuvo como principal propósito evaluar la potencia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto ante *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en una emulsión cosmética facial *leave-on*, con la finalidad de brindar información útil para futuras investigaciones, así como para empresas que deseen utilizar preservantes naturales a sus productos. Se realizó este estudio por la creciente demanda de productos naturales y libres de conservantes que existe en el mercado, pues cada vez más los consumidores se informan y compran productos que presentan menos riesgo y daño para ellos.

Se realizó la cuantificación de eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto mediante cromatografía de gases con espectrómetro de masas. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del Aceite esencial de eucalipto (AEE) mediante el método de lectura en placas ELISA utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. Se determinó la CMI en la dilución 1:64 del AEE lo que corresponde a 6.10 mg/ml. Según esto se formuló una crema facial hidratante que poseía esta concentración de AEE como único conservante añadido. Se comparó la actividad antimicrobiana de este producto con uno que contenía sorbato de potasio como único conservante añadido y se encontró que el aceite esencial de eucalipto presenta una mayor potencia antimicrobiana ante las cepas en estudio, que el sorbato de potasio. Se aceptó la hipótesis de que el producto facial que contiene aceite esencial en la formulación inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

El beneficio del estudio fue encontrar que existe una diferencia significativa en crecimiento (en términos de UFC/g) bacteriano entre el producto que contenía AEE y el que no, hallándose que el AEE es un mejor inhibidor de las bacterias en este caso. Por tanto, como se mencionó, este estudio generó información de utilidad para futuras investigaciones en el campo de conservantes naturales y aceites esenciales.

1. INTRODUCCIÓN

Mediante este estudio se evaluó la eficacia del aceite esencial de eucalipto (de origen natural) como preservante antimicrobiano en un producto cosmético facial leave-on, mediante ensayos in-vitro. Se realizó ensayos utilizando únicamente el aceite esencial para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite para cada una de las cepas a analizar: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, las cuales son bacterias características de la piel. Una vez determinada la CMI se procedió a ajustar la cantidad de aceite a la formulación de la emulsión facial hidratante. Se continuó con la inoculación de la emulsión para la determinación la actividad antimicrobiana del aceite mediante pruebas *in-vitro*. Esto, con la finalidad de hacer notar su potencial como preservante en la industria cosmética natural; industria en ascenso económico y mercadológico. El estudio fue de suma importancia y relevancia dado que los preservantes de los productos en la actualidad son un tema controversial por motivos ambientales y de salud. La generación de información sobre el uso de un aceite esencial como preservante puede ser de utilidad para las empresas que deseen profundizar más en este tipo de opciones de conservantes.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Antecedentes

La industria cosmética es uno de los sectores comerciales con mayor crecimiento. Hoy en día, el acceso a nuevos y mejores productos es mucho más viable que hace algunas décadas. Existen factores que hacen que este sector industrial continúe con su aumento, entre ellos podemos mencionar: búsqueda, especialmente de las mujeres, de nuevos productos y la satisfacción de encontrarlos, marcas independientes y su aporte a la creatividad de la industria cosmética, adquisición de las empresas grandes sobre pequeñas industrias y su consecuente incremento en la creación de nuevas industrias pequeñas [1]

Los aceites esenciales son utilizados comúnmente en prácticas holísticas, como la aromaterapia o con fines decorativos aromáticos. Incluso, en la industria farmacéutica, existen preparados como ciertos ungüentos que los utilizan en sus formulaciones, pues se les atribuyen propiedades relajantes y antibacterianas.

Uno de los aceites con mayor frecuencia de uso es el aceite esencial de eucalipto. Este aceite es utilizado por diversas industrias, como la industria de alimentos que lo emplea como saborizante o la industria agrícola, que ha investigado su uso como pesticida y herbicida. Sin embargo, su mayor uso es por parte de la industria cosmética por su uso como aroma en un sinnúmero de productos o como ingrediente activo en otros.

Fuera del sector industrial, en el ámbito de investigación se ha indagado respecto al uso de aceite esencial de eucalipto como potencial agente antimicrobiano. Bachir evaluó la capacidad antimicrobiana de *Eucalyptus globulus* en cultivos diluidos (10-1, 10-2 y 10-

3; 1mL de 108 células/mL) de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Evaluó distintas concentraciones. 25, 50, 75 y 100 por ciento, del aceite esencial mediante el método de halo de inhibición. Se encontró la mayor inhibición para las cepas de *E. coli* (dilución 10-3) utilizando una concentración del 100 por ciento del aceite esencial (AE). Se observó una relación proporcional entre la concentración de AE y dilución de la cepa bacteriana; entre más diluida la cepa y mayor concentración del AE, mayor la inhibición de crecimiento de las bacterias.[2]

El aceite esencial de eucalipto es uno de los materiales con mayor concentración de 1,8-cineol. Aldoghaim *et al.*, indagó en la actividad antibacteriana de varios aceites esenciales de *Eucalyptus* ricas en 1,8-cineol. Se aisló este metabolito de las hojas de siete especies de Eucalipto y analizó su actividad antibacteriana. Se determinó la CMI para bacterias Gram negativo, Gram positivo y hongos: *S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *Enterococcus faecalis*, *E. faecalis* VRE, *Candida albicans*, *Salmonella Typhi*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Tomando en cuenta la CMI por bacteria, el promedio en porcentaje v/v de CMI para el eucaliptol aislado fue de 7.0.[3]

El potencial antimicrobiano que se ha observado para el aceite esencial de eucalipto, así como para otros aceites, es un área que no se ha explotado dentro de la industria cosmética. Por ser recursos totalmente naturales, podrían sustituir por completo a los preservantes sintéticos que se continúan utilizando.

2.2. Justificación

Según Agexport en el año 2017 las exportaciones de productos cosméticos ascendieron a cifras nunca alcanzadas. Pero fue el sector de aceites esenciales que tuvo un mayor auge de exportación con un 47% en comparación con años anteriores, siendo el mercado centroamericano uno de los mayores compradores con un 60%, seguido de México y Estados Unidos[4]

Por el crecimiento global de este sector industrial, es entonces natural que la industria cosmética también crezca en Guatemala. En el primer trimestre del año 2018 Guatemala tuvo un gasto de más de \$25 millones en importaciones de productos cosméticos de belleza e higiene, aumentando estas cifras un 3 % del periodo anterior[5]

El mercado estadounidense es uno de los más competitivos, por lo que se espera que para 2024 sobrepase los \$19.7 billones. Sin embargo, una rama de la industria cosmética se encuentra en auge: el mercado de productos de cuidado personal naturales y orgánicos. Para finales del año 2018 se estimó una proyección de \$5.6 billones en esta subclase de la industria abarcado el 6 % de las ventas de este sector de productos.[6]

El subsector de productos cosméticos naturales y orgánicos se encuentra en un “boom”. En los últimos años el consumidor ha cobrado conciencia sobre el tipo de productos que utilizan y cómo estos son producidos, pues se tiene una mayor conciencia sobre los químicos y el daño que pueden causar tanto a nivel de la piel como en el medio ambiente. Este cambio en mentalidad de consumo ha causado un mejor posicionamiento de la cosmética orgánica y natural[7]

El propósito de este tipo de estudios experimentales, al utilizar aceite esencial en un producto cosmético facial, es determinar su eficacia como preservante para así generar resultados que puedan ser utilizados en futuras investigaciones para aquellas empresas que deseen certificarse como orgánicas o naturales, por ejemplo, certificaciones NPA (Natural Product Association) o NSF (National Sanitation Foundation) y así continuar el aumento en las cifras de productos orgánicos o naturales.

La necesidad de realizar dicho estudio yace en la controversia actual que existe respecto a los preservantes y cómo estos pueden afectar no solo al medio ambiente, sino a la salud. El estudio brinda los resultados de una opción natural que sea igualmente efectiva y mejor aceptada por el consumidor. Realizando ensayos *in-vitro* durante el periodo de junio-diciembre 2019, para determinar la cantidad mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial aislado y luego en la emulsión facial, se determina su eficacia de inhibición ante dos cepas bacterianas: *P. aeruginosa* y *S. aureus*; siendo estas las más frecuentemente encontradas en la piel.

2.3. Planteamiento del problema

¿Cuál es el efecto del aceite esencial de eucalipto en un producto cosmético facial?

2.4. Alcances y límites

2.4.1. Alcances

Se determinó la cantidad mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de eucalipto aislado, es decir, sin los componentes de la emulsión, utilizando como modelo bacteriano las cepas en estudio. Una vez determinada la CMI, se procedió a ajustar las cantidades de aceite esencial a la formulación de la crema de manera que no sobrepasase el 5.5%. Y posteriormente se incubó la crema con la concentración conocida de aceite esencial de eucalipto para la determinación la capacidad inhibitoria de este producto natural ante cepas bacterianas en productos cosméticos. Asimismo, se efectuaron pruebas físicas al producto terminado previo a las pruebas de uso y ensayos microbiológicos. Ensayos físicos:

- pH
- Centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos

2.4.2. Límites

No se determinó la composición ni porcentaje de otros metabolitos secundarios en el aceite esencial de eucalipto mediante GC/MS u otro método.

En este estudio no se evaluó otro producto distinto al formulado, ni se cambió la duración del estudio.

No se extrapoló los resultados a formas cosméticas sólidas o líquidas; únicamente son válidos para cremas O/W.

Asimismo, los recursos económicos y materiales disponibles para el estudio fueron limitantes para el mismo.

Concentración mínima (%)	Concentración media (%)	Concentración máxima permitida (%)
0.04	4	28

Cuadro 1: Límites de concentración de aceite esencial de eucalipto en productos cosméticos.

Se muestra en la tabla anterior los límites presentados por el Cosmetic Ingredient review respecto a las concentraciones de aceite esencial de eucalipto en cosméticos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Situación financiera de los productos cosméticos

La industria cosmética es un negocio muy rentable, sobre todo el área de los productos de cuidado facial. En el año 2016 la compañía de estudio de mercado, Grand View Research, reportó que para el año 2024 las ventas de este tipo de productos ascenderán a \$196.7 billones. [8]

Enfocándonos en Latinoamérica, se espera que para el año 2020 el mercado de productos cosméticos tenga un valor neto de \$68.92 billones, pues en el 2014 este sector demográfico representó el 12.5% de las ventas de cosméticos. Entre las tendencias de consumo en la región, se mencionan los productos naturales, pues se cree, a nivel de consumo, que ayudan a mitigar los efectos de la contaminación ambiental.[9]

Bajo la premisa de consumo masivo, los mayores vendedores de estos productos en Estados Unidos; Walgreens, Sephora, Amazon.com y Vitacost, han aumentado sus ventas al mismo tiempo que han reinventado e innovado en el área de artículos de cuidado personal naturales y orgánicos. Se estima que para finales del año 2016 las ventas de éstos últimos fueron alrededor de \$1979.3 millones. Acorde con las demandas por parte de los consumidores, el área natural y orgánica de esta Industria representará el 30.9% de todas las ventas de productos cosméticos para el año 2024 con una expectativa de crecimiento del 9.7% anual en 2016. [10]

El crecimiento de esta rama de la cosmética se debe a diversos factores de preferencia por parte de los consumidores. En 2018, GCI realizó una encuesta a 4000 compradores para

identificar los componentes claves que los llevan a comprar productos orgánicos y naturales. Este análisis se realizó para poder comparar los resultados obtenidos en el año 2018 con los obtenidos bajo la misma encuesta en el año 2008.[11]

De los encuestados en 2018, el 68 % compra productos naturales u orgánicos; esto representa un aumento del 27 % desde el año 2008. El 74 % de estos lo hace bajo la creencia que este tipo de productos son más saludables para su cuerpo. Asimismo, la falta de conocimiento sobre dónde adquirir estos bienes ha disminuido, pues únicamente el 11 % de los encuestados en 2018 no sabía dónde comprarlos, mientras que las cifras fueron mucho mayores para esta variable en el año 2008 [11]. La disminución en la falta de conocimiento sobre los lugares de adquisición de productos cosméticos orgánicos y naturales seguramente se debe al aumento de publicidad y productos de este tipo por parte de los vendedores más renombrados.

Cabe resaltar, que el segmento generacional con mayor consumo de éstos son los millennial jóvenes (18-24 años)[11], asimismo las mujeres son las más comprometidas con el uso de bienes cosméticos orgánicos y naturales[12] por lo que la gran mayoría de productos están y deberían estar dirigidos a estas poblaciones, pues en 2017 el ritmo de crecimiento de estos aumentó a un 13 % anual; cifra que se espera mantener hasta 2021.[13]

Es evidente el aumento en el crecimiento de estos productos, pues como se mencionó en párrafos anteriores, la expectativa de crecimiento en 2016 era del 9.7 %, en 2017 del 13 %, sin embargo en un estudio realizado por The NPD Group, en 2019 la expectativa de crecimiento en ventas de cosméticos naturales y orgánicos es del 24 % [14]; casi el doble del año anterior.

3.2. Cosméticos naturales y orgánicos

La Administración de Comida y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) es la entidad de regulación de productos cosméticos más importante en los Estados Unidos de América y el mundo. Dado que sus regulaciones tienen impacto internacional, la definición de cosmético utilizada para este estudio se basa en la dada por ellos: “Artículos destinados a ser frotados, esparcidos, vertidos o atomizados, introducidos, o de alguna otra manera, aplicados al cuerpo humano para su limpieza, decoración, aumento de su atractivo o alteración de la

apariciencia.” Entre los productos clasificados como cosméticos se incluyen los hidratantes de la piel, champús, desodorantes, entre otros; cabe recalcar que no se incluyen los jabones. [15]

La Asociación de Productos Naturales (NPA, por sus siglas en inglés) es una organización dedicada a la industria de productos naturales, con enfoque en las empresas manufactureras, vendedores al por menor y al por mayor de este tipo de bienes. NPA se ha dedicado en crear los estándares más altos para productos naturales de cuidado personal, entre estos incluidos los cosméticos faciales.[16]

En aras del auge de productos cosméticos “naturales” y “orgánicos” es conveniente una definición de estos términos. La FDA no posee una definición para el término “orgánico” por el cual regirse para sus regulaciones, más hace énfasis en la importancia de no elegir productos “orgánicos” con base a la creencia de que son seguros. Asimismo, esta entidad no posee una definición para “natural” por la cual regirse en el área de productos cosméticos.[17]

Sin embargo, podemos definir “orgánico” con base al Programa Nacional Orgánico (NOP, por sus siglas en inglés). Se define como cualquier proveniente de una agricultura orgánica en tanto el uso de fertilizantes sintéticos se ve limitado y no utilizan irradiación o ingeniería genética protegiendo los productos de contaminación por sustancias prohibidas y de productos no orgánicos.[18]

La Asociación de Cosméticos, artículos de aseo y perfumería (CTPA, por sus siglas en inglés) es el ente representante del Reino Unido en cuanto a estos productos se refiere. Dicha entidad, al igual que la FDA, carece de una definición para “natural” y “orgánico”. Más hace énfasis en que no se debe engañar al consumidor al utilizar estos términos, pues es posible atribuirle el carácter de natural a un ingrediente, pero es más difícil hacer esta misma afirmación sobre un producto completo.[19]

Asimismo, la CTPA indica la diferencia de la proclamación de productos naturales/orgánicos versus aquellos que no lo son: utilización de una mayor cantidad de este tipo de ingredientes o de ingredientes químicos derivados de los naturales. De la mano de lo anterior, hay restricciones sobre las rutas sintéticas que son permitidas para este tipo de excipientes o principios activos.[19]

A pesar de que no exista una definición legal para estos términos, públicamente se entien-

de por productos cosméticos naturales cualquier ingrediente que sea “una planta, mineral, producto animal o derivado”. En los productos cosméticos orgánicos, el término “orgánico” se refiere a cómo fue cultivado algún ingrediente de la formulación; proveniente de fuentes “sin pesticidas, fertilizantes químicos, hormonas o antibióticos”. Una de las agencias regulatorias más fuertes en cuanto a productos orgánicos se refiere es la Asociación Australiana de Certificación Orgánica (ACO, por sus siglas en inglés). Ésta indica que un producto que quiere certificarse como orgánico debe contener entre un 70-95 % de ingredientes orgánicos.[20]

El estándar COSMOS, (el cual es la armonización de diversos estándares en Europa; se incluyen el BDIH de Alemania, el BioForum de Bélgica, CosmeBio y EcoCert en Francia, ICEA en Italia y la UK Soil Association)[21], define como producto de origen natural “el agua, minerales e ingredientes de origen mineral, ingredientes agrícolas procesados físicamente, ingredientes agrícolas procesados químicamente y derivados de todos los anteriores. No se consideran de origen natural: petroquímicos, preservantes y agentes desnaturalizantes de origen petroquímico”[22]. Ahora bien, el otro término se describe de forma más abstracta, haciendo alusión a que cualquier producto denominado orgánico es “aquél que cumple con los estándares orgánicos utilizando el Código Alimentario GL 32 como referencia o su equivalente internacional.” [23]

3.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son productos obtenidos de fuentes naturales; plantas. Estos poseen propiedades que pueden tener diversos efectos tanto para la planta como fuera de ella, cuando estos son extraídos. Su composición es básicamente una mezcla de compuestos volátiles como los terpenos, compuestos con anillos aromáticos, fenilpropanoides, entre otros.[24]

El proceso industrial de la obtención de estos productos se basa en distintos procesos de destilación del material que se quiere obtener. Entre los métodos más utilizados se encuentra la hidrodestilación, la destilación por arrastre de vapor de alta presión y a presión atmosférica. [24]

Es posible realizar múltiples análisis a los aceites esenciales, ya sea para la separación de sus compuestos o para la identificación de ciertos compuestos en una muestra ya sea purificada o mixta. El estudio de composición de un aceite esencial ha sido muy eficaz en términos de conocer los metabolitos que lo componen, así como su concentración. Uno de los métodos utilizados para identificar la composición de un aceite esencial es la espectroscopía de masas. Los compuestos clave que se identifican mediante este método son los iones de terpenos.[24]

Los terpenos son una clasificación muy amplia que puede dividirse en mono-terpenos, sesqui-terpenos y más. Los monoterpenos se componen de dos unidades de isopreno; el terpeno más simple de todos. Son los terpenoides más sencillos y se encuentran en abundancia en los aceites esenciales de varias materias primas vegetales.[25]

Dada la configuración de enlaces en la estructura del isopreno, los monoterpenos usualmente tienen composición cíclica; se conocen muy pocos compuestos monoterpenoides con estructura acíclica. Entre estos compuestos se pueden mencionar el Mirceno, O-cimeno y citral.[25]

Los monoterpenos cíclicos son compuestos que pueden ser saturados, parcialmente insaturados o aromáticos, en cuanto a la conformación de sus enlaces. Los grupos funcionales que se encuentran con mayor frecuencia en estos son los éteres, ácidos hidroxílicos, ésteres, aldehídos y cetonas. Dado que son parte de los aceites esenciales, es fácil pensar que su naturaleza es lipofílica.[26]

Los monoterpenos tienen una biosíntesis base de la reacción entre DMAPP e IPP, posterior, una serie de reacciones se abren paso para generar el geranil pirofosfato. A partir de esta última estructura mencionada, se sintetizan diversos monoterpenos como el mentol o el 1,8-cineole; coloquialmente conocido como Eucaliptol.[26]

La importancia de los terpenoides yace en su utilización en aromaterapia y en productos de cuidado personal, dado que poseen características aromáticas, son muy demandados y preciados. Se sabe, que en la antigüedad la fito-farmacología era la única alternativa real disponible para curar enfermedades o tratar síntomas. Los metabolitos secundarios provenientes de diversas familias de plantas jugaban un papel esencial en la terapia de las personas. Los terpenoides eran y son, entonces, metabolitos importantes no solo por su aroma, sino por

sus propiedades antibacterianas, antineoplásicas, diuréticas, entre otras.[27]

3.4. Aceite esencial de eucalipto

El aceite esencial de eucalipto cuenta con la mayor concentración de 1,8-cineol o eucaliptol; metabolito al que se le atribuye la mayoría de sus propiedades, entre ellas las antimicrobianas[28]. En el Cuadro 2 se presentan los compuestos mayoritarios en la especie *Eucalyptus globulus* al ser esta la más utilizada, pero no la única, para la extracción del aceite esencial.

Cabe notar que existen otras especies de esta planta para las cuales se han identificado más metabolitos o incluso, los mismos anteriormente presentados, pero en distintas concentraciones. Es de suma importancia notar que en especies como *E. maideni* el porcentaje de eucaliptol es de más del 80 % y en especies como *E.lehmani* este mismo metabolito se encuentra en menos del 50 % en el aceite esencial obtenido de las hojas.[29]

3.5. Aceite esencial de romero

El aceite esencial de romero, como muchos otros, se ha utilizado como alternativa medicinal a los fármacos sintéticos que hoy existen. Se han realizado varios estudios mostrando que este posee actividad antimicrobiana, se le atribuye a su vasta cantidad de metabolitos secundarios. La composición química de este aceite esencial según la Normalización Española UNE 84306:2006 es la que se presenta en el Cuadro 3.

Compuesto	Porcentaje (%)
1R- α -pineno	18.18
(-)- β -pineno	0.69
O-cimeno	0.37
1,8-cineol	55.49
Metil m-tolil carbinol	0.21
Terpinen-4-ol	0.33
α -terpineol	0.79
α -gurjuneno	2.98
Calereno	0.39
Longiborn-2-eno	8.15
(-)-alloaromadendreno	2.09
(+)-ledeno	3.91
α -cadineno	0.37
Humulano-1,6-dien-3-ol	0.21
(-)-isolongifolol acetato	2.34
Longifoleno	0.89
(+)-rosifoliol	0.3

Cuadro 2: componentes del aceite esencial de las hojas de *E.globulus* [28]

Componente	Porcentaje mínimo (%)	Porcentaje máximo (%)
α -pineno	18	26
Canfeno	7	13
β -pineno	2	5
Mirceno	2.5	4.5
Limoneno	2.5	5.5
1,8-cineol	16	23
Alcanfor	12.5	22
Linalool	0.5	2.5
Acetato de bornilo	0.5	2.5
Terpinen-4-ol	0.4	1.5
Borneol	1	4.5
α -terpineol	1	4
Verbenona	0.7	2.5

Cuadro 3: Componentes del aceite esencial de Romero [30]

Como se observa en el cuadro anterior, este aceite posee 1,8-cineol como uno de los componentes con mayor concentración. Gracias a estudios con otros aceites esenciales se sabe que este metabolito contribuye a la actividad antibacteriana.

3.6. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales

A continuación, se presenta un resumen de las investigaciones realizadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de eucalipto y romero. Dichas investigaciones se describen a mayor detalle posteriormente.

Autores	CMI	Microorganismos
1,8-cineol		
Kifer, D. <i>et.al</i> [31]	4-8 mg/ml	MRSA
Romero		
Jiang, Y. <i>et.al</i> [32]	0.03 % v/v - 1 % v/v	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. niger</i>
Bonilla, D. <i>et.al</i> [33]	1000 μ g/ml.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Eucalipto		
Elaissi. <i>et.al</i> [34]	Halo de inhibición de 9.00	+ 3.9 mm <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Elaissi. <i>et.al</i> [35]	Halo de inhibición de 27.4	+ 10.7 mm (<i>S. aureus</i>) <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i>
Chaves, T. <i>et.al</i> [36]	1000 μ g/ml	<i>Staphylococcus</i>

Cuadro 4: CMI de distintos compuestos para diversas cepas bacterianas en varios estudios

Como se observó en el cuadro, existen diversas investigaciones respecto a los aceites esenciales y sus metabolitos. El 1,8-cineol, eucaliptol o cineol ha demostrado tener actividad antimicrobiana; es este metabolito el mayoritario en ciertos aceites esenciales como el AE de eucalipto o romero. Se ha aislado este compuesto para probar su efectividad por sí solo ante bacterias como *S. aureus*. Se determinó que la CMI de este compuesto aislado es entre 4-8 mg/ml para cepas de MRSA. [31]

Con el aceite esencial de romero, se ha evaluado su actividad antimicrobiana y su composición química. Se ha encontrado que el mayor constituyente de este producto es el 1,8-cineol o eucaliptol en concentraciones de aproximadamente el 26 %, seguido de α -pineno al 20 %. Se probó en el estudio de Yang *et al.* en 2001, la capacidad antibacteriana del aceite de romero y los metabolitos mayoritarios aislados contra bacterias Gram positivo (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), Gram negativo (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y dos hongos (*Candida albicans* y *Aspergillus niger*).[32]

En la misma investigación mencionada anteriormente, se encontró la concentración mínima inhibitoria (CMI) el 1,8-cineol y α -pineno. Se encontró que la CMI para el α -pineno fue efectivo dentro del rango de 0.3 % v/v - 4 % v/v; para los microorganismos *E. coli*, *P. aeruginosa* y *A.niger* las concentraciones de 1,8-cineol dentro del rango de α .2 % - 4.0 % v/v no fueron efectivas. Utilizando el método de curva de inhibición en el tiempo, se determinó que el aceite esencial de romero, al igual que el resto de las muestras, inhibió el crecimiento a un mínimo de 10^3 UFC/ml.

El aceite esencial de romero es de gran interés para demostrar su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano. En un estudio realizado por Bonilla, *et.al*, se evaluó este aceite para demostrar su potencial actividad bacterioestática ante *Porphyromonas gingivalis* en un estudio in vitro. El aceite se utilizó en diluciones de etanol al 96 % en concentraciones de 12.5 μ g/ml a 12000 μ g/ml; se comparó con soluciones de 0.015 μ g/ml – 256 μ g/ml de metronidazol. Para determinar la CMI se incubó durante 7 días y se determinó que dicha concentración del aceite esencial de romero es 1000 μ g/ml. [33]

Ahora bien, el aceite esencial de eucalipto, como uno de los productos más rico en eucaliptol, ha sido de gran interés para estudios de actividad antibacteriana y anti-fúngica. En 2011 se realizó una evaluación del aceite esencial de 20 especies de Eucalyptus para determinar dicha actividad antibacteriana. Al igual que el aceite de romero, el aceite de eucalipto tiene como componentes mayoritarios al 1,8-cineol y α -pineno. Se utilizaron 4 bacterias para el estudio de Elaissi *et.al.* en 2011: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. [34]

Se utilizaron discos con 10 μ l de cada uno de los aceites esenciales para determinar su halo

de inhibición y con eso establecer su actividad antibacteriana. Al analizar todos los resultados se observó que a pesar de que el eucaliptol y α -pineno han demostrado ser potentes agentes antimicrobianos, su actividad puede reducirse en presencia de otros metabolitos no deseados como el p-cimeno, α -pineno, criptona y sesquiterpenos oxigenados. Se concluyó que cada una de las especies de *Eucalyptus* posee distinta actividad antimicrobiana ante las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*, y que eso depende de los metabolitos que posee y la concentración a la que estos se encuentran, sin embargo, *S. aureus* fue la bacteria más sensible y *P.aeruginosa* la más resistente ante los aceites esenciales como agentes antibacterianos. el mejor resultado inhibitorio fue dado por *E. cinérea* y *E.gunnii* con una inhibición de 9.0mm. [34]

Un año después del análisis de actividad antibacteriana del aceite esencial de 20 especies de *Eucalyptus*, Elaissi *et.al*, evaluó ocho especies de *Eucalyptus* para determinar su actividad antibacterial, antifúngica y antivírica. Se probó la actividad ante siete bacterias: *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. Se trabajó mediante el método de Kirby Bauer (discos de inhibición) con un inóculo igual al estándar 0.5 de McFarland. Los discos fueron impregnados con 10 μ l de cada aceite; se midió el halo inhibitorio a las 24 horas de incubación a 37°C. Las mayores inhibiciones fueron dadas por *E. odorata* al dar una inhibición de 27.4 + 10.7 mm contra *S. aureus*. [35]

Para determinar la actividad antifúngica, se utilizaron los siguientes microorganismos: *Candida albicans*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton soudanense* y *Microsporum canis*. Los resultados fueron dispersos, sin embargo, un único aceite mostró 100% de inhibición ante las especies de *Trichophyton*. La conclusión fue que no existe relación entre la concentración de un metabolito específico y la capacidad antifúngica; se le atribuye esta propiedad a la sinergia de los metabolitos presentes en los aceites. [35]

Recientemente, en el 2018 Chavez *et.al*, estudió la capacidad el aceite esencial de eucalipto de *E. camaldulensis* como potenciador de antibióticos. Este aceite, que presenta alrededor del 80% de 1,8-cineol, potencia la actividad de los antibióticos betalactámicos; resulta útil en cepas resistentes de *S. aureus* y *E. coli*. Se determinó que la CMI de aceite esencial de eucalipto para *Staphylococcus* es de 1000 μ g/ml, pero fue mayor para *E. coli*. Debe recordarse

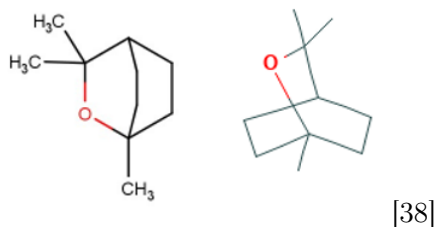


Figura 1: Estructura química del eucaliptol

que las cepas analizadas fueron cepas resistentes a medicamentos, sin embargo, el AE logró inhibir su crecimiento. [36]

En aras de la experimentación de la actividad antimicrobiana, se han aislado los monoterpenos de los aceites esenciales para realizar este tipo de ensayos con estos. Van Vuuren estudió la actividad antibacteriana del 1,8-cineol y de enantiómeros del limoneno aislados y en combinación. Analizó su CMI para diversas cepas bacterianas. Siendo *S. aureus* y *E. coli* las más representativas, ambas presentaron una CMI de 8 mg/ml.[37]

Como se expuso en los párrafos anteriores, el aceite esencial de eucalipto es de interés por su actividad antimicrobiana. El uso de este producto natural es entonces relevante como potencial uso preservante en una emulsión cosmética facial, pues además de su capacidad antimicrobiana, el AE de eucalipto tiene propiedades beneficiosas en la piel.

3.7. Eucaliptol

Uno de los terpenoides con mayor abundancia en ciertas especies de plantas es el Eucaliptol o 1,8-cineol(e)[38]. Este metabolito será el de principal interés para este estudio, dado que se encuentra presente en los aceites esenciales que serán analizados mediante CG-MS; aceite esencial de romero y de eucalipto.

A partir de elucidaciones utilizando técnicas como Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (HNMR), CG/MS e Infrarojo (IR), se ha encontrado la fórmula esquelética de la molécula, como se muestra en la Figura 1. [38]

El eucaliptol y cualquier isoprenoide, tienen un origen en común: Isopentil di fosfato (IPP) y dimetil alil di fosfato (DMAPP). A partir de estas dos estructuras se sintetizan hemiterpenos o los prenil-difosfatos mediante la adición continua de IPP. Los prenil-difosfatos son los precursores de los principales terpenos encontrados en la naturaleza; es a partir de ellos que los monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, carotenoides y demás, son sintetizados.[39]

En investigaciones realizadas, se ha determinado que el eucaliptol o cineol (referencia para la biosíntesis), se encuentra en su mayoría en las hojas frescas de *Eucalyptus globulus*, *E. smithii* y *E. polybractea*. Estas especies contienen concentraciones de aceite esencial entre 1-3%, siendo el metabolito mencionado el mayor constituyente de éste en un 70-85%.[40]

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de cualquier compuesto isoprenoide tiene una base biosintética similar. Una breve descripción de esta sería: El Geranil pirofosfato (GPP) es el metabolito secundario inicial en la síntesis de cualquier isoprenoide. La síntesis inicia del Di-metil alil pirofosfato y mediante adiciones electrofílicas y estabilización de la estructura se obtiene el GPP (Figura 2 de la sección de anexos). Luego, el catión mentil/ α -terpenil es el producto intermediario clave para la síntesis del cineol, limoneno y demás isoprenoides (Figura 3 de la sección de anexos). A partir de ese compuesto, el cineol o eucaliptol finalmente se sintetiza mediante una hidratación y adición de un grupo alcohol en el catión mentil/ α -terpenil y finaliza con una ciclación por la pérdida de un ión hidronio (Figura 4 de la sección de anexos). Este metabolito es biosintetizado mediante varios pasos que ocurren en las plantas como parte de sus mecanismos de sobrevivencia, pues se sabe que los aceites esenciales son una forma de protección y atracción de polinizadores para los productos vegetales.

3.7.1. Propiedades fisicoquímicas del eucaliptol

El eucaliptol es un compuesto orgánico monoterpénico que posee diversos sinónimos como parte de la nomenclatura química actual; cineole, 1,8-cineol, cajeputol, entre otros. Su estado físico es un líquido incoloro aprobado por la FDA para su uso en alimentos.[41]

Este compuesto es un líquido incoloro con olor característico a camphor con una de

sensación de sabor fresco, picante y agrio. Su peso molecular exacto es de 154.136 g/mol, con un punto de ebullición de 176-177°C y un punto de fusión de 1.5°C[42]. Es una molécula completamente insoluble en agua, sin embargo, es miscible en éter, alcohol, cloroformo, ácido acético glacial, glicerina, Propilenglicol y aceites fijos y volátiles. Posee una densidad de 0.92 g/cm³, aproximadamente.[38]

El eucaliptol puede identificarse por medio de espectroscopía de masas por lo que se presenta en las figuras 5-9 de la sección de anexos los espectros de masas de diversas pruebas para poder tener una base de comparación.

3.7.2. Efecto del eucaliptol en la piel

El eucaliptol es comúnmente confundido con el aceite esencial de eucalipto, en casos incluso son mencionados como sinónimos, mas no lo son. Este compuesto se utiliza como agente aromático en la mayoría de los productos de uso personal y de limpieza; en cremas deportivas se utiliza en concentraciones de hasta el 4%. Se han realizado estudios demostrando que este compuesto no irritante cuando se aplica en solución en la piel, sin embargo, se ha observado irritación nasal en algunos casos; posiblemente debido a su carácter irritante.[42]

El Cosmetic Ingredient Review, utilizando la data de la Food and Drug Administration (FDA) a través de su programa de Registro Voluntario y de la industria cosmética en operación, resalta que el aceite esencial de eucalipto tiene una concentración máxima de uso reportada del 5.5% en productos para el cuerpo y manos. El resto de reportes tienen concentraciones de 1.4% o menos, incluidos los productos faciales.[43]

Una de las capacidades de los terpenos es actuar como potenciadores de penetración de sustancias en las barreras de la piel. Esto se debe principalmente a su estructura química y propiedades fisicoquímicas tales como su capacidad lipofílica alta, el tamaño y quiralidad pues aquellos con un menor tamaño tendrán mayor capacidad potenciadora. Asimismo, el estereoisómero (-) de los terpenos es más activo para facilitar el transporte de moléculas. El punto de ebullición y la energía de vaporización también tienen un rol importante en este aspecto. La mayoría de los terpenos como el geraniol, limoneno, mentol, eucaliptol, entre otros, actúan a nivel del estrato córneo de la piel alterando su equilibrio lipídico “produciendo

do defectos entre los dominios ordenados y desordenados, permitiendo un incremento en la concentración de medicamento que atraviesa el tejido luego de la aplicación del potenciador".[44]

Se ha escrito sobre la capacidad del eucaliptol de actuar como un potenciador de la permeación de la piel para diversos compuestos. Se fundamentan estas afirmaciones en la creencia que este compuesto ayuda a reducir la intensidad de los reflejos dependientes de lípidos; esto puede asociarse a una ruptura de los lípidos en las subcapas de la piel, como puede serlo la capa hipodérmica.[45]

En cuanto a su toxicidad en la piel, estudios realizados en concentraciones 4-28 % de eucaliptol puro en aceite mineral, no mostraron efectos irritantes. Estas concentraciones sobrepasan los límites de uso común, pues el cineol en jabones se utiliza al 0.4 %, 0.04 % en detergentes, 0.5 % en cremas y alrededor de 1.6 % en perfumería.[45]

4. MARCO METODOLÓGICO

4.1. Objetivos generales

1. Evaluar la potencia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto ante *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en una emulsión cosmética facial *leave-on*.
2. Generar información útil para futuras investigaciones, así como para empresas que deseen implementar preservantes naturales a sus productos.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la cantidad de eucaliptol en la de aceite esencial de eucalipto a utilizar en la formulación de la emulsión, mediante GC/MS.
2. Formular un producto cosmético facial de fácil absorción que contenga la CMI de aceite esencial de eucalipto como preservante.
3. Comparar la eficacia preservativa del aceite esencial de eucalipto versus el sorbato de potasio en ensayos *in-vitro*, utilizando las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* con el sorbato de potasio en la emulsión facial.

4.3. Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): El producto facial que contiene aceite esencial en la formulación no inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis alternativa (H_a): El producto facial que contiene aceite esencial en la formulación inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

4.4. Variables

Independientes:

- Aceite esencial utilizado
- Concentración de eucaliptol utilizada
- Tiempo de uso del producto
- Viscosidad de la formulación
- pH de la formulación

Dependientes

- Lote del aceite esencial utilizado
- Crecimiento bacteriano en placas de cultivo

4.5. Procedimiento

4.5.1. Revisión bibliográfica

4.5.2. Elaboración del plan de investigación

4.5.3. Determinación del porcentaje de eucaliptol en la muestra de aceite esencial

En el laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala: El equipo utilizado fue el cromatógrafo de gases con espectro de masas en una columna capilar de sílica gel de 60m x 0.25mm ID y 0.25 μ film. Las temperaturas del puerto de inyección y del detector se mantuvo a 250°C. El gas acarreador fue Helio a 30 psi. El flujo del Split fue de 50ml por minuto. Las condiciones iniciales de la columna fueron 60°C, luego aumentando a 200° a una razón de 6°C por minuto, comenzando al momento de la inyección. [46]

Preparación de la solución de la muestra: Se transfirió 90mg de eucaliptol, pesados en una balanza analítica, a un balón de aforo de 100 mL; el disolvente fue metanol para aforar al volumen.[46]

Preparación de la solución del estándar: Se preparó una solución de Butirato de Amilo (10 %) en metanol.Se corrió la solución del estándar [46]

4.5.4. Ensayo *in vitro*: determinación de la CMI del aceite esencial de eucalipto

En el laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala: Se determinó la CMI utilizando el método de dilución seriada en caldo, el cual según Balouiri *et.al*, es el más apropiado para determinar la concentración mínima inhibitoria, pues permite determinar la concentración del agente antimicrobiano en el caldo utilizado.[47]

Un inóculo de *S. aureus* y *P. aeruginosa* fue ajustado al estándar de Mc.Farland 0.5 e

incubado durante 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. en infusión cerebro-corazón (BHI).[48]

En tubos con rosca que contenían 9ml de Caldo Müeller Hinton (MHB), el cual se utilizó como medio en las placas de microdilución, se vertió $100 \mu\text{l}$ de una de las bacterias que se incubaron en BHI. Se mezcló utilizando un vórtex.[48]

Posteriormente se procedió a llenar los pozos de la placa de microdiluciones con $50 \mu\text{l}$ del tubo con MHB contaminado con la bacteria y $50 \mu\text{l}$ del aceite esencial de eucalipto. Se realizaron diluciones desde 1:2 hasta 1:1048576 en triplicado por cada bacteria. En el siguiente cuadro se muestra el orden de las diluciones en las microplacas.

Posterior a su preparación, se procedió a incubar las cajas durante 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ [48] y se leyó cada una en un lector de absorbancia de microplacas BioTek.

Asimismo, se procedió a utilizar un método colorimétrico para determinar la dilución en donde inició el crecimiento [47] utilizando TTC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:28	1:256	1:512	1:1004	1:2048	1:4096
B	AEE y MHB	AEE y MHB	AEE	AEE	1:1048576	1:524288	1:262144	1:131072	1:65536	1:32768	1:16384	1:8192
C												
D	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:28	1:256	1:512	1:1004	1:2048	1:4096
E	AEE y MHB	AEE y MHB	AEE	AEE	1:1048576	1:524288	1:262144	1:131072	1:65536	1:32768	1:16384	1:8192
F												
G	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:28	1:256	1:512	1:1004	1:2048	1:4096
H	AEE y MHB	AEE y MHB	AEE	AEE	1:1048576	1:524288	1:262144	1:131072	1:65536	1:32768	1:16384	1:8192

Cuadro 5: Distribución de las microdiluciones en triplicado para cada microplaca analizada

Se muestra la disposición de los pozos en las microplacas y sus respectivas diluciones en triplicado.

4.5.5. Formulación de la emulsión

En Scentia Perfumería S.A.: Con base en los resultados obtenidos de la CMI del aceite esencial de eucalipto, se procedió a realizar la formulación utilizando este como conservante de la emulsión

Fase	Material/INCI	Porcentaje en la fórmula (%)
A	Agua desmineralizada	77.42
B	Cetareth-12	0.5
B	Cetareth-20	0.5
B	Alcohol cetosteárico	4.6
B	Aceite de maíz	4.7
B	Aceite de girasol	3.5
C	Sorbitol	3.5
C	Glicerina	1.5
C	Propilenglicol	2
C	Poliacrilato de Sodio	0.22
C	Aceite esencial de eucalipto	1.56
	SUMA	100 %

Cuadro 6: Formulación de la emulsión facial

El sorbato de potasio se utilizó a una concentración del 0.15 % en sustitución del aceite esencial de eucalipto y se ajustó el porcentaje restante con agua. El control positivo que no contenía conservantes igualmente se ajustó con agua.

Con la emulsión hecha, se procedió a analizar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto y su comparación con sorbato de potasio en ésta, para bacterias aerobias.

4.5.6. Ensayo *in-vitro*: crecimiento bacteriano en placa de la emulsión facial

En el laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala: El método de evaluación bacteriológico para la emulsión fue el método BAM (Bacteriological Analytical

Manual) aprobado por la FDA, en 2017. El procedimiento que a continuación se detalla fue utilizado tanto para la emulsión que contenía el aceite esencial de eucalipto, para la emulsión que contenía sorbato de potasio y para el control positivo. Asimismo, todo el procedimiento se encuentra en ese manual.

Inoculación de la muestra

Se añadió un volumen de 100 μ de un inóculo de 1×10^6 de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, por separado en cada crema. Se incubaron a temperatura ambiente durante dos días y posteriormente se efectuó el recuento bacteriano según el procedimiento de la FDA (Food and Drug Administration). De los resultados obtenidos se discutió la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto en el producto.

Manejo de muestras cosméticas para análisis microbiológico

Las muestras debieron ser analizadas lo antes posible. Se desinfectó el área de trabajo con una mezcla de etanol (ac) 70 % v/v, antes de comenzar el análisis. Se utilizó 1g de muestra según lo recomendado por la FDA.[49]

Preparación preliminar de la muestra

En el caso de la emulsión, se removió de manera aséptica la muestra a tomar y se pesó 1g en tubos con tapa que contenían 1 ml de Tween 80 estéril. Se mezcló todo el contenido del tubo con un vórtex y se ajustó el volumen a 10 ml con 8 ml de Caldo Modificado Lethen (MLB) estéril, para obtener una dilución 10^{-1} . A partir de esta dilución se generaron las demás.[49]

Evaluación microbiológica

Para el conteo en placa de microorganismos aerobios Se utilizó el método de regado en placa por facilidad de identificación de las colonias. Se diluyó la preparación cosmética obtenida en la sección “preparación preliminar de la muestra” utilizando MLB para obtener

una serie de diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} (obteniendo factores de dilución de 100, 1000, 10.000, 100.000 y 1.000.000 respectivamente).[49]

Para la preparación de las diluciones, se comenzó con la dilución 10^{-1} y utilizando una pipeta estéril limpia, se transfirieron 1.0 ml de esta dilución a 9 ml de MLB, para obtener una dilución 10^{-2} . Se repite este paso para obtener la tercera dilución, partiendo de la dilución anterior. Las diluciones fueron realizadas en triplicado. [49]

En las placas con Agar Lethen Modificado (MLA) previamente preparadas, se vertió en cada una, por separado, 0.1 ml de cada una de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}). Las pruebas se trabajaron por duplicado de cada dilución. [49]

Se esparció el inóculo utilizando esparcidores estériles, utilizando uno por dilución. Se dejó que el MLA absorbiese el inóculo previo a la incubación. Una vez absorbido la muestra diluida, se incubó durante 48 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. [49]

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar el conteo de colonias de cada placa de las cinco diluciones. Se calcula y se reporta el número de colonias aerobias que crecieron utilizando el método que indica el BAM del conteo convencional de conteo en placa.[49]

Presentación de conteo de colonias aerobias

Se debió reportar las APC (conteo en placa de aerobios) /g. Si no se obtuvieron colonias en el MLA, se reporta como $< 10 = \text{“} \text{” UFC/g = \text{“} \text{”}$, donde UFC significa Unidades Formadoras de Colonias [50]. En caso existiese la presencia de colonias, se clasifican como:

1. Entre 25-250 UFC. [50]
2. Placas con más de 250 UFC: cuando todas las diluciones en todas las placas exceden este número, se registran como MNPC (Muy Numerosas Para Contar). [50]
3. Esparcimientos: Las colonias esparcidas pueden ser de tres tipos 1) una cadena de colonias 2) una colonia que se incubó entre el agar y el plato en una gota de agua 3) colonia desarrollada en agua en la superficie del agar o en la orilla de la placa. [50]

4. Placas sin UFC: cuando no hay crecimiento se reporta como “menor a 1 vez de la dilución más pequeña”. [50]

Para las placas con 25-250 UFC, se tomó en cuenta únicamente las placas que contuviesen UFC's dentro de este rango. Si existieron placas dentro del conteo en duplicado que cayeran fuera de este rango, esas placas no fueron tomadas en cuenta para el conteo de este rango. Se calculó el conteo en placa aerobio (APC) como:

$$N = \sum \frac{C}{[(1 * n_1) + (1 * n_2) * d]} = APC$$

En donde n representa el conteo de UFC y d la dilución. [50]

Para las placas con menos de 25 UFC se siguieron los mismos criterios de inclusión que para las placas de 25-250 UFC y se calculó el APC como:

$$25 * \frac{1}{d} = APC$$

en donde d representa la dilución de la placa. [50]

Para las placas con más de 250 UFC, pero con menos de 100 UFC/cm², se estimó el número de UFC con el estimado más cercano a 250 y se multiplica por la dilución (EAPC: conteo en placa de aerobios estimado). [50]

4.5.7. Pruebas físicas

Se le medirá el pH utilizando un potenciómetro y la estabilidad utilizando una centrífuga a 3000 rpm/15 minutos.

4.6. Diseño de investigación

Diseño experimental comparativo de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto contra el sorbato de potasio en una emulsión facial de uso cosmético.

4.7. Análisis estadístico

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se determinó la normalidad de los datos. Luego, se utilizó la prueba no paramétrica de Scheirer Ray (Hare test) se vio el efecto de los tratamientos y diluciones. Como prueba Post Hoc se utilizó la prueba de Dunn.

5. MARCO OPERATIVO

5.1. Recabación y colecta de datos

Los datos serán analizados utilizando el programa Microsoft Excel con el paquete estadístico Real Statistics.

5.2. Recursos

Humanos

- Autor: Alexia Higueros
- Asesor principal: Licenciado Mario Sarceño
- Asesor secundario: Licenciado Víctor Jiménez
- Colaborador: Doctor Elfego Rolando López
- Colaboradora: Licenciada Ana Luisa Mendizabal

Materiales

Equipos

- 1 cromatógrafo de gases con detector de espectro de masas
- 1 computadora laptop
- 1 agitador de laboratorio
- 1 potenciómetro
- 1 centrífuga
- 1 incubadora
- 1 balanza analítica
- 1 balanza semi-analítica
- 1 lector de placas ELISA
- 1 autoclave

Materiales y cristalería

- Metanol
- Aceite esencial de Eucalipto
- Butirato de amilo
- Ceteareth-12
- Ceteareth-20
- Alcohol cetosteárico
- Aceite de maíz
- Aceite de girasol

- Sorbitol
- Glicerina
- Propilenglicol
- Sorbato de potasio
- Poliacrilato de sodio
- Agar Müeller-Hinton
- Caldo neutralizante D/E
- Agar Lethen
- Caldo Lethen
- Tween 80
- Tubos con tapón de rosca 20 x 125 mm
- Cajas Petri estériles desechables 60 x 15 mm
- Cajas Petri estériles desechables 90 x 15 mm
- Mechero
- Chispero
- Vidrios de reloj
- Probetas
- Pipetas volumétricas
- Micropipeta
- Puntas de micropipetas de 100-1000 μl con caja autoclaveable con orificio ancho marca 3M
- Beakers
- Filtro para jeringa Millex-HV 0.45 μm

- Jeringa 10ml
- Cajas elisa 96 pozos estériles

6. RESULTADOS

Concentración real de cineol (%) [X]	Respuesta del equipo (ratio) [Y]
0.526	3162646
1.052	4750617
3.156	15826142
4.208	21130763

Cuadro 7: Datos crudos de la curva de calibración del eucaliptol determinados mediante GC/MS

Se muestra en el cuadro anterior la concentración real cuatro puntos de la curva de calibración para el estándar de 1,8-cineol determinada mediante GC/MS.

Corrida Muestra	Respuesta del equipo	Concentración de cineol en la solución (%)
1	8200733	1.63
2	7669121	1.52
3	9654105	1.92

Cuadro 8: Concentración de cineol en la solución inyectada al equipo

Se muestra en el cuadro anterior la respuesta del equipo para las muestras de aceite esencial de eucalipto para determinación del eucaliptol y su correspondiente concentración en la solución inyectada.

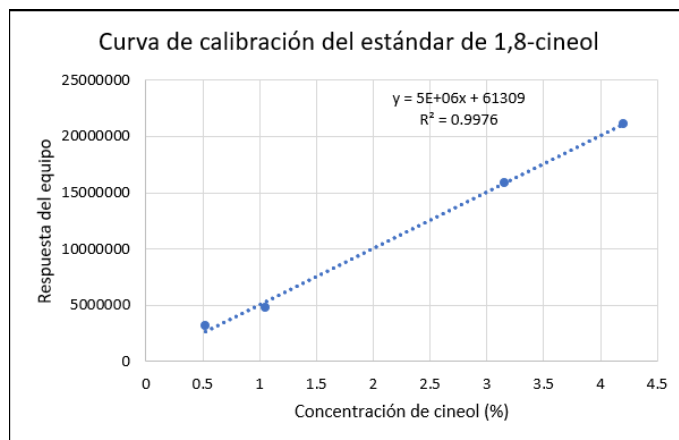


Figura 2: Curva de calibración del 1,8-cineol

Se muestra en la figura anterior la curva de calibración del estándar de 1,8-cineol determinada mediante GC/MS para determinación de la concentración de este metabolito en las muestras. Se observa que el coeficiente de correlación es de 0.9976.

Corrida de la muestra	Concentración (%) cineol en el aceite puro
1	40.69712
2	38.03906
3	47.96398
Promedio	42.23338667

Cuadro 9: Concentración de eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto analizada

Se muestra en el cuadro anterior la concentración de eucaliptol en la muestra de aceite esencial de eucalipto analizada. Se realizó la corrida en triplicado y se determina que el porcentaje de eucaliptol promedio fue de 42.23

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.096	0.133	0.104	0.077	0.06	0.13	0.265	0.353	0.329	0.482	0.414	0.328
B	0.187	0.076	1.426	1.439	0.13	0.126	0.339	0.306	0.349	0.362	0.392	0.367
C												
D	0.095	0.101	0.123	0.112	0.069	0.075	0.254	0.357	0.272	0.343	0.378	0.432
E	0.092	0.099	1.454	1.466	0.087	0.091	0.229	0.414	0.279	0.373	0.382	0.352
F												
G	0.196	0.126	0.118	0.08	0.079	0.062	0.165	0.388	0.284	0.366	0.374	0.374
H	0.098	0.078	1.443	1.447	0.082	0.124	0.299	0.394	0.5	0.344	0.375	0.375

Cuadro 10: Absorbancia de las microdiluciones de AEE probadas en *S. aureus* leídas a 630 nm

Se muestra en la tabla anterior los resultados en triplicado de la lectura de absorbancia a 630nm de las microdiluciones del aceite esencial para evaluar su actividad ante *S. aureus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.074	0.112	0.095	0.115	0.069	0.067	0.321	0.363	0.267	0.341	0.305	0.312
B	0.123	0.087	1.41	1.38	0.093	0.346	0.306	0.332	0.282	0.297	0.315	0.452
C												
D	0.169	0.172	0.166	0.109	0.091	0.108	0.075	0.081	0.381	0.292	0.308	0.28
E	0.143	0.141	1.379	1.458	0.084	0.043	0.127	0.298	0.362	0.278	0.295	0.354
F												
G	0.122	0.097	0.1	0.091	0.074	0.064	0.27	0.272	0.276	0.278	0.337	0.277
H	0.104	0.112	1.304	1.367	0.095	0.177	0.331	0.333	0.305	0.315	0.331	0.308

Cuadro 11: Absorbancia de las microdiluciones de AEE probadas en *S. aureus* leídas a 630 nm

Se muestra en la tabla anterior los resultados en triplicado de la lectura de absorbancia a 630nm de las microdiluciones del aceite esencial para evaluar su actividad ante *S. aureus*. Duplicado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.072	0.088	0.1	0.083	0.054	0.25	0.362	0.379	0.366	0.452	0.503	0.475
B	0.104	0.123	1.286	1.361	0.109	0.255	0.37	0.37	0.38	0.443	0.472	0.523
C												
D	0.079	0.087	0.098	0.095	0.067	0.128	0.306	0.38	0.379	0.415	0.443	0.502
E	0.116	0.132	1.308	1.489	0.074	0.185	0.308	0.372	0.373	0.395	0.445	0.468
F												
G	0.23	0.092	0.094	0.09	0.063	0.147	0.401	0.366	0.376	0.436	0.476	0.492
H	0.108	0.105	1.21	1.224	0.081	0.283	0.378	0.343	0.379	0.428	0.465	0.475

Cuadro 12: Absorbancia de las microdiluciones de AEE probadas en *P. aeruginosa* leídas a 630 nm

Se muestra en la tabla anterior los resultados en triplicado de la lectura de absorbancia a 630nm de las microdiluciones del aceite esencial para evaluar su actividad ante *P. aeruginosa*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.4	0.091	0.099	0.08	0.056	0.407	0.339	0.375	0.395	0.459	0.461	0.495
B	0.126	0.123	1.003	1.009	0.284	0.336	0.282	0.326	0.341	0.443	0.48	0.531
C												
D	0.148	0.08	0.105	0.078	0.067	0.25	0.384	0.354	0.376	0.393	0.439	0.456
E	0.114	0.121	1.18	1.441	0.108	0.309	0.353	0.3	0.319	0.398	0.522	0.462
F												
G	0.165	0.07	0.079	0.081	0.292	0.315	0.353	0.447	0.403	0.51	0.549	558
H	0.102	0.114	1.107	1.188	0.357	0.392	0.321	0.343	0.39	0.403	0.452	0.515

Cuadro 13: Absorbancia de las microdiluciones de AEE probadas en *P. aeruginosa* leídas a 630 nm

Se muestra en la tabla anterior los resultados en triplicado de la lectura de absorbancia a 630nm de las microdiluciones del aceite esencial para evaluar su actividad ante *P. aeruginosa*. Duplicado.

Aceite Esencial de Eucalipto	Sorbato de Potasio	Sin Conservantes
5.65	5.52	5.94
5.35	5.47	5.72
5.72	5.29	5.41
Promedio		
5.57	5.43	5.69

Cuadro 14: pH de las emulsiones con los diversos conservantes

Los datos del cuadro anterior muestran que el pH de las emulsiones faciales que contenían distintos conservantes se encontraban dentro del rango de 5.4-5.7, siendo en promedio 5.57 para la emulsión con aceite esencial de eucalipto como único conservante, 5.43 para la emulsión con sorbato de potasio y 5.69 para la emulsión que no contenía conservantes. Dichos valores se encuentran dentro de especificaciones cosméticas para emulsiones cutáneas.

Muestra	Recuento (UFC/g)	Dilución
Aceite esencial eucalipto		
	100	-2
	50	-2
Sorbato de potasio		
	33000	-4
	10000	-4
Sin conservantes		
	3 x 10 ⁸	-6
	3 x 10 ⁸	-6

Cuadro 15: APC de la emulsión contaminada con *P. aeruginosa* para los conservantes evaluados

Los datos del cuadro anterior muestran el conteo microbiano en placa para la emulsión contaminada con *P. aeruginosa* en presencia de los preservantes: aceite esencial de eucalipto, sorbato de potasio y un control positivo sin conservantes. Se observa que el aceite esencial de eucalipto produjo un mayor efecto inhibitorio del crecimiento de la bacteria al solo haber entre 50-100 UFC/g.

Muestra	Recuento (UFC/g)	Dilución
Aceite esencial eucalipto		
	2000	-2
	150	-2
Sorbato de potasio		
	8400000	-4
	1000000	-4
Sin conservantes		
	3 x 10 ⁸	-6
	3 x 10 ⁸	-6

Cuadro 16: APC de la emulsión contaminada con *S. aureus* para los distintos conservantes evaluados

Los datos del cuadro anterior muestran el conteo microbiano en placa para la emulsión contaminada con *S. aureus* en presencia de los preservantes: aceite esencial de eucalipto, sorbato de potasio y un control positivo sin conservantes. Se observa que el aceite esencial de eucalipto produjo un mayor efecto inhibitorio del crecimiento de la bacteria al solo haber entre 150-2000 UFC/g.

ANOVA				Alpha	0.05	
	SS	df	MS	H	p-value	sig
Rows	1020.1875	4		11.4975618	0.02150609	yes
Columns	810	1		9.12873862	0.00251625	yes
Inter	858.9375	4		9.68026658	0.04617209	yes
Within	771.375	30				
Total	3460.5	39	88.7307692			

Cuadro 17: Prueba estadística Scherirer Ray para *P. aeruginosa*

Se muestra en el cuadro anterior los resultados de la prueba estadística Scheirer Ray para determinar si existe diferencia significativa entre los las diluciones (rows) probadas para conteo microbiano y los conservantes (columns) sorbato de potasio y aceite esencial de eucalipto. Se observa que existe diferencia significativa para ambos según el valor p.

ANOVA				Alpha	0.05	
	SS	df	MS	H	p-value	sig
Rows	951.6875	4		8.402946	0.07788428	no
Columns	2371.6	1		20.9400951	4.7387E-06	yes
Inter	690.8375	4		6.09976511	0.19182061	no
Within	402.875	30				
Total	4417	39	113.25641			

Cuadro 18: Prueba estadística Scherirer Ray para *S. aureus*

Se muestra en el cuadro anterior los resultados de la prueba estadística Scheirer Ray para determinar si existe diferencia significativa entre los las diluciones (rows) probadas para conteo microbiano y los conservantes (columns) sorbato de potasio y aceite esencial de eucalipto. Se observa que existe diferencia significativa para los conservantes pero no para las diluciones, según el valor p.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El propósito de esta investigación fue evaluar si el aceite esencial de eucalipto comercial es efectivo como único conservante antimicrobiano natural, en una emulsión cosmética facial hidratante, en comparación con sorbato de potasio como conservante sintético. Las cepas evaluadas fueron *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Previo a la evaluación de la actividad antimicrobiana se determinó la concentración de eucaliptol (también llamado cineol) en el aceite esencial de eucalipto, por ser este el metabolito mayoritario y que se especula tiene la mayor parte de la actividad antimicrobiana.

Se determinó la concentración de cineol mediante un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas. Se cuantificó la concentración de este metabolito en la muestra comercial de aceite esencial de eucalipto siendo esta 390.63 mg eucaliptol/ ml de aceite esencial de eucalipto. Esto corresponde a un 42.23% de cineol en la muestra, como se observa en el cuadro 9 de la sección de resultados.

El Cosmetic Ingredient Review indica que el aceite esencial de eucalipto es aquél extraído de las hojas de *Eucalyptus* y contiene alrededor de 50-61% de eucaliptol, según la especie [43]. Asimismo, existe variedad de estudios realizados para determinar la composición metabólica de diversos géneros de esta familia. González, et.al en 2016 [28], indicó que la concentración de eucaliptol de una muestra de *Eucalyptus globulus* fue de 55.49%, lo que concuerda con muchos más estudios realizados por otros autores. A partir de los datos obtenidos para la muestra en cuestión, se infiere que este aceite comercial está diluido y no es puro, ya que su concentración de cineol es al menos 10% menor a los datos reportados. Benyelles, et.al indica que existe una correlación directa entre la variabilidad de la composición de

los aceites esenciales y la altitud de siembra y el tipo de tierra [51]. Asimismo, depende de otros factores tales como la recolección de las hojas, secado y método de extracción, por mencionar algunos.

Previo a evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de eucalipto. Se utilizó el método de dilución en caldo en microplacas de 96 pozos, ya que no existe un método estandarizado y catalogado como óptimo para determinación de esta concentración en extractos vegetales y Balouiri, *et.al*, recomienda este al ser rápido y eficaz [47]. Las condiciones utilizadas se describen en la sección de procedimiento y fueron según las recomendaciones del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés).

Para determinar efectivamente la CMI se utilizó el método espectroscópico a 630 nm para verificar en qué dilución la concentración bacteriana aumentaba significativamente. Se encontró que la CMI para ambas cepas bacterianas fue la dilución 1:64 que corresponde a 6.10 mg/ml del aceite esencial de eucalipto. Como se observa en los cuadros 10-13 de la sección de resultados, la absorbancia cambia en la columna 6 de la mayoría de las réplicas; dicha columna correspondía a la dilución 64 del aceite en MLB.

Tal y como reporta Mulyaningsih, *et.al*, la CMI para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) es mayor a 4 mg/ml [48]. Asimismo, se utilizó un método colorimétrico como verificación y como se observa en la imagen 11 de la sección de anexos, la coloración rosa en el pozo de dicha dilución, la cual representa el crecimiento bacteriano detectado mediante una reacción de reducción del indicador añadido, Tetrazolio, a su compuesto coloreado, TTC, lo que indica que en ese punto el conservante, en este caso el aceite esencial de eucalipto, dejó de ser efectivo.

Se deduce entonces que a pesar de que el aceite tiene una menor concentración de eucaliptol que lo reportado por otros autores, este metabolito no es el único que presenta la actividad antimicrobiana. Otros metabolitos presentes en el aceite, así como la sinergia entre ellos dependiendo la concentración, pueden ser capaces de inhibir el crecimiento microbiano.

Una vez determinada la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de eucalipto, se procedió a formular una emulsión facial que contuvo una sexagésima cuarta parte de este como único conservante. Se formuló una crema con sorbato de potasio al 0.15 % que se

encuentra dentro del rango recomendado por Rowe, *et.al* [52] como control negativo y una emulsión sin conservantes como control positivo.

El recuento antimicrobiano se siguió según el método BAM de la FDA para cosméticos y se muestra el conteo en los Cuadros 15 y 16 de la sección de resultados. En el Cuadro 15 se observa que la última dilución medible para la emulsión contaminada con 100 microlitros de un inóculo de 1×10^6 de *P. aeruginosa* con aceite esencial de eucalipto como conservante, fue un promedio de 75 UFC/g en la dilución 10^{-2} . En comparación con el sorbato de potasio, en donde la última dilución contable fue de 1×10^{-4} , se puede notar una clara disminución del crecimiento bacteriano en la emulsión que contenía AEE como único conservante en un factor de 1×10^4 UFC/g de crema para esta bacteria.

Observando el Cuadro 16, se presenta el APC para *S. aureus* en donde se observa de igual manera una disminución de crecimiento de 1×10^{-3} entre la muestra con sorbato de potasio como único conservante y la muestra con aceite esencial de eucalipto, la cual presenta únicamente entre 150-2000 UFC/g de crema. Por tanto, empíricamente se acepta la hipótesis en tanto el producto facial que contiene aceite esencial en la formulación sí inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Estadísticamente, se evaluó la normalidad de los datos únicamente para las diluciones con sorbato de potasio y para aquellas con aceite esencial de eucalipto mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se determinó que no existe normalidad en los datos. Como un supuesto para el análisis estadístico fue que todas aquellas muestras analizadas que fueron MNPC, fueron tomadas como un valor de 3000 UFC/g, pues este es un valor aproximado mínimo del número de colonias que crecieron.

Como se observa en el Cuadro 17, para *P. aeruginosa*, existe una diferencia significativa entre los tipos de conservantes (sorbato de potasio y aceite esencia de eucalipto) y las diluciones analizadas. Se encontró mediante la prueba Post Hoc de Dunn que existe diferencia significativa del número de UFC/g que crecieron entre los tratamientos con AEE y sorbato de potasio en las diluciones 1×10^{-2} ($p=0.006$, $\alpha = 0.05$) y 1×10^{-3} ($p<0.001$, $\alpha = 0.05$). Lo anterior indica que a concentraciones altas de bacterias, el aceite esencial de eucalipto es más efectivo en inhibición del crecimiento de las mismas, que el sorbato de potasio.

Para la misma bacteria a diluciones 1×10^{-4} ($p= 0.54$, $\alpha = 0.05$), 1×10^{-5} ($p= 0.92$, $\alpha = 0.05$)

y 1×10^{-6} ($p=1$, $\alpha = 0.05$) no existe diferencia significativa, por lo que ambos conservantes son igualmente efectivos.

Como se observa en el Cuadro 18, para *S. aureus* sí existe diferencia significativa entre los conservantes utilizados (sorbato de potasio y AEE), pero no existe diferencia significativa entre las diluciones y la efectividad de los conservantes, según el valor p. Sin embargo, si se observa el valor p para las diluciones (rows), se observa que es muy cercano al α de 0.05, por lo que de igual manera se evaluó las interacciones mediante la prueba Post Hoc de Dunn.

Se determina entonces que: para *S. aureus* existe diferencia significativa del número de UFC/g que crecieron en la placa entre los conservantes utilizados (AEE y sorbato de potasio) para las diluciones 1×10^{-2} ($p=0.041$, $\alpha = 0.05$), 1×10^{-3} ($p=0.003$, $\alpha = 0.05$), 1×10^{-4} ($p=0.001$, $\alpha = 0.05$) y 1×10^{-5} ($p=0.03$, $\alpha = 0.05$).

No existe diferencia significativa en el crecimiento bacteriano entre las muestras con los distintos conservantes a la dilución 1×10^{-6} ($p=1$, $\alpha = 0.05$).

Con base en los resultados, para *P. aeruginosa* se rechaza la hipótesis nula, por lo que se acepta la alternativa: .^{El} producto facial que contiene aceite esencial en la formulación inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.^{en} las diluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-3} . Para *S. aureus* se rechaza la hipótesis nula e igualmente se acepta la hipótesis alternativa para todas las diluciones desde 1×10^{-2} - 1×10^{-5} .

Fue la determinación de la concentración mínima inhibitoria un punto importante en esta investigación, pues no existe una metodología establecida y validada para la determinación de la CMI del aceite esencial de eucalipto o de aceites esenciales en sí. Por tanto, se recomienda la posible validación del método de determinación de la CMI en estos extractos. Asimismo, es importante mantener el criterio a la hora de determinar este valor, pues muchos trabajos publicados utilizan el método de difusión por disco, pero se debe recordar que este método únicamente indica la sensibilidad de un microorganismo hacia un agente inhibitorio de su crecimiento, más no la cuantificación precisa de la concentración mínima inhibitoria.

Es importante recordar que a nivel industrial la contaminación de un producto, en este caso cosmético, impone una pérdida económica pues este debe ser destruido. Entonces, para evitar esto, a parte de tener condiciones óptimas de fabricación, proveedores calificados y

cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), la formulación debe ser adecuada y tener los conservantes óptimos. En aras de una menor contaminación por parte de la industria farmacéutica se probó utilizar únicamente un aceite esencial, una sustancia no regulada por los estándares de fabricación, como conservante y su correspondiente comparación con sorbato de potasio, un conservante aceptado por ECOCERT [22] para utilizar conservantes 100% orgánicos. Los resultados fueron prometedores.

Sin embargo, es importante reconocer y recordar que los productos sintéticos no son todos malos, así como los productos naturales no son todos útiles y buenos. El uso de ingredientes sintéticos ha ayudado a mejorar la vida útil de los productos, pero debe siempre tenerse en cuenta qué tipo de conservantes se utilizan, ya que existen riesgos con aquellos donadores de formol, isotiazolinonas cloradas, parabenos, fenoxietanol, entre otros, no solo para el ambiente sino especialmente para el usuario. El uso de aceite esencial de eucalipto en conjunto con conservantes sintéticos aprobados por ECOCERT [22] podrían ser una opción a reducir su uso y mantener ingredientes naturales y libres de riesgo en las formulaciones.

8. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de eucalipto es efectivo como conservante pues inhibió el crecimiento de 1×10^2 UFC/g de *S. aureus* y en 1×10^3 UFC/g para *P. aeruginosa*.
2. La evidente efectividad del aceite esencial de eucalipto como agente inhibitorio del crecimiento bacteriano para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, no debe considerarse como suficiente evidencia para ser utilizado como único preservante en un producto para venta.
3. La muestra comercial de aceite esencial de eucalipto contiene 42.23 % de eucaliptol, lo que corresponde a 390.63 mg/ml.
4. La concentración mínima inhibitoria de la muestra de aceite esencial de eucalipto analizado, con un 42.23 % de cineol en su composición, para las cepas bacterianas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* fue de 6.10 mg/ml, correspondiente a dilución 1:64 del mismo.
5. Se determinó que a altas concentraciones de carga bacteriana, el aceite esencial de eucalipto es más inhibitorio que el sorbato de potasio, para las bacterias analizadas.

9. RECOMENDACIONES

1. Desarrollo de otros estudios en donde se prueben distintas formulaciones para evaluar si los porcentajes de grasas o de agua son variables que afectan la efectividad del conservante.
2. Dado que en esta investigación únicamente se evaluó la actividad del aceite contra dos cepas bacterianas se debe considerar la realización de la prueba con otros microorganismos como hongos y otras bacterias.
3. Evaluación de la composición completa del aceite esencial de eucalipto y sus porcentajes para la identificación de otros posibles metabolitos con actividad antimicrobiana y así tener un mejor entendimiento del comportamiento del aceite.
4. Uso de otras muestras de aceite esencial de eucalipto para evaluar si existe diferencia significativa entre muestras que presenten distintas concentraciones de metabolitos y por ende distintas CMI's. Análisis minucioso y con criterio científico de las publicaciones utilizadas, pues la determinación de la CMI fue uno de los pasos retadores del estudio ya que no existen métodos validados para su determinación en aceites esenciales.
5. Determinación del crecimiento bacteriano durante un periodo más largo de tiempo, en mayor cantidad de réplicas y realización de controles periódicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Kestenbaum, *The Biggest Trends In The Beauty Industry*, sep. de 2018. dirección: <https://www.forbes.com/sites/richardkestenbaum/2018/09/09/beauty-industry-biggest-trends-skin-care-loreal-shiseido-lauder/#1ef0dc5e6982>.
- [2] R. G. Bachir y M. Benali, “Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, n.º 9, págs. 739-742, 2012. DOI: 10.1016/s2221-1691(12)60220-2.
- [3] F. Aldoghaim, G. Flematti y K. Hammer, “Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian *Eucalyptus* Essential Oils”, *Microorganisms*, vol. 6, n.º 122, págs. 1-11, mar. de 2018. DOI: 10.3390/microorganisms6040122.
- [4] *Productos personalizados y naturales son las tendencias 2018 para la industria cosmética*, feb. de 2018. dirección: <http://agexporthoy.export.com.gt/sectores-de-exportacion/sector-manufacturas/productos-personalizados-naturales-las-tendencias-2018-la-industria-cosmetica/>.
- [5] *Cuidado Personal en Guatemala: Cifras a Marzo 2018*. dirección: https://www.centralamericadata.com/es/article/home/Cuidado_Personal_en_Guatemala_Cifras_a_Marzo_2018..
- [6] E. Stuart, *Natural and Organic Beauty Had a Very Big Year*. dirección: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/marketdata/segments/Natural-and-Organic-Beauty-Had-a-Very-Big-Year-503048191.html>.

- [7] *El auge de la cosmética natural, ¿por qué tiene tanto éxito este sector?*, oct. de 2018. dirección: https://www.elplural.com/oxigena2/bienestar/el-auge-de-la-cosmetica-natural-por-que-tiene-tanto-exito-este-sector_121551102.
- [8] M. Marfilus, *Report: Skin Care Market to Near 200Billionby2024*. dirección: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/category/skincare/Skin-Care-Market-to-Near-200-Billion-by-2024-383721121.html>.
- [9] *Latin America Cosmetics Products Market: Latin America Cosmetics Products Market: Analysis, Trends, Forecast, Overview, Research, Opportunity, Growth and Potential*. dirección: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/Latin-america-cosmetics-products-market-industry>.
- [10] J. Gleason-Allured, *Natural and Organic Personal Care on Track to \$22 Billion by 2024*. dirección: <https://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/natural/Natural-and-Organic-Personal-Care-on-Track-to-22-Billion-by-2024-386495471.html>.
- [11] D. Herich, *The Natural Organic Beauty Consumer: 2008-2018*. dirección: <https://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/natural/The-Natural-and-Organic-Beauty-Consumer-487250721.html>.
- [12] A. Penning, *Preferences for Organic/Natural in Beauty and Personal Care See Growth Space*. dirección: https://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/natural/Preferences-for-OrganicNatural-in-Beauty-and-Personal-Care-See-Growth-Space-261828421.html?utm_source=Most+Read&utm_medium=website&utm_campaign=Most+Read.
- [13] *Global Organic Cosmetics Market Forecast Opportunities, 2021*, 2017. dirección: <https://www.techsciresearch.com/report/global-organic-cosmetics-market-forecast-opportunities-2021/610.html>.
- [14] E. Stuart, *Year-end Prestige Beauty Sales Preview*, 2019. dirección: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/marketdata/segments/Year-end-Prestige-Beauty-Sales-Preview-503814971.html>.
- [15] *Cosmetics and Colors*, 2019. dirección: <https://www.npanational.org/regulatory/food-and-drug-administration-fda/cosmetics-and-colors/>.

- [16] *NPA and NaTrue toward equivalency agreement for natural cosmetics*, 2019. dirección: <https://www.premiumbeautynews.com/en/NPA-and-NaTrue-toward-equivalency,1726?checklang=1>.
- [17] C. for Food Safety y A. Nutrition, *Small Businesses Homemade Cosmetics: Fact Sheet*, 2018. dirección: <https://www.fda.gov/Cosmetics/ResourcesForYou/Industry/ucm388736.htm#7>.
- [18] *National Organic Program*, 2019. dirección: <https://www.ams.usda.gov/about-ams/programs-offices/national-organic-program>.
- [19] *Natural and organic claims*, 2019. dirección: <http://www.ctpa.org.uk/content.aspx?pageid=431>.
- [20] C. Herrmann, *What you need to know about organic and natural skin care*, mar. de 2017. dirección: <https://www.beautycrew.com.au/the-difference-between-organic-natural-skin-care>.
- [21] N. Dayan y L. Kromidas, *Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products*. Wiley, 2011, vol. 1.
- [22] *About us*, abr. de 2019. dirección: <https://cosmos-standard.org/about/>.
- [23] Ene. de 2019.
- [24] B. K. H. Can. y G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, 2016.
- [25] N. Raaman, *Phytochemical techniques*. New India Pub. Agency, 2006.
- [26] M. Heinrich, J. Barnes, J. Prieto-Garcia, S. Gibbons y E. M. Williamson, *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book*, 2nd. Elsevier, 2018. dirección: <https://books.google.com.gt/books?id=NZXQAQAQBAJ&pg=PA79&dq=cyclic%20monoterpenes&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjm4rqB4ZHgAhVOUt8KHekoAr0Q6AEISjAE#v=onepage&q&f=false>.
- [27] A. I. Yermakov y A. L. Khlaifat, “Characteristics Of The GC-MS Mass Spectra Of Terpenoids (C₁₀H₁₆)”, *Chemical Sciences Journal*, vol. 1, n.º 1, págs. 1-10, 2010. DOI: 10.4172/2150-3494.1000005.

- [28] R. González-Guñez, G. Silva-Aguayo, A. Urbina-Parra y M. Gerding-González, “ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill Y *Eucalyptus nitens* H. Deane Maiden (MYRTACEAE) PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais* Motschulsky”, *Chilean journal of agricultural animal sciences*, n.º 32, págs. 204-216, 2016. DOI: 10.4067/s0719-38902016005000005. dirección: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0719-38902016000300005&lng=es&nrm=iso.
- [29] K. Sebei, F. Sakouhi, W. Herchi, M. Khouja y S. Boukhchina, “Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves”, *Biological Research*, vol. 48, n.º 1, págs. 7-11, 2015. DOI: 10.1186/0717-6287-48-7. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417289/>.
- [30] M. Rodas, “Universidad Rafael Landívar/ Análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor”, Tesis doct., URL, mayo de 2012. dirección: <http://biblio3.url.edu.gt/Tesis/2012/02/13/Rodas-Melisa.pdf>.
- [31] D. Kifer, V. Mužinić y M. Š. Klarić, “Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth”, *The Journal of Antibiotics*, vol. 69, n.º 9, págs. 689-696, 2016. DOI: 10.1038/ja.2016.10. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26883392>.
- [32] Y. Jiang, “Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 32, n.º 1, págs. 63-68, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668911000469>.
- [33] D. M. Bonilla, Y. Mendoza, C. E. Moncada, O. Murcia, Á. P. Murcia, J. Calle, R. Pinzón y L. Neuro, “Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada in vitro”, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 45, n.º 2, pág. 275, abr. de 2016. DOI: 10.15446/rcciquifa.v45n2.59942. dirección: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-74182016000200007.
- [34] A. Elaissi, K. H. Salah, S. Mabrouk, K. M. Larbi, R. Chemli y F. Harzallah-Skhiri, “Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species’ essential oils”,

- Food Chemistry*, vol. 129, n.º 4, págs. 1427-1434, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.100. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461100803X>.
- [35] A. Elaissi, Z. Rouis, N. A. B. Salem, S. Mabrouk, Y. B. Salem, K. B. H. Salah, M. Aouni, F. Farhat, R. Chemli, F. Harzallah-Skhiri y et al., “Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, n.º 1, págs. 1-15, 2012. DOI: 10.1186/1472-6882-12-81. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742534>.
- [36] T. P. Chaves, R. E. E. Pinheiro, E. S. Melo, M. J. D. S. Soares, J. S. N. Souza, T. B. D. Andrade, T. L. G. D. Lemos y H. D. Coutinho, “Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains”, *Industrial Crops and Products*, vol. 112, págs. 70-74, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.10.048. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669017307331>.
- [37] S. F. V. Vuuren y A. M. Viljoen, “Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination”, *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 22, n.º 6, págs. 540-544, 2007. DOI: 10.1002/ffj.1843. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.1843>.
- [38] *Eucalyptol*, 2019. dirección: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol#section=Top>.
- [39] Z. Jiang, C. Kempinski y J. Chappell, “Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids”, *Current Protocols in Plant Biology*, vol. 1, n.º 2, págs. 345-358, 2016. DOI: 10.1002/cppb.20024.
- [40] P. M. Dewick, *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Wiley, 2012.
- [41] *Showing metabocard for Eucalyptol (HMDB0004472)*. dirección: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0004472>.
- [42] *Safety survey of active ingredients used in cosmetics*. Council of Europe Pub., 2008, vol. 1. dirección: <https://books.google.com.gt/books?id=tWJLUWT06BEC&pg=>

PA133&dq=eucalyptol&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj1is_M76DgAhXlp1kKHWQiBUUsQ6AEIJjAA#v=onepage&q=eucalyptol&f=false.

- [43] B. Heldreth, *Safety assessment of cosmetic ingredients*. Sage Publications, Inc., 2018.
- [44] M. Aqil, A. Ahad, Y. Sultana y A. Ali, “Status of terpenes as skin penetration enhancers”, *Drug Discovery Today*, vol. 12, n.º 23-24, págs. 1061-1067, 2007. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.09.001.
- [45] K. A. Walters y M. S. Roberts, *Dermatologic, cosmeceutic, and cosmetic development: therapeutic and novel approaches*. Informa Healthcare, 2008, vol. 1.
- [46] *Eucalyptol*, 2018. dirección: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_m32430.html.
- [47] M. Balouiri, M. Sadiki y S. K. Ibnsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review”, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 6, n.º 2, págs. 71-79, dic. de 2015. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [48] S. Mulyaningsih, F. Sporer, J. Reichling y M. Wink, “Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens”, *Pharmaceutical Biology*, vol. 49, n.º 9, págs. 893-899, 2011. DOI: 10.3109/13880209.2011.553625.
- [49] C. for Food Safety y A. Nutrition, *BAM: Methods for Cosmetics*, 2017. dirección: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food-safety/bam-methods-cosmetics>.
- [50] —, *BAM: Aerobic Plate Count*, 2001. dirección: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-aerobic-plate-count>.
- [51] B. Benyelles, H. Allali, M. E. A. Dib, N. Djabou, J. Paolini y J. Costa, “Chemical Composition Variability of Essential Oils of *Daucus gracilis* Steinh. from Algeria”, *Chemistry Biodiversity*, vol. 14, n.º 6, 2017. DOI: 10.1002/cbdv.201600490. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212458>.
- [52] R. Rowe, P. Sheskey y M. Quinn, *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th. Pharmaceutical Press, 2012.
- [53] *Eucalyptol*, 2019. dirección: <https://www.restek.com/compound/view/470-82-6/1,8-Cineole>.

- [54] *Spectral Database for Organic Compounds, SDBS*, 2002. dirección: https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.

11. ANEXOS

11.1. Síntesis del eucaliptol

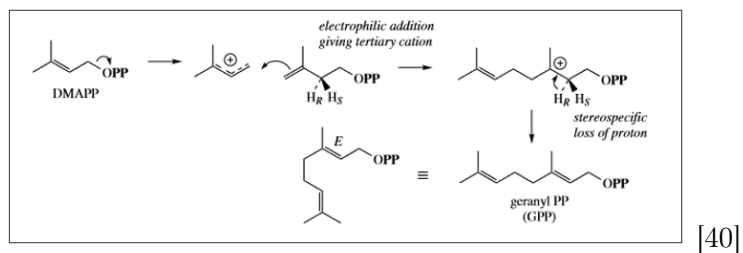


Figura 3: Síntesis inicial del Geranyl Pirofosfato

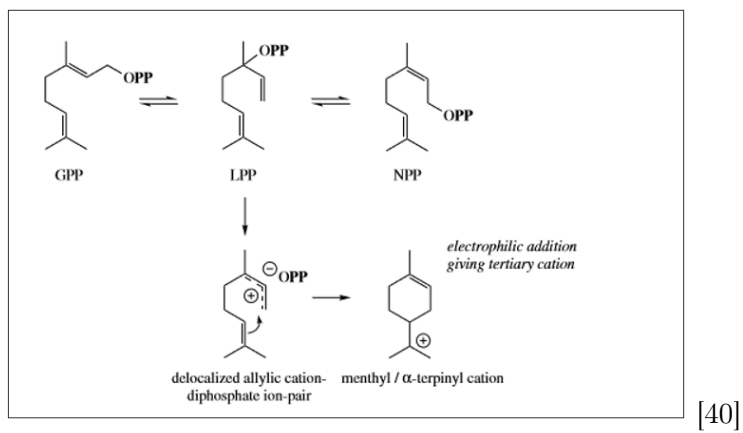
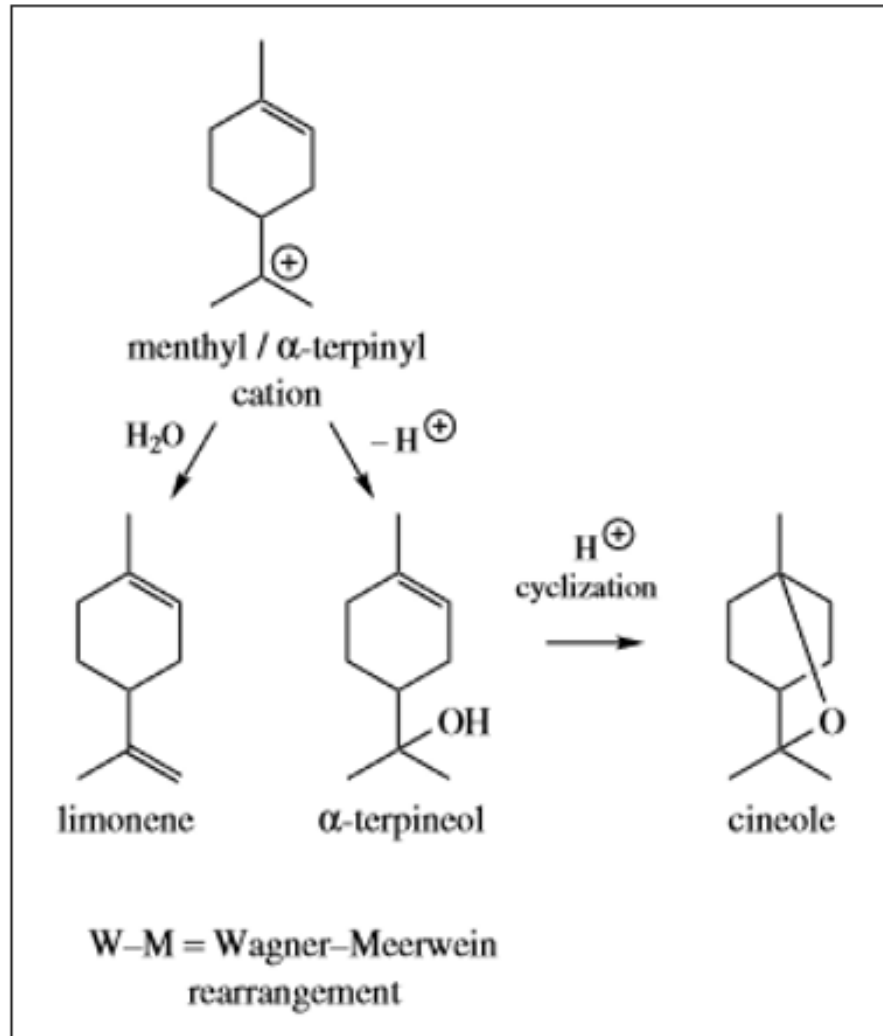


Figura 4: Síntesis del catión de mentil/ α -terpenil mediante rearrreglo del GPP



[40]

Figura 5: Síntesis de cineol (eucaliptol) a partir del catión de mentil/ α -terpenil

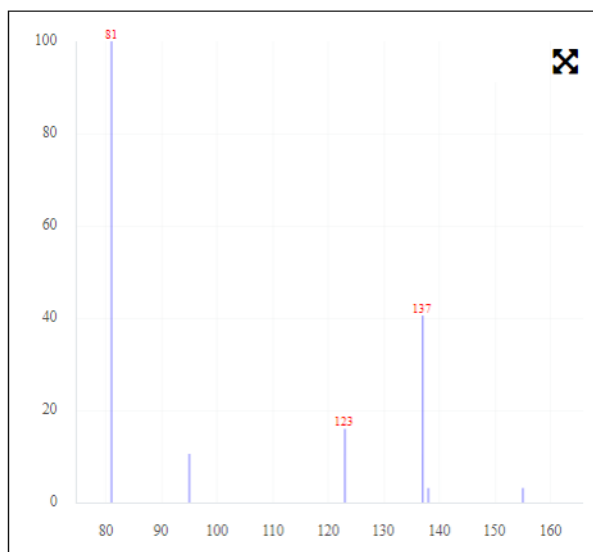


Figura 6: Espectro de GC/MS del eucaliptol (1)
[38]

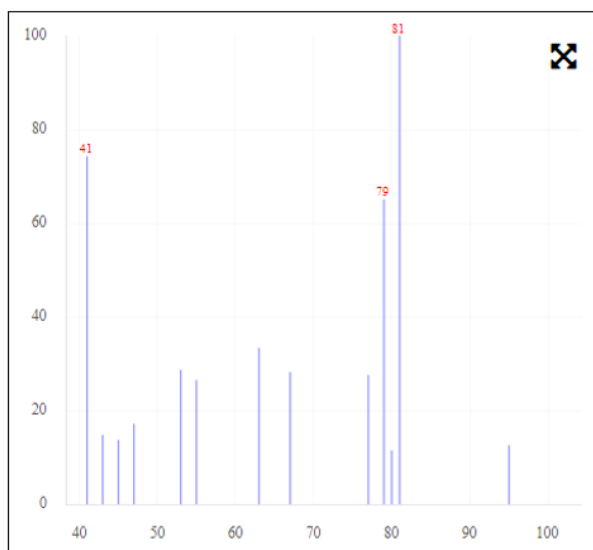


Figura 7: Espectro de GC/MS del eucaliptol (2)
[38]

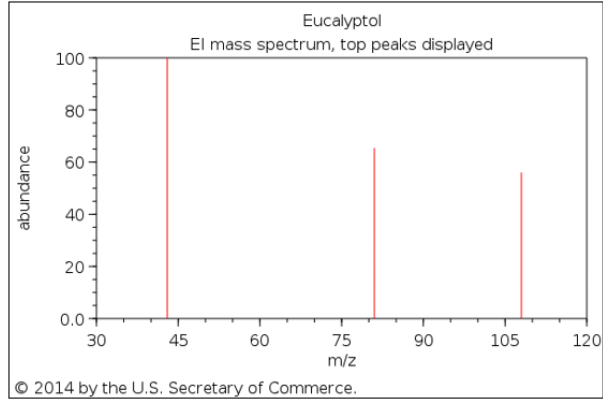


Figura 8: Espectro de GC/MS del eucaliptol (3)
[38]

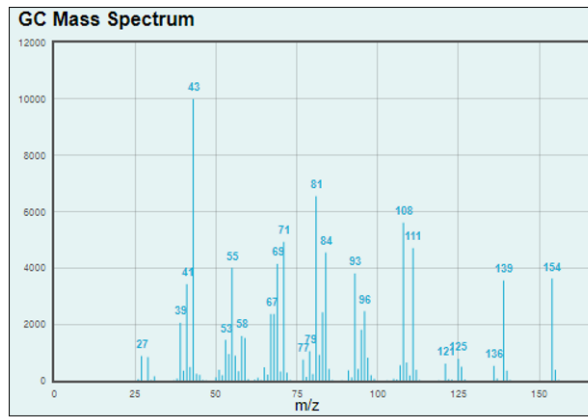


Figura 9: Espectro de GC/MS del eucaliptol (4)
[53]

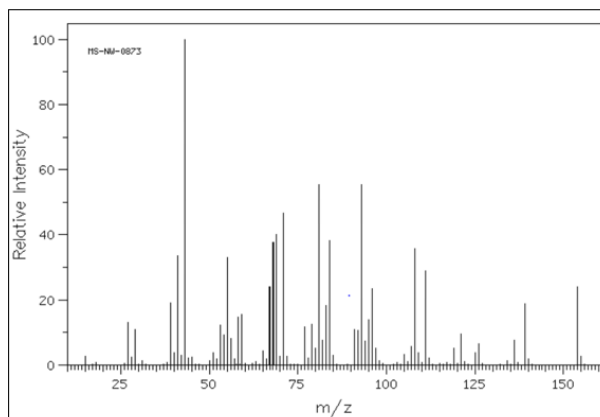


Figura 10: Espectro de GC/MS del eucaliptol (5)

[54]

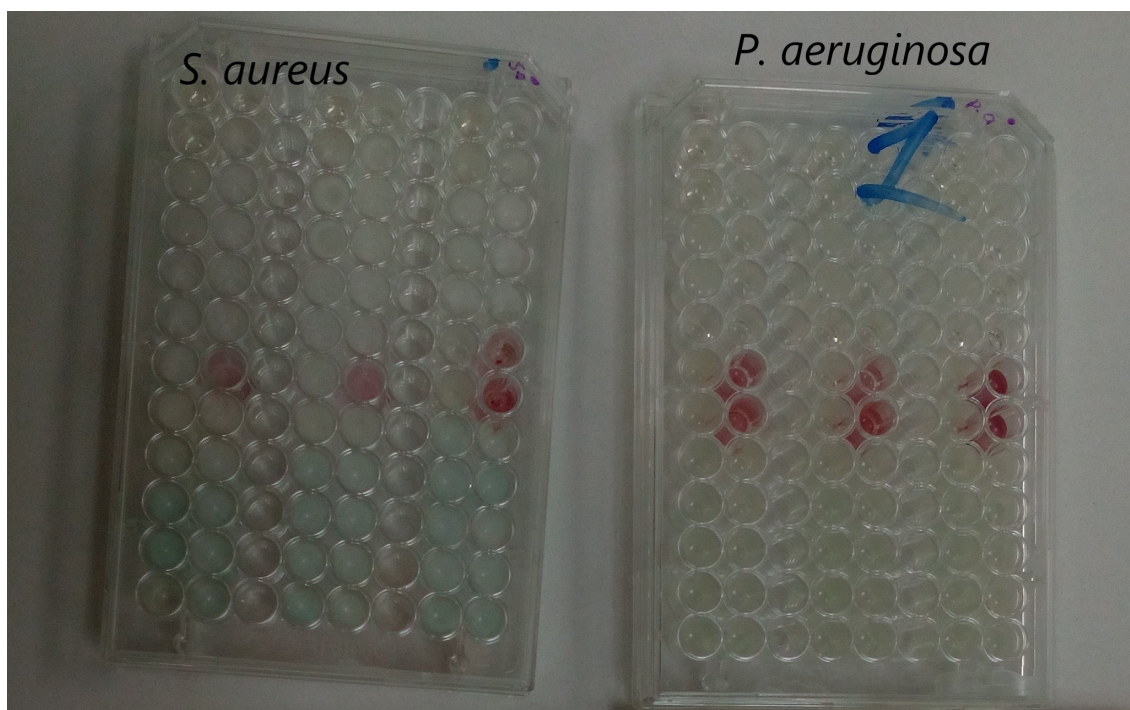


Figura 11: Microdiluciones del AEE en y determinación de su CMI mediante colorimetría

A

Lethen Agar Base, modified

Lethen Agar is special formulations for the determination of bacterial activity of quaternary ammonium compounds.

The media formulations comply with the recommendations of FDA/BAM (1995).

Mode of Action

Lethen media are highly nutritious containing Lecithin and Tween® 80 for neutralizing quaternary ammonium compounds. These media are modifications of the AOAC formulae.

Lethen Agar Base is used for the microbiological sampling of environmental surfaces that have been treated with disinfectants.

Typical Composition (g/litre)

Lethen Agar Base:

Peptone from meat 10.0; peptone from casein 10.0; meat extract 3.0; yeast extract 2.0; sodium chloride 5.0; D(+) glucose 1.0; lecithin 1.0; sodium bisulfite 0.1; agar-agar 20.0

Preparation of Lethen Agar

Suspend 52.1 g and 7 ml of Tween® 80 in 1 litre of distilled or demin. water until evenly dispersed. Heat, if necessary, with repeated stirring and boil for 1 minute; autoclave at 121 °C for 15 min. Pour into plates.

pH: 7.2 ± 0.2 at 25 °C.

The plates are turbid and brownish.

Incubation: 24 - 48 hours at 35°C aerobically.

Experimental Procedure

Depending on the purpose for which the media are used.

Literature

FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8th ed. (1995), chapter 23: Microbiological Methods for Cosmetics, Lethen Agar (modified) = M 78, Lethen Broth (modified) = M 79.

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
Lethen Agar Base, modified	1.10404.0500	500 g
Tween® 80	8.22187.0500	500 ml



Staphylococcus epidermidis
ATCC 12228

Quality control

Test strains	Growth
Escherichia coli ATCC 25922	good / very good
Enterococcus faecalis ATCC 29212	good / very good
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	good / very good
Staphylococcus aureus ATCC 25923	good / very good
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	good / very good
Salmonella typhimurium ATCC 14028	good / very good

A

Lethen Broth Base, modified

Lethen Broth is special formulations for the determination of bacterial activity of quaternary ammonium compounds.

The media formulations comply with the recommendations of FDA/BAM (1995).

Mode of Action

Lethen media are highly nutritious containing Lecithin and Tween® 80 for neutralizing quaternary ammonium compounds. These media are modifications of the AOAC formulae.

Lethen Broth Base is used for determining the phenol coefficient of quaternary compounds.

Typical Composition (g/litre)

Lethen Broth Base:

Peptone from meat 20.0; peptone from casein 5.0; meat extract 5.0; yeast extract 2.0; sodium chloride 5.0; lecithin 0.7; sodium bisulfite 0.1.

Preparation of Lethen Broth

Suspend 37.8 g and 5 ml of Tween® 80 in 1 litre of distilled or demin. water until evenly dispersed. Heat, if necessary, with repeated stirring to dissolve completely and autoclave at 121 °C for 15 min.

pH: 7.2 ± 0.2 at 25 °C.

The prepared broth is turbid and yellowish-brown.

Incubation: 24 - 48 hours at 35 °C aerobically.

Experimental Procedure

Depending on the purpose for which the media are used.

Literature

FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8th ed. (1995), chapter 23: Microbiological Methods for Cosmetics, Lethen Agar (modified) = M 78, Lethen Broth (modified) = M 79.

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
Lethen Broth Base, modified	1.10405.0500	500 g
Tween® 80	8.22187.0500	500 ml

Quality control

Test strains	Growth
Escherichia coli ATCC 25922	good / very good
Enterococcus faecalis ATCC 29212	good / very good
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	good / very good
Staphylococcus aureus ATCC 25923	good / very good
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	good / very good
Salmonella typhimurium ATCC 14028	good / very good

SABORES COSCO DE GUATEMALA, S.A.

33 calle 26-68 zona12, Guatemala C.A.
PBX: (502) 2500-5600
info@saborescosco.com • www.saborescosco.com



Famous For Flavours
Since 1880

Guatemala, 26 de marzo de 2019

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Código X-0003
Nombre AMYL BUTYRATE
Lote 273855
Fecha de producción 07/06/2018
Mejor antes del 06/06/2020

Característica	Estándar	Resultado
Color	Incoloro	Cumple
Apariencia	Líquido	Cumple
Olor	Afrutado, dulce	Cumple
Solubilidad <i>En etanol 70° (20°C)</i>	5.0	5.0
Densidad (20°)	0.862 - 0.870	0.867
Pureza <i>El resultado de pureza es copia de nuestro proveedor de dicha materia.</i>	>98.00%	99.49%
Índice de Refracción	1.411 - 1.414	1.4118
Coliformes totales:	<10 ufc/mL	0 ufc
Mohos y levaduras:	<10 ufc/mL	0 ufc

Aprobado por

Ing. Mirna Soto
Gerente de Control de Calidad
PBX: 2500-5600 ext. 8201
gerenciacc@saborescosco.com

SABORES COSCO DE
GUATEMALA, S. A.
33 Calle 26-68, Zona 12
PBX: 2500-5600
email: info@saborescosco.com.gt

12. GLOSARIO

- **CMI** Concentración mínima inhibitoria
- **AE** Aceite esencial
- **AEE** Aceite de Eucalipto
- **AER** Aceite de Romero
- **MRSA** Staphylococcus aureus resistente a meticilina
- **NPA** Natual Product Association
- **NSF** National Sanitation Foundation
- **GC/MS** Cromatografía de gases con espectrómetro de masas
- **O/W** Tipo de emulsión aceite en agua
- **W/O** Tipo de emulsión agua en aceite
- **FDA** Food and Drug Administration
- **CTPA** Asociación de cosméticos, artículos de aseo y perfumería
- **DMAPP** di-metil alil piro fosfato
- **IPP** isopentil pirofosfato
- **GPP** Geranil pirofosfato
- **HNMR** resonancia magnética nuclear de hidrógeno

- **IR** Infrarrojo
- **MLB** Modified Letheen Broth (Caldo Letheen modificado)
- **MLA** Modified Letheen Agar (Agar Letheen modificado)
- **APC** Aerobic Plate Count (Conteo de placa de aerobios)
- **UFC** Unidades formadoras de colonias
- **MNPC** Muy numeroso para contar
- **BHU** Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro-corazón)
- **TTC** 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
- **BAM** Bacteriological Analytical Manual
- **BPM** Buenas Prácticas de Manufactura

