



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA FLOR
DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) PARA
PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES.

Autora

Joselyn Sayonara Pazmiño Pacheco

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA FLOR DE
CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) PARA PRODUCTOS
AGROINDUSTRIALES.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

Mg. Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Autora

Joselyn Sayonara Pazmiño Pacheco

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, análisis de los métodos de extracción de la flor de caléndula (*Calendula officinalis*) para productos agroindustriales, a través de reuniones periódicas con la estudiante Joselyn Sayonara Pazmiño Pacheco, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Magister en Gerencia y Liderazgo Educativo

CC: 170651556-4

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado el trabajo, análisis de los métodos de extracción de la flor de caléndula (*Calendula officinalis*) para productos agroindustriales, de Joselyn Sayonara Pazmiño Pacheco, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

María Elizabeth Mosquera Quelal

Magister en Docencia Universitaria y Administración Educativa

CC: 171504419-2

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Joselyn Sayonara Pazmiño Pacheco

CC: 171894400-0

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios Jehová por ser una guía y fortaleza en mi vida, a mis profesoras Janeth Proaño y Elizabeth Mosquera por apoyarme, guiarme y compartir sus conocimientos para la elaboración de este proyecto. A mi familia, la cual me brinda su sabio consejo, apoyo y todo su amor incondicional. A mis amigos que me han acompañado a lo largo de mi carrera.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación dedico principalmente a mis padres Edward Pazmiño y Nelly Pacheco por todo el amor, dedicación, esfuerzo y apoyo a lo largo de mi formación académica y personal. A mí querida bisabuelita Nelly Bonilla, por confiar siempre en mí y apoyarme incondicionalmente con todo su amor y paciencia. A mi abuelita Martha Coba, por aconsejarme y guiarme a lo largo de la vida. A mis hermanos Alexander Pazmiño y Annette Morales, por darme todo su cariño y ser mi mayor fortaleza, y a mis mejores amigos que me han brindado todo su aprecio y amistad incondicional.

RESUMEN

Actualmente, existe gran controversia en torno a los aditivos que se agregan en productos alimentarios y de uso humano. Las grandes industrias cosméticas, están obligadas a innovar creando nuevos productos con materia prima de origen natural que no contengan preservantes, colorantes u otros compuestos sintéticos. Aunque la tecnología sigue en avance, no se ha podido reemplazar estos componentes por otros de origen natural. En el siguiente trabajo, se propone el uso de extracto de la flor de caléndula (*Calendula officinalis*) como antioxidante y antimicrobiano aplicado a una crema cosmética, para la evaluación del control de *Mesófilos aerobios*, *Pseudomona*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Entre los tratamientos que ayudaron al control de las ufc (unidades formadoras de colonia) figuran: el tratamiento T2 (extracto de caléndula en H₂O, concentración de 5 mL en 31,7 gr de crema) el cual mantuvo una inhibición dentro de las repeticiones en el tiempo evaluado y, el tratamiento T1 (realizado por hidrodestilación utilizando aceite esencial de caléndula en un volumen de 100 uL) donde se obtuvo un control total sobre los microorganismos. El tiempo de conservación de la crema fue simulado en una cámara de estabilidad a 40 °C con 75 % de humedad, representando un tiempo de vida útil de un año.

ABSTRACT

Currently, there is great controversy around the additives that are added in food products and for human use. The large cosmetic industries are obliged to innovate by creating new products with raw materials of natural origin that do not contain preservatives, dyes or other synthetic compounds. Although the technology is still in progress, it has not been possible to replace these components with others of natural origin. In the following work, we propose the use of calendula flower extract (*Calendula officinalis*) as antioxidant and antimicrobial applied to a cosmetic cream, for the evaluation of *Aerobic mesophilic control*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Among the treatments that helped the control of ufc (colony forming units) are: the treatment T2 (extract of calendula in H₂O, concentration of 5 mL in 31.7 g of cream) which maintained an inhibition within the repetitions in the time evaluated and the T1 treatment (performed by hydrodistillation using calendula essential oil in a volume of 100 uL) where total control over the microorganisms was obtained. The time of conservation of the cream was simulated in a stability chamber at 40 °C with 75% humidity, representing a shelf life of one year.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos e hipótesis.....	3
1.1.1.General:.....	3
1.1.2.Específicos:	3
1.1.3.Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades de la caléndula	4
2.1.1.Taxonomía	4
2.1.2.Descripción botánica	5
2.1.3.Distribución.....	5
2.1.4.Características Físicoquímicas	5
2.1.5.Aplicación fitoplanta.....	7
2.2. Países productores de hierbas aromáticas.....	9
2.3. Estudio caléndula como antioxidante y antibacterial	11
2.4. Métodos de extracción en plantas.....	13
2.4.1.Hidrodestilación	13
2.4.2.Destilación Kjeldahl	14
2.4.3.Liofilización	16
2.4.4.Maceración	17
2.5. Crema cosmética	17
2.5.1.Emulsiones	17
2.5.2.Tipos de emulsiones.....	18
2.5.3.Propiedades de las emulsiones	18
2.5.4.Componentes esenciales para una emulsión dermocosmética....	19
2.5.5.Agentes conservantes	20
2.5.6.Agentes humectantes	21
2.5.7.Agentes viscosantes.....	21
2.6. Propiedades físicoquímicas de las cremas cosméticas..	21
2.6.1.Soluciones hidroalcohólicas.....	23
2.6.2.Clorhidrato de aluminio y sales relacionadas	23

2.7.	Principales industrias cosméticas internacionales.....	23
2.8.	Producción nacional.....	24
2.9.	Cremas antioxidantes	25
2.10.	Cremas antimicrobianas	25
2.10.1.	Clasificación.....	26
2.10.2.	Características	26
2.11.	Escalado industrial.....	26
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1.	Ubicación del estudio.....	29
3.2.	Manejo del Experimento	29
3.3.	Diseño experimental	29
3.4.	Materiales y Reactivos.....	30
3.4.1.	Obtención de los extractos de caléndula	30
3.4.2.	Formulación de la crema a base de caléndula.....	31
3.4.3.	Siembra microbiológica	32
3.5.	Procedimientos	32
3.5.1.	Métodos de extracción.....	32
3.5.2.	Elaboración de la crema cosmética	34
3.5.3.	Siembra y análisis microbiológico	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
4.1.	Análisis fisicoquímico.....	37
4.2.	Variables de estudio	37
4.3.	Análisis microbiológico.....	38
4.3.1.	Mesófilos aerobios totales	42
4.3.2.	Pseudomona aeruginosa.....	50
4.3.3.	Staphylococcus aureus.....	58
4.3.4.	Escherichia Coli.....	60
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1.	Conclusiones.....	62
5.2.	Recomendaciones	62

REFERENCIAS	64
ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la planta de caléndula.....	4
Tabla 2. Compuestos químicos presentes en la flor de caléndula.....	6
Tabla 3. Principales países de hierbas aromáticas y medicinales.....	9
Tabla 4. Hiervas más cotizadas por los principales países importadores.....	10
Tabla 5. Frecuencia de comercialización por laboratorios naturistas.	11
Tabla 6. Condiciones Fisicoquímicas.....	22
Tabla 7. Análisis microbiológicos.	22
Tabla 8. Marcas más vendidas a nivel mundial en el área cosmética.	24
Tabla 9. Asociación Ecuatoriana de Productos Cosméticos al 2017.....	24
Tabla 10. Productos a base de flor de caléndula.	27
Tabla 11. Tratamientos del diseño experimental.....	29
Tabla 12. Fuentes de variación del diseño experimental.	30
Tabla 13. Materiales y reactivos para métodos de extracción.....	30
Tabla 14. Materiales y reactivos para la crema cosmética.....	31
Tabla 15. Materiales y reactivos para siembra microbiana.....	32
Tabla 16. Valores de pH en cremas con extractos de caléndula.....	37
Tabla 17. Análisis microbiológicos primera repetición.....	39
Tabla 18. Análisis microbiológicos segunda repetición.	40
Tabla 19. Análisis microbiológicos tercera repetición.....	41
Tabla 20. Ecuación para obtener el conteo real de ufc por gr o mL.	42
Tabla 21. Datos promediados medio PCA para <i>Aerobios totales</i>	42
Tabla 22. Número de colonias en medio PCA para <i>Aerobios totales</i>	43
Tabla 23. ANOVA para <i>Mesófilos aerobios</i> totales, en tiempo 0.....	44
Tabla 24. Prueba de Tukey al 0,5%, ponderación de tratamientos en <i>Mesófilos aerobios</i> tiempo 0.	44
Tabla 25. Análisis de varianza para <i>Mesófilos aerobios</i> en el tiempo 1.	45
Tabla 26. Ponderación de tratamientos, <i>Mesófilos aerobios</i> en el tiempo 1, prueba de Tukey al 0,5%.	45
Tabla 27. Análisis de varianza para <i>Mesófilos aerobios</i> en el tiempo 2.	46
Tabla 28. Ponderación de tratamientos, <i>Mesófilos aerobios</i> en el tiempo 2, prueba de Tukey al 0,5% en el tiempo establecido.	46

Tabla 29. Conteo ufc divididas por tratamientos con variables en el tiempo. ..	49
Tabla 30. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T1).....	49
Tabla 31. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T2).....	50
Tabla 32. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T3).....	50
Tabla 33. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T4).....	50
Tabla 34. Datos promediados medio AS para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	51
Tabla 35. Datos promedio del número de colonias en medio AS para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	51
Tabla 36. ANOVA para <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el tiempo 0.....	52
Tabla 37. Ponderación de tratamientos para <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el tiempo 0, prueba de Tukey al 0,5%.	52
Tabla 38. ANOVA para <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el tiempo 1.....	53
Tabla 39. Ponderación de tratamientos para <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el tiempo 1, prueba de Tukey al 0,5% en el día 30.	53
Tabla 40. ANOVA para <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el tiempo 2.....	54
Tabla 41. Ponderación de tratamientos para <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el tiempo 2, prueba de Tukey al 0,5% en el tiempo establecido.	54
Tabla 42. Conteo ufc divididas por tratamientos con variables en el tiempo. ..	57
Tabla 43. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T1).....	57
Tabla 44. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T2).....	58
Tabla 45. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T3).....	58
Tabla 46. Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T4).....	58
Tabla 47. Datos promediados medio MS para <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Tabla 48. Datos promediados medio EMB para la bacteria <i>E. Coli</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Matraz bola con muestra de flor de caléndula.	13
<i>Figura 2.</i> Hidrodestilador para separación de aceite esencial de la flor de caléndula.	14
<i>Figura 3.</i> Equipo Kjeldahl para extracción de flor de caléndula.	15
<i>Figura 4.</i> Extracto de flor de caléndula en H ₂ O.	15
<i>Figura 5.</i> Flores de caléndula liofilizadas.	16
<i>Figura 6.</i> Proceso de liofilización de flores de caléndula precongeladas.	16
<i>Figura 7.</i> Método de maceración con flores de caléndula y H ₂ O.	17
<i>Figura 8.</i> Métodos de extracción.	34
<i>Figura 9.</i> Elaboración de crema cosmética.	35
<i>Figura 10.</i> Siembra y análisis microbiológico de crema cosmética.	36
<i>Figura 11.</i> Promedio y desviación Aerobios Mesófilos tiempo 0.	44
<i>Figura 12.</i> Promedio y desviación Aerobios Mesófilos tiempo 1.	45
<i>Figura 13.</i> Promedio y desviación Aerobios Mesófilos tiempo 2.	46
<i>Figura 14.</i> Proliferación de Aerobios mesófilos, analizados en el tiempo 0 (rojo), tiempo 1 (azul) y tiempo 2 (amarillo).	48
<i>Figura 15.</i> Promedio y desviación <i>Pseudomona aeruginosa</i> tiempo 0.	53
<i>Figura 16.</i> Promedio y desviación <i>Pseudomona aeruginosa</i> tiempo 1.	54
<i>Figura 17.</i> Promedio y desviación <i>Pseudomona aeruginosa</i> tiempo 1.	55
<i>Figura 18.</i> Proliferación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> , analizados en el tiempo 0 (rojo), tiempo 1 (azul) y tiempo 2 (amarillo).	56

1. INTRODUCCIÓN

La caléndula es una planta silvestre encontrada en el sur de Europa y Asia aunque es difícil identificar su verdadero origen. En Finlandia, es considerada una flor de verano muy popular. Las flores cultivadas en su mayoría son de color naranja, aunque también existen variedades cultivadas de diferentes colores (Lastra Valdés & Piquet García, 1999).

El cultivo de caléndula requiere un clima templado, se adapta a todos los suelos aunque prefiere terrenos arenosos con un buen drenaje y rico en materia orgánica. La planta tiene una altura entre 40 y 50 cm, florece durante todo el año, el tallo es semierecto y en la base es leñoso, las hojas son oblongas-lanceoladas y la flor es ancha de un color amarillo anaranjado.

Por sus principios activos la caléndula es una planta que contiene carotenos, que favorecen la renovación del tejido superficial y sus propiedades antibacterianas evitan las infecciones. El poder de la caléndula también se ha aprovechado en tratamientos de belleza y se usa para lociones, cremas y otros cosméticos (De la Torre, Navarrete, Masia, & Balslev, 2002, pág. 220).

Por sus diversas propiedades terapéuticas como cicatrizante, antiinflamatoria, desintoxicante, antimicrobiano, antiespasmódica, anticolérica, entre otras. Esta es utilizada en la curación de varios tipos de enfermedades, ejemplo de esto “La infusión de hojas y flores de la caléndula que se pueden utilizar en el tratamiento relacionado con la menopausia o para el alivio del dolor durante el ciclo menstrual” (Muñoz, 2002, pág. 125). Sus flores están indicadas en el tratamiento de infecciones diversas de la piel y de las mucosas, como heridas, picaduras, llagas, quemaduras, entre otros. Esta ayuda a aliviar las molestias de las quemaduras leves ocasionadas por el sol. “Las flores de la caléndula en infusión combinadas con otras plantas como el anís verde, el hinojo y la manzanilla, se usan como remedio eficaz para los trastornos digestivos como gastritis, flatulencia e indigestiones, es decir es utilizado como antiespasmódico” (Eroski, 2003).

A nivel experimental se han evaluado diferentes alternativas de métodos para la extracción de los componentes activos, de los cuales se analizó: la destilación que es una técnica utilizada para la separación de sustancias que tienen distintos puntos de ebullición, es un método que produce la vaporización de una materia orgánica por la aplicación de calor, utilizado en pequeñas y medianas industrias para llevar a cabo separaciones de componentes volátiles que el H₂O, de mezclas de líquidos miscibles (Guerra Millán F. , Mallén Wiechers, Struck Garza, Varela Vega, & Zitlalpopoca Soriano , 2008).

El método por liofilización se da por evaporación del agua, para eliminar esta por la superficie del producto y traspasar al aire circundante. El tiempo empleado en este proceso depende en su mayoría de la velocidad del aire y de las características del producto. Este método fue llamado criodesecación y consiste en sublimar el hielo de un producto previamente congelado, lo cual hace que el agua pase directamente del estado sólido a vapor, trabajando así debajo del punto triple del agua, 0.01 °C y 4.5 mmHg (Universidad de Granada, 2006).

La maceración consiste en poner directamente la materia orgánica con el solvente por un tiempo determinado. En equilibrio de la concentración entre la materia orgánica y el solvente, dependiendo así de factores que están unidos a la materia como el tamaño de partícula, contenido de humedad, cantidad, entre otros. También los factores que están relacionados con el solvente como la selectividad y cantidad (Sharapin, 2000, pág. 41).

La hidrodestilación es un proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, generalmente el vapor saturado está en contacto íntimo con la materia prima a una presión atmosférica constante (Cerpa, 2007).

En Ecuador, las plantas medicinales son de uso cotidiano las cuales se aplican principalmente por conocimiento ancestral, se reportan 3118 especies las cuales pertenecen a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales. Sin embargo, la caléndula es una planta que no se produce en el Ecuador de forma agroindustrial solo como planta ornamental únicamente y no se conoce sus cualidades como antioxidante, cicatrizante, antiinflamatoria y antibacterial (Muñoz, 2002).

En la presente investigación, se planteó la evaluación en la eficacia de los extractos de flor de caléndula en condiciones controladas para *Mesófilos aerobios totales*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en una crema hidratante. Se realizó la selección del mejor método de extracción el cual ayudó a la conservación de las cualidades antioxidantes y antibacterianas del extracto acuoso y de esta manera se aporte en la búsqueda de métodos que incidan en la comercialización de productos agroindustriales los cuales permitan replicar de forma natural las cualidades antioxidantes y antimicrobianas.

1.1. Objetivos e hipótesis

1.1.1. General:

Analizar métodos de obtención de extractos de *Calendula officinalis*, para la formulación de un producto de uso externo.

1.1.2. Específicos:

Formular una crema cosmética a base de los extractos de caléndula obtenidos por cuatro diferentes metodologías.

Caracterizar a nivel microbiológico las cremas cosméticas fabricadas a partir de las extracciones de flor de caléndula obtenidas.

Realizar la línea de producción para la fabricación de las cremas cosméticas a partir de las extracciones de flor de caléndula obtenidas.

1.1.3. Hipótesis

Ha: Existen diferencias significativas entre tratamientos para el control de *Mesófilos aerobios*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Ho: No existen diferencias significativas entre tratamientos para el control de *Mesófilos aerobios*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de la caléndula

Es una planta anual, la cual se llegó a utilizar en la región mediterránea por la época de los antiguos griegos. El nombre caléndula se deriva del latín *calendulae*, el cual significa “a lo largo de los meses”, esto es debido a que la planta tiene un periodo largo de floración.

2.1.1. Taxonomía

La *Calendula officinalis* es conocida con nombres como botón de oro, cempasúchitl, flamenquilla, flor de difunto, maravilla, corona de rey, rosa de muertos, sin embargo el nombre más usado es caléndula, a continuación en la Tabla 1 describiremos su taxonomía.

Tabla 1.

Taxonomía de la planta de caléndula.

Dominio:	Eukarya
Reino:	Plantae
Phylum:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Compositae
Género:	<i>Calendula officinalis</i>
Especie:	Caléndula

Tomado de (Ávila. D, 2014).

2.1.2. Descripción botánica

La *Calendula officinalis*, es una hierba anual herbácea hasta de 80 cm de altura, ramificada, tallos erectos y pubescentes, hojas alternas (Puede ser oblongas, enteras y denticuladas); posee cabezuelas en pedúnculos de 3 a 5 cm de diámetro; con flores de distintos colores desde amarillo, blanquecino o anaranjado las cuales se cierran por la noche; en ocasiones la planta es prolifera desde el involucre y puede portar cabezuelas pedunculadas en un círculo (Lastra Valdés & Piquet García, 1999).

2.1.3. Distribución

Planta originaria del sur de Europa y Asia, especialmente cultivada en climas fríos de Colombia, también puede crecer fácilmente en las islas Británicas en los meses de verano.

2.1.4. Características Fisicoquímicas

2.1.4.1. Composición química de la planta

En las inflorescencias de la planta existen numerosos componentes, se ha detectado presencia de aceite esencial con una cantidad del 0,2 – 0,3 %, así como ácido fenólico, ácido salicílico, esteroides, carotenoides, glucósidos, flavonoides, taninos, calendulina, saponinas triterpénica, pigmentos, xantofilas, mucilagos, umbeliferona, esculetina y escopoletina (Noveaux. L, 1985).

Las flores liguladas de caléndula con ampliamente utilizadas, por sus propiedades antiinflamatorias, espasmódica, sedativa, sudorífica, vulneraria y antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus fecalis* (Acosta de la Luz, Rodríguez Ferradá, & Sánchez Govín, 2001).

2.1.4.2. Composición fisiológica

La planta de caléndula contiene distintos tipos de compuestos químicos los cuales nombramos en la Tabla 2, entre los principales tenemos los carotenoides, flavonoides, entre otros.

Tabla 2.

Compuestos químicos presentes en la flor de caléndula.

Compuesto químico	Cantidad %	Compuestos identificados
Carotenoides	0,078 a 0,017	Alfa y beta – caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, beta–zeacaroteno, mutatoxantina, lutein epóxido.
Flavonoides	0,88 a 0,33	Rutinósido, isorhamnetina neohesperidósido, quercetina glucósido, calendoflosido, calendoflavosido, calendoflavobiosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutosido, kaemferol.
Aceite esencial	0,12 a 0,40	Pedunculatina, alfa y beta ionona, oxido – transcariofileno, carvona, cariofileno, dihidroactinidiolido, oplopanona, gamma – mouroleno, alfa – cardineno, guaiol, torryol.
Ácidos fenólicos	104	Coumárico, gentísico, vainíllico, caféico, siringico, ferúlico, salicílico, clorgénico, verátrico.
Saponinas (Ácido olanólico)		
Taninos	11,2 a 10,4	Catecol, pirogalol.
Esteroles	14,75	Escopoletina, umbeliferona, esculetina.
Otros compuestos		
Azucares	9,67	
Parafinas	5,92	
Triterpenos		3, 16, 21 trihidroxiursaeno, los heliantriol B ₁ , B ₂ y C, el lolilido, el 3, 16, 28 trihidroxi olean-12-eno, el 3, 16, 28 trihidroxi lup-20-eno, el 3, 16, 22 trihidroxi tarax-20-eno, el 3, 16, 30 trihidroxi tarax-20-eno, calendulosido F.

Tomado de (Lastra. H, 1999)

2.1.5. Aplicación fitoplanta

2.1.5.1. Fitoterapia

La caléndula es una planta sobre todo antiséptica, poseyendo un gran espectro de actuación como bactericida con efecto antibiótico, también ayudando al tratamiento de hongos y para la recuperación de la piel en presencia de los mismos.

Debido a este efecto, la caléndula es considerada como un cicatrizante de primer orden y es utilizada como conservante y estabilizante natural para muchos de los productos cosméticos. Es indicado en el uso de quemaduras, acné, abscesos o fístulas.

En la fitoterapia antigua se la ha utilizado en lavados e irrigaciones vaginales, micosis y pequeñas infecciones. A nivel farmacéutico se sigue utilizando el talco y aceite a base de esta planta para el cuidado de la piel y escoceduras. La tintura por otra parte se utiliza para uso externo como antiséptico (Ara, 2003).

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. La incidencia de productos de origen vegetal ha variado a lo largo del tiempo, esto se debe al aumento de conocimiento científico y de herramientas terapéuticas (Canigual, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

La base de los medicamentos fitoterápicos son las drogas vegetales y los diferentes productos que de ellas se obtienen, formando parte de las terapias más antiguas que existen (Canigual, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

La OMS definió en 1978 estos conceptos como se describe a continuación:

- **Planta medicinal:** Tiene sustancias que pueden llegar a ser utilizadas con una finalidad terapéutica o para la semisíntesis químico-farmacéutico.
- **Droga vegetal:** Plantas o partes de estas que pueden estar frescas o secas y son utilizadas en la elaboración de medicamentos terapéuticos.

- Principios activos: Cualquier materia, ya sea de origen animal, vegetal o químico, a la que se le atribuye una actividad apropiada responsable de la acción farmacológica.

2.1.5.2. Terapia tópica

Parte de la terapéutica dermatológica que aplica sustancias sobre la piel con el fin de lograr una curación o aliviar el dolor, su fundamento se basa en:

- Prevención del comedón (acné)
- Eliminación del comedón (acné)
- Eliminación de las lesiones inflamadas
- Pápulas (lesión en la piel, sin la producción de pus o serosidad)
- Pústulas (lesión en la piel epidermal o subepidermal en la piel con producción de pus)
- Quistes, entre otros.

En la terapia tópica el uso de sustancias farmacológicamente no activas ejercen un efecto físico que permite resolver un gran número de dermatosis, hay que tener en cuenta que la aplicación en la piel de una droga activa debe hacerse cuidadosamente como la aplicación del principio activo (Canigueral, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

En la dermatología existe la alternativa de escoger entre el tratamiento tópico o el sistemático. Cuando el tratamiento es tópico la droga entra en la piel donde se distribuye en todo el organismo, luego actúa sobre el tejido subcutáneo para luego ser eliminado. En la administración sistemática la droga se distribuye primero por todo el organismo, llegando a un punto específico de la piel, por ende la carga es más alta en el organismo y la forma de actuar es inicialmente subcutáneo (Canigueral, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

La indicación principal corresponde a dermatofitosis (Micosis superficiales que afectan la piel, específicamente a la epidermis) y en ciertos casos con presencia de lesiones circunscritas y de pequeña extensión. En la mayoría de estas situaciones se describen adecuadas respuestas las cuales pueden ser difíciles de evaluar de forma crítica (Canigueral, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

2.2. Países productores de hierbas aromáticas

Los principales países productores son: Alemania, Colombia, Costa Rica, España, Estados Unidos, Francia, Hungría, Japón, México, Polonia, Rumania, Suecia, Suiza, Unión Soviética. La caléndula ha sido cultivada desde el siglo XVII en Inglaterra por sus propiedades medicinales, en la Tabla 3 se determina el crecimiento de los principales países productores (Acosta de la Luz, Rodríguez Ferradá, & Sánchez Govín, 2001).

Tabla 3.

Principales países de hierbas aromáticas y medicinales..

Países	USD 2006 CIF	USD 2007 CIF	Crecimiento 2006, 2007	Participación %
Estados Unidos	178,528,057	221,775,371.00	24,22 %	29,46 %
Alemania	123,350,514	149,958,860.01	21,57 %	49,37 %
Francia	66,915,561	76,589,891.92	14,46 %	59,55 %
Italia	50,654,826	63,644,979.80	25,67 %	68 %
España	41,444,093	49,116,547.56	18,51 %	74,52 %
Reino Unido	52,220,300	47,541,430.28	-8,96 %	80,84 %
Bélgica	29,769,452	42,167,087.66	41,65 %	86,44 %
Países Bajos	31,253,986	32,795,708.44	4,93 %	90,80 %

Tomado de (Proexport, 2008).

En la Tabla 3 se observa que Estados Unidos es el primer país importador de hierbas aromáticas y medicinales, con un valor del 29,46 % de países que participan sobre estos bienes y un crecimiento de 24,22 % entre el 2006 y 2007.

Existe un listado de las hierbas aromáticas más importadas de los países antes mencionados como se muestra en la Tabla 4, la caléndula se encuentra en octavo lugar.

Tabla 4.

Hiervas más cotizadas por los principales países importadores.

Nombre Común	Nombre Científico
Menta	Mentha Citrato
Mejorana	Origamun Majorana
Salvia	Salvia Officinalis
Albahaca	Ocinum Basilicum
Lúpulo	Humulus Lupulus L.
Valeriana	Valeriana Officinalis
Ortiga	Urtica Dioica
Caléndula	Calendula Officinalis

Tomado de (Instituto Alexander Von Humbolt, 2018).

En Ecuador no existe una producción registrada de caléndula, es por este motivo que la mayor parte de esta flor es importada de Colombia.

2.2.1. Hierbas medicinales producidas en Colombia

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad, lo cual es una ventaja competitiva, según una encuesta realizada por el instituto Von Alexander Humboldt reporta aproximadamente un total de 50.000 especies florales, de las cuales 6.000 tienen características medicinales, en la Tabla 5 se describe las 13 especies más comercializadas dentro de este país.

Sin embargo, se tiene un registro de 95 especies de plantas con usos medicinales, de las cuales 11 son de origen nativo, según datos estadísticos del “Instituto de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos” o también conocido como INVIMA (Romero Duque & Velásquez Pinzón, 2009).

Tabla 5.

Frecuencia de comercialización por laboratorios naturistas.

Especie	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)
Ajenjo	1	3.8
Ajo	4	15.4
Alcachofa	6	23.1
Berenjena	1	3.8
Boldo	1	3.8
Caléndula	7	26.9
Chuchuguaza	1	3.8
Cedrón	2	7.7
Cola de Caballo	1	3.8
Diente de león	3	11.5
Eucalipto	1	3.8
Gingko biloba	1	3.8
Ginseng	1	3.8

Tomado de (Romero. T, 2009).

2.3. Estudio caléndula como antioxidante y antibacterial

El deterioro de un cosmético es menor por los compuestos químicos que son utilizados, estos en muchas ocasiones tienen consecuencias adversas sobre la salud, las grandes empresas cosméticas buscan remplazar estos compuesto químicos para sustituirlos por compuestos naturales que puedan controlar el crecimiento microbiológico y el enranciamiento oxidativo.

Es por esto que se han realizado estudios para comprobar la acción antioxidante y antimicrobiana, José Ojeda realizo un estudio farmacológico comprobando la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la planta de caléndula sobre *S. aureus*, *E. Coli*, *E. agglomerans*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. desinterae*, *S. typhi*, *P. aeuroginosa* y *C. albicans*, se demostro que el extracto obtenido de caléndula mediante la extracción por agua tiene mayor capacidad antioxidante, comparado con un tratamiento con vitamina C (Ojeda Cuevas, 2016, pág. 49), las pruebas microbianas indicaron inhibición de crecimiento para bacterias *B. cereus*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. dysenteria*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*.

Elizabeth Domínguez realizo un estudio sobre flores de caléndula y su extracto hidroalcohólico, en la mejora del color y vida útil en distintos tipos de pulpa de

frutas. Se observó que la flor de caléndula tiene un alto poder antioxidante en concentraciones grandes, combinado con un adecuado almacenamiento puede ayudar al control microbiano principalmente de hongos y levaduras, aumentando el tiempo de vida útil del producto (Domínguez, 2012).

Para la capacidad antimicrobiana y antimicótica se realizó un estudio, se elaboró una crema a base de caléndula con un 20% de esta en la formula, evaluando principalmente la cepa ATCC 9027 *Pseudomona aeruginosa* (Bermúdez. M, 2016, pág. 4). Maribel Bermúdez mostro una reducción del microorganismo en tiempos de contacto de 5 min. La forma farmacéutica fue aceptable en cuanto a color, textura, olor y capacidad de absorción. En cuanto al poder bactericida y fúngico de la crema dio un 99 % de la reducción del crecimiento del agente infeccioso en cepa ATCC 9027, la crema puede ayudar al tratamiento de dermatosis cutánea causada por la bacteria, o al control de infecciones cutáneas.

También se evaluó la calidad de la crema sobre cepa MSSA25923 *Staphylococcus aureus* (Bermúdez. M, 2016, pág. 4), que mostraron una reducción del microorganismo en tiempos de contacto de 5 min con una efectividad de 98.8 % por el extracto etanólico de la caléndula con halos de inhibición de 13mm +/-1 y 28mm +/-2.

Román Ramírez, realizo un estudio sobre extractos de plantas (*Calendula officinalis*) provenientes del área rural de Soracá, municipio de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. Sometió la cepa ATTCC 43300 a una concentración de 10 mg/mL del extracto de *Calendula officinalis*, dando una alta actividad antibacteriana contra este microorganismo. En el extracto metanólico y diclorometánolico se presentó una inhibición, posterior se determinó la concentración mínima inhibidora, diluyendo 6 veces la concentración inicial hasta llegar a 0,156 mg/mL, donde el extracto de caléndula demostró efectividad hasta una concentración de 1,25 mg/mL (Ramírez, Ávila, & Espitia, 2015, págs. 4-7).

2.4. Métodos de extracción en plantas

2.4.1. Hidrodestilación

El proceso de hidrodestilación es conocido también como “destilación por arrastre de vapor”, su principio consiste en llevar el agua contenida en un matraz a temperatura de ebullición, donde el material vegetal se encuentra en suspensión acuosa, los vapores generados son condensados y recogidos mediante la trampa de Clevenger (Cerpa, 2007).

En este proceso, el agua 40 mL junto con el material vegetal 50 g de caléndula van en contacto directo en un matraz bola como se muestra en la Figura 1, la generación de calor se hace en una malla de calentamiento, a medida que esta se calienta, libera diversos componentes volátiles entre los que se encuentra el aceite esencial, estos suben a un condensador donde se enfría, provocando la caída de este en la trampa de Clevenger, la cual permite la separación y decantación del aceite esencial como se muestra en la Figura 2.

El agua que tendrá contacto con el material vegetal debe ser suficiente para que no exista un sobrecalentamiento y por ende una carbonización, estos factores pueden afectar componentes del aceite esencial, este proceso termina cuando el volumen no varía en el tiempo de extracción (Perez, 2014).



Figura 1. Matraz bola con muestra de flor de caléndula.



Figura 2. Hidrodestilador para separación de aceite esencial de la flor de caléndula.

2.4.2. Destilación Kjeldahl

Es una técnica utilizada para separar mezclas de sustancias que tienen distintos puntos de ebullición por la aplicación de calor, es un procedimiento utilizado por industrias pequeñas y medianas, para llevar a cabo separaciones parciales de compuestos volátiles de mezclas de líquidos miscibles, como se muestra en la Figura 3 (Guerra Millán F. , Mallén Wiechers, Struck Garza, Varela Vega, & Zitlalpopoca Soriano , 2008).

El material a ser tratado es colocado por lotes en recipientes los cuales se someten a ebullición, el vapor desprendido se elimina continuamente y es recolectado tratando de no dar lugar el proceso de condensación, la primera parte de la destilación es la que contiene mayor cantidad de nutrientes y componentes volátiles como se muestra en la Figura 4. Esto proporciona que la empresa pueda realizar numerosas destilaciones para recolectar varios lotes con diferentes grados de pureza.



Figura 3. Equipo Kjeldahl para extracción de flor de caléndula.



Figura 4. Extracto de flor de caléndula en H₂O.

2.4.3. Liofilización

Consiste en retirar por evaporación el agua a través de la superficie del producto, llamada anteriormente criodestilación. Es un proceso de secado que se basa en sublimar el H₂O de un producto congelado como muestra la Figura 5. El H₂O que contiene el producto pasa de un estado sólido a un estado de vapor directamente sin necesidad de pasar por el estado líquido, esto se debe trabajar por un valor debajo del punto triple del agua el cual es de 0,01 °C y 4,5 mmHg (Alzate, 2008).

Las principales etapas de este proceso constan en el acondicionamiento adecuado de la materia prima, una precongelación, sublimación de la flor de caléndula como muestra la Figura 6, ruptura de vacío y el almacenamiento en condiciones adecuadas para evitar que el material vegetal vuelva a adquirir humedad del ambiente.



Figura 5. Flores de caléndula liofilizadas.



Figura 6. Proceso de liofilización de flores de caléndula precongeladas.

2.4.4. Maceración

Este proceso permite poner en contacto directo un material orgánico 100 g de flor de caléndula, junto con un disolvente (H₂O 70 mL) en proporciones iguales como se muestra en la Figura 7, durante un periodo de tiempo establecido. Este proceso trata básicamente del equilibrio que se obtiene entre la droga y el solvente (Sharapin, 2000, pág. 41).



Figura 7. Método de maceración con flores de caléndula y H₂O.

2.5. Crema cosmética

Las cremas cosméticas son emulsiones semisólidas que pueden tener dos fases, una lipófila y otra hidrófila, son destinadas principalmente al uso externo a nivel de la epidermis o membranas mucosas. Las cremas se componen principalmente de agua y grasa, también existen otros aditivos que proporcionan textura, color, olor, así como estabilizantes, antioxidantes, conservantes, entre otros (Romero, Xavier, & Basurto Jimbo, 2017).

2.5.1. Emulsiones

Son mezclas de dos líquidos inmiscibles en donde uno se dispersa en el otro en forma de gotas, formando un sistema fuera de equilibrio. Sus componentes dependen de la naturaleza de los mismos y del método de separación.

Las emulsiones tienen propiedades que dependen de su composición entre estas figuran la viscosidad, estabilidad y tamaño de gota, dependiendo de cada fase (Bautista. C, 2011).

2.5.2. Tipos de emulsiones

Existen 2 tipos de emulsiones según los componentes que posee, una hidrófoba la cual tiene presencia de tensoactivos tipo W/O (Emulsión agua en aceite, donde la fase dispersa que está en menor proporción es el agua y la dispersante que está en mayor proporción es el aceite, con un 10 a 40 % del contenido de agua) y se puede administrar a tipos de piel seca o con un diagnóstico de dermatosis, y una hidrófila en la cual encontramos tensoactivos del tipo O/W (Emulsión aceite en agua, donde la fase dispersa que está en menor proporción es el aceite y la dispersante que está en mayor proporción es el agua, con un 70 a 80 % del contenido de agua) y se recomienda en uso de piel normal o levemente reseca (Romero, Xavier, & Basurto Jimbo, 2017).

2.5.3. Propiedades de las emulsiones

2.5.3.1. Conductividad

Dada por la naturaleza de la fase continua ya que transporta las cargas, mientras que la fase dispersa no tiene continuidad de los electrodos, por lo tanto, las emulsiones W/O contienen una alta conductividad (Benmaman, 2005).

2.5.3.2. Viscosidad

Es una propiedad que caracteriza principalmente la resistencia de un fluido, siendo un parámetro en la preparación de emulsiones tanto farmacéuticas como cosméticas, influyen sobre la estabilidad y aceptabilidad del producto. Si la viscosidad es mayor, se reduce el movimiento interno de sus partículas, lo cual proporciona una mayor estabilidad en la fórmula (Benmaman, 2005).

2.5.3.3. Tamaño de gota

Ligada principalmente a la viscosidad de la emulsión, si menor es el tamaño de la gota mayor será su viscosidad (Benmaman, 2005).

2.5.4. Componentes esenciales para una emulsión dermocosmética

Las emulsiones están formadas principalmente por sus principios activos donde la actividad química está definida por su función y el vehículo excipiente. Los principales componentes de estas fórmulas son materiales grasos, disolventes, agentes gelificantes, emulsificantes, quelantes, antioxidantes, colorantes y fragancias (Martínez Fraga, 2012).

2.5.4.1. Principios activos

Estos presentan y ejercen efectos locales por los elementos esenciales que contiene el producto; el uso y cantidad es importante, pueden ser de origen animal, vegetal o mineral (Tejada, 2016).

2.5.4.2. Vehículos dermocosméticos

Son sustancias que favorecen la aplicación y nivel de absorción de la piel, aportando cualidades benéficas como aromas, colores y texturas. Pueden poseer también cualidades hidratantes, emolientes, entre otras (Tejada, 2016).

- **Fase acuosa:**

Emplea agua la cual tiene que ser desionizada y microbiológicamente pura, suele adicionarse todos los principios activos que pueden ser solubles en ella. Estos pueden incorporar a la formulación agentes humectantes, viscosantes o conservantes, estos pueden evitar que el producto se contamine por hongos, levaduras o bacterias.

- **Fase oleosa:**

Su principal funcionalidad es la proporción de flexibilidad, elasticidad y suavidad en la piel. La oclusividad del producto es dada gracias a la capa que queda adherida a la piel, ayudando a reducir la evaporación del agua.

2.5.4.3. Surfactantes

Son sustancias que poseen una doble afinidad, constituidas principalmente por dos partes bien definidas: un grupo hidrofílico y otro lipofílico, formando una cadena halógena (Salager, 2004).

Si un surfactante se encuentra dentro de un solvente, este tiende a desplazarse a la interface, provocando la interacción de un grupo polar dentro del agua y el grupo apolar orientado hacia el solvente orgánico o desplazándose a la superficie. Las moléculas poseen la capacidad de modificar la tensión superficial o su energía libre, es decir tienen poder sobre la energía de Gibbs o “Tenso activo” (Salager, 2004).

Para los surfactantes se debe tener en cuenta las propiedades o características que debe poseer el producto terminado y la mezcla de los ingredientes, los tipos de surfactantes figuran a continuación:

- **Iónicos:** Son cadenas de 10-14 átomos de C, obteniendo así en su extremo polar un anión.
- **No iónicos:** Considerados buenos humectantes y emulsionantes, poseen grupos hidrófilos (tipo alcohol, fenol, éter o amida) en su estructura.
- **De origen natural:** Estos son representados principalmente por compuestos como la lecitina, que es obtenida a partir la soya o yema de huevo.
- **Anfóteros:** Estos se establecen midiendo el medio en el que se encuentran, si están en medios básicos, son aniones y si están en medios ácidos, cationes.
- **Poliméricos:** Estos se establecen en forma de bloques o injertos, que poseen estructuras polimerizadas de tipo lipofílico o hidrofílico.

2.5.5. Agentes conservantes

Ayuda a prevenir la proliferación de distintos tipos de microorganismos generados por factores como oxígeno, calor, entre otros. Por esta razón se hace necesario su uso, con el fin de garantizar una vida estable del producto, aun máximo de 2 años. La concentración que se incorpora es mínima, entre un 0,0005 a 1 % de sustancia activa. Actualmente, los agentes que más se usan como conservantes en el cuidado de la piel son los parabenos (Wilkinson & Moore, 1990). Estos agentes conservantes pueden ser de 3 tipos:

- Antioxidantes: Compuestos que retardan o impiden el enranciamiento del producto.
- Antibactericidas: Inhiben el crecimiento de otras bacterias.
- Fungicidas: Ayudan a detener el crecimiento de los hongos.

2.5.6. Agentes humectantes

Los más utilizados son la glicerina, sorbitol, propilenglicol, que pueden ayudar en funciones como el grado de hidrosopicidad, la atracción del agua contenida en el medio ambiente hacia la piel, solubilidad de los compuestos activos presentes en la fase acuosa, responsables del paso transdérmico.

2.5.7. Agentes viscosantes

Estabilizan la emulsión de fase interna oleosa O/W, los agentes son el avicel, carboximetil celulosa sódica (CMC-Na), metil celulosa (MC), carbopoles, alginatos, gomas naturales, entre otros (Draelos Zoe, 1995).

2.6. Propiedades fisicoquímicas de las cremas cosméticas

En la actualidad, existe una norma técnica ecuatoriana con los requisitos para la elaboración de productos cosméticos NTE INEN 2867, esta norma está establecida por el INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización), teniendo en cuenta su principal objetivo que es establecer los requisitos a cumplir en cosméticos de uso humano.

Los productos cosméticos en la fabricación bajo los requisitos y en conformidad con las normas BPM's (Buenas Prácticas de Manufactura), estos productos deben cumplir con condiciones fisicoquímicas establecidas en la Tabla 6, de modo que estén exentos del ensayo microbiológico Tabla 7.

Tabla 6.

Condiciones Fisicoquímicas.

Condición	Rango
pH ácido	Menor o igual a 3
pH alcalino	Mayor o igual a 10
Actividad de agua (Aw)	Menor o igual a 0,75
Soluciones Hidroalcohólicas	Mayor o igual al 20 %
Clorhidratos de aluminio y sales relacionadas	Del 15 al 25 %
Productos de base solventes	Sin límite
Productos oxidantes	Sin Límite

Tomado de (INEN, 2015).

En el caso de no cumplir con los parámetros fisicoquímicos se realizara análisis microbiológicos que tiene que estar en rangos establecidos para cremas cosméticas.

Tabla 7.

Análisis microbiológicos.

Área de aplicación y fase Etaria	Requisito	Límites de aceptación	Referencia del método de ensayo
	<i>Mesófilos aerobios</i>	Límite máximo 5 x	ISO 21149
Demás productos cosméticos	<i>totales</i>	10 ³ ufc / g o ml	
susceptibles a contaminación microbiológica	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia en 1g o ml	ISO 22717
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1g o ml	ISO 22718
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1g o ml	ISO 21150

Tomado de (INEN, 2015).

2.6.1. Soluciones hidroalcohólicas

Sirven como productos de desinfección cutánea, la cual tiene propiedades antimicrobianas, que puedan ser transferidas por contacto directo de las manos con superficies y objetos contaminados. Se ha demostrado que la utilización de sustancias hidroalcohólicas disminuye la presencia de microorganismos como *Staphylococcus aureus* (Ramos. N, 2009).

2.6.2. Clorhidrato de aluminio y sales relacionadas

El CIAI es un polímero inorgánico perteneciente a los coagulantes inorgánicos prepolimerizados, uno de los principales usos es la elaboración de productos cosméticos, donde funciona como agente anti-transpirante, ya que es utilizado como un inhibidor del sudor. Es también conocido como cloruro de polialuminio, en función de la composición química exacta y la aplicación del compuesto (Liquid technologies, 2018), (Sylogic s.r.l. 2018).

2.7. Principales industrias cosméticas internacionales

La industria cosmética ha sido controlada por un puñado de grandes corporaciones internacionales las cuales siguen en constante mejora para mantener a la vanguardia uno de los mercados más rentables del mundo. Se observa que el comercio más grande es el electrónico como un medio de comunicación con ganancias alrededor de 17 millones de dólares mundialmente, ejemplos de las empresas más grandes a nivel mundial son: L'Oréal, misma que genera alrededor de \$ 29.940 millones dueña de 500 marcas como Maybelline New York, Lancôme, Yves Saint Laurent, Biotherm, Cacharel y Helena Rubinstein, entre otras. Unilever con ganancias de \$ 21.660 millones dueña de 400 marcas como Dove, Tresemmé, Pond's, Sedal, entre otras, y Procter & Gamble que genera \$ 76.280 millones con marcas como Head & Shoulders, Pantene, Herbal Essences y Olay. En la Tabla 8 se observa las 10 principales empresas cosméticas a nivel mundial.

Tabla 8.

Marcas más vendidas a nivel mundial en el área cosmética.

Marcas	Ingresos \$
L'Oreal	29,900 mdd
Unilever	21,660 mdd
Procter & Gamble	19,800 mdd
Estee Lauder	10,950 mdd
Shiseido	7,370 mdd
Avon	6,300 mdd
Beiersdorf	6,590 mdd
Chanel	6,210 mdd
Johnson & Johnson	6,000 mdd
Kao	5,600 mdd

Tomando de (Jiménez. G, 2015).

2.8. Producción nacional

La cantidad de ventas locales del sector cosmético corresponde al área de perfumería, maquillaje, cremas solares, bronceadores, entre otros. Datos de la asociación ecuatoriana de productos cosméticos (Procosméticos), aporta datos Tabla 9 de alrededor de 65 empresas que están afiliadas a la asociación en el área de productos de aseo personal, maquillajes o cuidado de la piel.

Tabla 9.

Asociación Ecuatoriana de Productos Cosméticos al 2017.

Avon	Juan Eljuri	Importadora Campuzano
Industrias Ales	Operfel	Recamier
BioMak	La Fabril	Johnson & Johnson
Blenastor	Laboratorios Windsor	Garzosi
Cosmefin	Las Fragancias	Mkt Worldwide
René Chardon	Otelo	Nature's Garden
Ésika	Paniju	Omnilife
L'Bel	Produbel	Kimberly Clark
Cyzone	Producosméticos	Impormass
Álvarez Barba	Qualipharm	Bayer
Beiersdorf	Quala	Lamosan
Bellemart	Tarsis	Bioderma
L'Occitane	Unilever	Mercaquímicos

Casa Moeller	Yanbal	Didelsa
Dipaso	Zaimella	Nital
Dous Internacional	Zaphiredelcor	Familia Victoria
Drocaras	Zermat	Imports
Pypenko	4Love	Dermalogica
Envapress	Herbalife	Química Comercial
Banana Boat	4Life	Zona Trade
Gammatrade	Nikken	Oriflame
Genomma Lab	Tiens	

Tomado de (Parra. P, 2015).

En el país actualmente, se usa alrededor de 50 millones en productos cosméticos o de aseo personal. Según la revista empresarial en el país: alrededor de \$ 1.100 millones son facturados por las industrias cosméticas, el sector importaba 90 % de los insumos hace 2 años y estadísticas del gobierno prevén que se aumente a \$ 70 millones en el consumo de los productos a nivel internacional, en cuanto a exportaciones aumente un 20 %.

2.9. Cremas antioxidantes

Tiene moléculas que pueden ser capaces de retardar o prevenir el enranciamiento oxidativo de otras moléculas de un producto. En ocasiones, se presenta reacciones de oxidación que producen radicales libres, estos a su vez reaccionan en cadena dañando las células de la piel.

Las cremas que cumplen con evitar la oxidación de la piel, bloquean los radicales libres presentes contribuyendo al retraso de desgaste y deterioro, aumenta la producción de colágeno; estos beneficios son fundamentales para el mantenimiento de la elasticidad y tonicidad de la piel.

2.10. Cremas antimicrobianas

La principal función de estas cremas es evitar el crecimiento de microorganismos patógenos y producir su eliminación (Sánchez. L, 2004). Los agentes antimicrobianos hacen referencia a agentes de tipo antibacterial, antituberculoso, antimicótico, antiséptico o antivirales (Sande & Mandell, 1987).

Los antibióticos tópicos o cremas antimicrobianas tienen un rol importante en la dermatología mismas que constituyen una alternativa para el tratamiento sistémico en el control de infecciones cutáneas que pueden ser focalizadas, sirviendo su aplicación en pacientes ambulatorios como en pacientes hospitalizados (Kaye , 2000), (Lio & Kaye, 2004).

2.10.1. Clasificación

Según la literatura médica la clasificación específica de los antibióticos tópicos, está en función de la acción en el microorganismo o de la composición química (Thornton, Tutrone , & Weinberg , 2003).

De esta forma, se categorizan dos tipos grandes de antibióticos tópicos para su uso: en el cuidado de heridas importantes, cuidado del acné o rosácea. Dentro de esta categoría están tres agentes químicos más usados (eritromicina, clindamicina, metronidazol). Los antibacterianos tópicos utilizados para el acné son también llamados bacteriostáticos que controlan *Propionibacterium acnes*, tienen cualidades antiinflamatorias lo cual inhibe la producción de lipasa, e inhibe la quimiotaxis de los leucocitos (Tan Hiok-Hee., 2004).

2.10.2. Características

“Los antibióticos tópicos poseen ciertas características que los diferencian, constituyéndose en ventajas o limitaciones para su empleo” (Aron-Brunetière, 1985) . Características importantes a tener en cuenta son:

- Poseen una toxicidad muy selectiva, que permite eliminar el desarrollo de microorganismos, o a su vez destruirlas.
- Pueden crear resistencia microbiana y en el caso puede llegar a provocar sensibilidad por las reacciones cruzadas, ejemplo de esto tenemos la neomicina y aminoglucósidos.

2.11. Escalado industrial

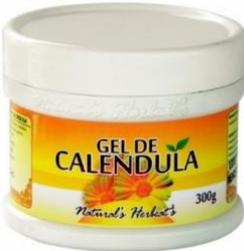
En la actualidad, las industrias farmacéuticas y cosméticas han investigado las propiedades de la planta, es por esto que se puede encontrar variedad de

productos como cremas, geles, shampoos, aceites, talcos, polvos cosméticos, entre otros.

Aunque estos productos son más vendidos en centros naturistas, existen marcas registradas y con registros sanitarios que se muestra en la Tabla 10, como ejemplos de marcas posicionadas en el mercado.

Tabla 10.

Productos a base de flor de caléndula.

Producto	Marca	Figura
Base de maquillaje en polvo de caléndula tono claro	Ere Perez	
Natural Cream (Crema de caléndula)	Just (Swiss Quality)	
Gel de caléndula	Natural's Herbeat's	

Caléndula Oil (Aceite de caléndula al 100%)

Aromatika



Talco de caléndula (Bio Bio Baby)

Eco-Biocosmetico



Shampoo con extracto de caléndula y vinagre mediterráneo

L'MAR



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se describe a continuación las características y el lugar donde se realizó la investigación.

3.1. Ubicación del estudio

La investigación se realizó en los laboratorios de microbiología de la Universidad de las Américas, longitud -0,168966, latitud -78,470682 m.s.n.m., ubicada en el sector el Batán, cantón Quito, provincia de Pichincha.

3.2. Manejo del Experimento

En el proyecto se planteó obtener el extracto de *Calendula officinalis*, mediante la aplicación de 4 diferentes métodos de extracción como la destilación Kjeldahl, hidrodestilación, maceración y liofilización. Para obtener el extracto acuoso y los principios activos antisépticos para cada tratamiento.

3.3. Diseño experimental

El estudio aplico el diseño completamente al azar, considerado el ideal de los diseños para casos experimentales que tratan de comparar dos o más tratamientos, las tres repeticiones que se observa para el análisis fueron escogidas de manera aleatoria.

Por otro lado, para comprobar si existen diferencias en las medidas obtenidas del experimento, se utilizó el análisis de varianza **ANOVA**, este análisis permito separar la contribución de cada fuente de variación en la variación total observada. En la Tabla 11 se plantearon los métodos de extracción de *Calendula officinalis* donde se observa el tratamiento utilizado y la cantidad que se colocó en las distintas cremas según las repeticiones realizadas.

Tabla 11.

Tratamientos del diseño experimental.

Tratamientos	Descripción	Cantidad utilizada
T1	Destilación Kjeldahl	5 ml
T2	Hidrodestilación	100 uL
T3	Maceración	5 ml
T4	Liofilización	1 gr

Se realizó un análisis de varianza como observamos en la Tabla 12 para obtener una estadística que permita identificar y cuantificar las causas del efecto antimicrobiano dentro del estudio experimental.

Tabla 12.

Fuentes de variación del diseño experimental.

F de V	GI
Total	11
Tratamiento	3
Error	8

Se determinó las propiedades físico-químicas, microbiológicas según la norma INEN y se realizó una estadística descriptiva con 3 repeticiones (Promedio, desviación estándar, rango, coeficiente de variación, valor t).

3.4. Materiales y Reactivos

3.4.1. Obtención de los extractos de caléndula

En la Tabla 13 se observa los métodos de extracción realizados durante la investigación donde se identifica el material utilizado en cada proceso.

Tabla 13.

Materiales y reactivos para métodos de extracción.

Método	Material	Material vegetal
Hidrodestilación	<ul style="list-style-type: none"> • Soporte universal • Pinzas • Trampa Dean Stark • Matraz fondo redondo • Serpentín • Malla de calentamiento • Agua 	<ul style="list-style-type: none"> • Flores de caléndula

Destilación Kjeldahl	<ul style="list-style-type: none"> • Equipo Kjeldahl • Matraz Florencia • Matraz Erlenmeyer • Agua 	<ul style="list-style-type: none"> • Flores de caléndula
Maceración	<ul style="list-style-type: none"> • Vasos de precipitación de 500 ml • Papel aluminio • Agua 	<ul style="list-style-type: none"> • Flores de caléndula
Liofilización	<ul style="list-style-type: none"> • Liofilizador • Congeladora 	<ul style="list-style-type: none"> • Flores de caléndula

Tomado de (Guías de prácticas Udla, 2014).

3.4.2. Formulación de la crema a base de caléndula

En la Tabla 14 se identifica el material y reactivo utilizado en el proceso de elaboración de la crema cosmética, con cada uno de los extractos de flor de caléndula obtenidos por los diferentes métodos.

Tabla 14.

Materiales y reactivos para la crema cosmética.

Materiales	Reactivos	Material vegetal
<ul style="list-style-type: none"> • Barra agitadora • Mechero • Trípode • Malla metálica • Vaso de precipitación de 500 ml • Vasos de precipitación de 100 ml • Micropipeta de 100 uL • Pipetas de 3 ml • Probeta de 10 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido Esteárico • Glicerina • Trietanolamina 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto de caléndula (Polvo, aceite o extracto en H₂O).

Tomado de (Guías de prácticas Udla, 2014).

3.4.3. Siembra microbiológica

En la Tabla 15 se identifican los materiales, reactivos y medios de cultivos específicos, utilizados en el proceso de siembra microbiana de *Mesófilos Aerobios Totales* en medio PCA, *Pseudomona Aeruginosa* en medio AS, *Staphylococcus Aureus* en medio MS y *Escherichia Coli* en medio EMB.

Tabla 15.

Materiales y reactivos para siembra microbiana.

Materiales	Medios específicos	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Mechero • Vortex • Micropipeta 100 uL • Cajas Petri con medios de cultivo • Tubos de ensayo • Gradilla • Espátula metálica para tubos de ensayo 	<ul style="list-style-type: none"> • Medio PCA • Medio EMB • Medio MS • Medio AS 	<ul style="list-style-type: none"> • Agua peptona • Alcohol

Tomado de (Guías de prácticas Udla, 2014).

3.5. Procedimientos

3.5.1. Métodos de extracción

Destilación Kjeldahl: En un balón de destilación se coloca la materia orgánica (*C. Officinalis*), es decir 50 gr de flores con 40 mL de agua, se procede a llevar a ebullición. El vapor pasa por un condensador, se procede a recolectar la muestra en un Erlenmeyer (Guerra Millán F. , Mallén Wiechers, Struck Garza, Varela Vega, & Zitlalpopoca Soriano, 2008).

Hidrodestilación: La materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador, este puede ser molido, cortado o la combinación de ambos, el vapor de agua es inyectado internamente próximo a la base y con presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho, conforme el vapor entra en contacto con el

lecho, el material se calienta liberando el aceite esencial contenido, por ser soluble este es arrastrado hacia el tope del hidroddestilador. El vapor saturado y el aceite esencial forman una mezcla y fluyen a un condensador, una vez se encuentra en el condensador procede a enfriarse hasta llegar a la temperatura ambiente, cuando esta llega a la temperatura adecuada se procede a extraer obteniendo una emulsión líquida (Cerpa, 2007).

Maceración: Consiste en dejar la materia prima en contacto directo con el agua durante varios días, con una agitación ocasional, se realiza a temperatura ambiente (Sharapin, 2000).

Liofilización: Consta de 2 pasos, el primero consiste en congelar la materia prima y el segundo en el secado del producto por sublimación directa bajo presión reducida (Universidad de Granada, 2006).

En la Figura 8 se puede observar el proceso de los métodos de extracción, iniciando por la recepción de la materia prima, hasta llegar al producto terminado y almacenamiento.

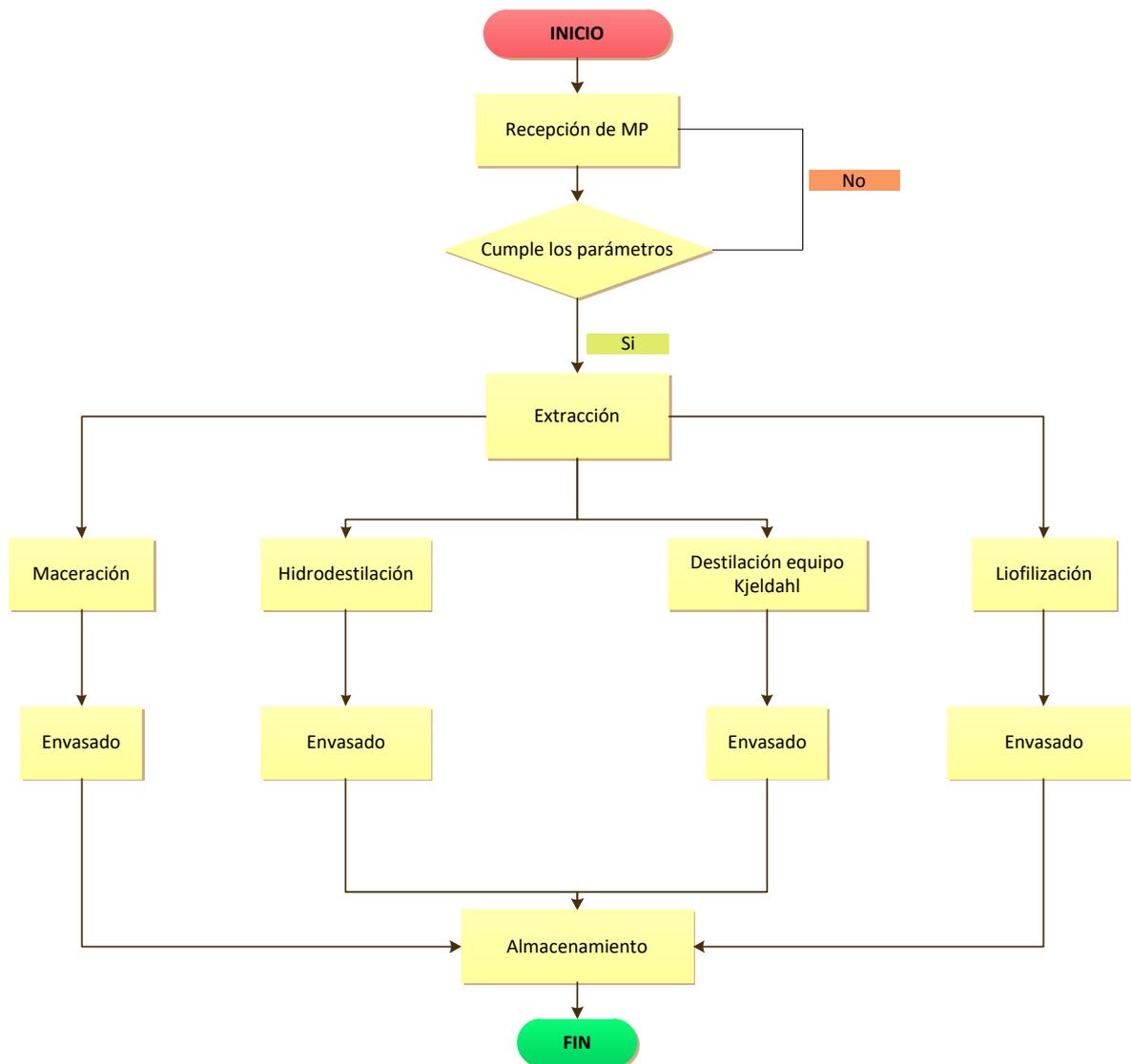


Figura 8. Métodos de extracción.

3.5.2. Elaboración de la crema cosmética

En la Figura 9 se puede observar el flujo de proceso que se realizó durante la elaboración de la crema cosmética, que consiste en pesar la materia prima según las cantidades requeridas para elaborar 32 gr de crema, en un vaso de precipitación se calienta a baño maría 20 gr glicerina, una vez caliente la mezcla se procede a colocar 8 gr de ácido esteárico, agitar hasta lograr una correcta homogenización. Una vez homogénea la muestra, se procede a retirar del baño maría, y posterior colocar 1,5 gr de trietanolamina gota a gota sin dejar de agitar constantemente. Se añadió finalmente 5 ml de los extractos acuosos obtenidos

en los distintos métodos, en el caso de la liofilización y del hidrodestilador se procedió a añadir 5 ml de H₂O junto con los extractos (Guías de prácticas UDLA, 2014).

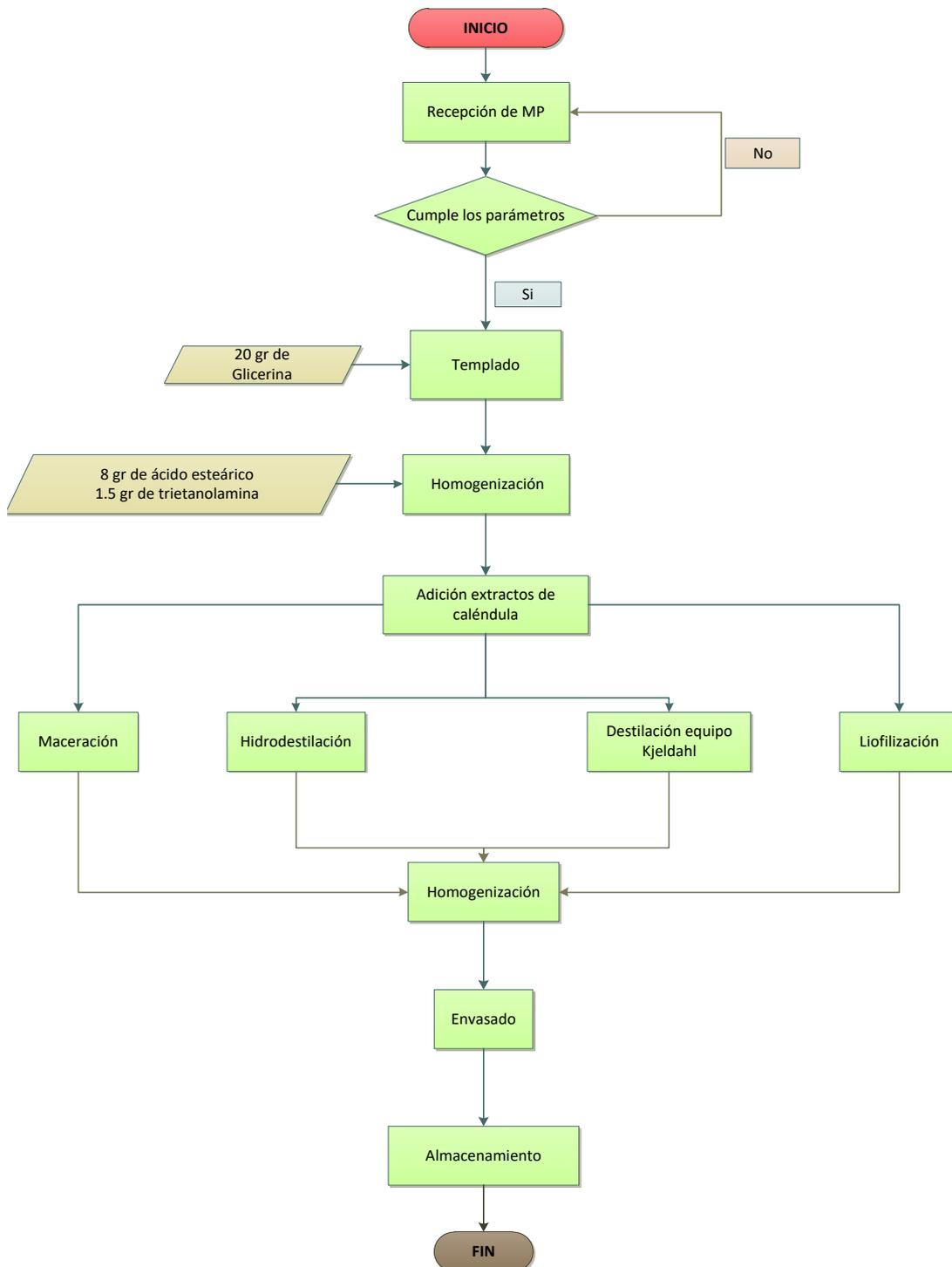


Figura 9. Elaboración de crema cosmética.

3.5.3. Siembra y análisis microbiológico

En una cámara de flujo lámina para bacterias se siembra 1 ml de crema en tubos de ensayo con agua peptona, este paso se realiza con los 4 tratamientos de cada repetición. Con un vortex se procede a agitar durante 15 minutos cada tubo de ensayo para homogenizar las muestras, con una micropipeta de 10 a 100 uL, toma 100 uL de muestra de los tubos de ensayo y se coloca en los respectivos medios específicos utilizados, los cuales son: PDA, AS, EMB, MS. Cada medio inoculado se procede a colocar en una incubadora a temperatura de 37°C durante 24 Horas, se procede a tomar los datos en un contador de microorganismos para determinar el número de colonias obtenidas en cada muestra, en la Figura 10 se determina el flujo de procesos (Guías de prácticas UDLA, 2014).

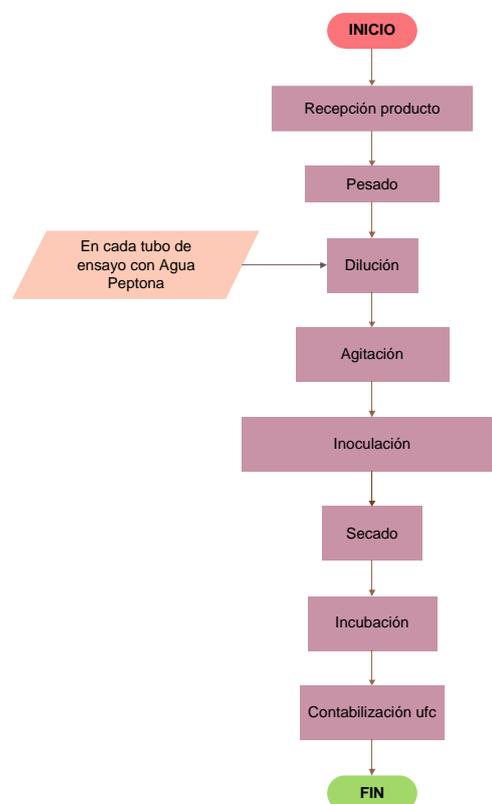


Figura 10. Siembra y análisis microbiológico de crema cosmética.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Análisis fisicoquímico

El principal análisis que se tomó dentro de la investigación fue la medida de pH en las cremas con los 4 métodos de extracción en las 3 repeticiones que simularon un periodo de 1 año, como podemos observar en la Tabla 16. Como sabemos el pH de una crema cosmética tiene un impacto directo en la piel y según el pH de la misma puede ser utilizado para diferentes tratamientos como acné, manchas, envejecimiento, entre otros.

Tabla 16.

Valores de pH en cremas con extractos de caléndula.

	Repetición 1				Repetición 2				Repetición 3			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
pH	6.4	6.7	5.8	6.4	6.3	6.7	5.6	6.4	6.5	6.6	5.6	6.5

Un estudio realizado por Verónica Mora determino que las cremas cosméticas pueden tener un pH de 6.7, en el estudio para elaborar una crema cosmética antiedad a base de cúrcuma longa. Según la norma INEN 2867 los rangos permitidos para una crema alcalina o acida debe estar entre los 3 o 10 puntos en la escala de pH según el uso de la crema (Moya. V, 2014). Como se puede determinar los rangos en las cremas a base de extractos de caléndula están entre los 5.6 a 6.7 pH.

4.2. Variables de estudio

Se aplicaron análisis físico-químicos y microbiológicos considerando la NORMA INEN 2867 en cada una de las tres repeticiones del experimento, con los respectivos medios de extracción de la flor de caléndula, en 4 medios de cultivo, con un total de 4 tratamientos.

El análisis se ejecutó cada 24 horas, este se realizó pasando una semana entre cada repetición hasta llegar al día 30, simulando la vida útil de la crema a un año

dentro de la cámara de estabilidad en condiciones controladas de 40 °C, con una humedad del 75 %.

Se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA registrando los valores obtenidos del experimento en el Software de análisis estadístico InfoStat, donde se puede observar las diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones durante el tiempo establecido, analizando las variables microbiológicas para *Mesófilos aerobios*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

4.3. Análisis microbiológico

Se realizó un análisis microbiológico de cada repetición de los cuatro métodos de extracción a distintos tiempos. Los microorganismos a analizar fueron *Mesófilos Aerobios Totales* en medio PCA, *Pseudomona Aeruginosa* en medio AS, *Staphylococcus Aureus* en medio MS y *Escherichia Coli* en medio EMB.

En el análisis microbiológico se evaluó el poder antioxidante y antimicrobiano de los diferentes tratamientos en cada repetición, obteniendo como resultado un mejor control de los microorganismos en el tratamiento 1 (Aceite esencial obtenido por hidrodestilación) y tratamiento 2 (Extracto acuoso obtenido por el método Kjeldahl en H₂O) como se muestra en las Tablas 17, 18 y 19 respectivamente.

En el caso de *Mesófilos aerobios totales* y *Pseudomona aeruginosa* presentaron una mayor incidencia en los tratamientos T3 (extracto acuoso por maceración) y T4 (Caléndula en polvo por liofilización) como se muestra en las Tablas 17, 18 y 19.

En el caso de *Staphylococcus aureus* y *E. Coli* no presentaron incidencia en ninguno de los cuatro tratamientos realizados en las distintas repeticiones como se muestra en las Tablas 17, 18 y 19.

Tabla 18.

Análisis microbiológicos segunda repetición con sus respectivos medios de extracción.

Aerobios totales (PCA)									
Tratamiento	t 0			t 1			t 2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
T3	3	3	3	2	2	2	2	1	1
T4	2	2	2	2	2	1	2	2	1
Pseudomona aeruginosa (AS)									
Tratamiento	t 0			t 1			t 2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	10	11	9	3	2	3	1	2	1
T4	4	5	5	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus (MS)									
Tratamiento	t 0			t 1			t 2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E. Coli (EMB)									
Tratamiento	t 0			t 1			t 2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 19.

Análisis microbiológicos tercera repetición con sus respectivos medios de extracción.

Aerobios totales (PCA)									
Tratamiento	t 0				t 1			t 2	
T1	3	3	2	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	7	8	8	8	5	7	3	2	3
T4	3	5	4	2	2	2	2	1	1

Pseudomona aeruginosa (AS)									
Tratamiento	t 0				t 1			t 2	
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	10	8	9	3	2	1	2	1	1
T4	3	3	2	2	2	1	1	1	1

Staphylococcus aureus (MS)									
Tratamiento	t 0				t 1			t 2	
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

E. Coli (EMB)									
Tratamiento	t 0				t 1			t 2	
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Una vez obtenidas el número de colonias encontradas en cada medio se realizó un promedio para poder obtener resultados en cada tiempo, para obtener estos

resultados se aplica en la ecuación 1 de la Tabla 20, de esta manera se obtiene las ufc en gr o mL de muestra.

Tabla 20.

Ecuación para obtener el conteo real de ufc por gr o mL.

Ufc =	# Colonias	x	$\frac{1}{V \text{ mL}}$	x	$\frac{1}{\text{Fac}}$
Ufc =	# Colonias	x	$\frac{1}{0,1}$	x	$\frac{1}{10^{-1}}$
Ufc =	# Colonias	x	10	x	10

4.3.1. Mesófilos aerobios totales

En la Tabla 21 se tomó los datos de las Tablas 17, 18 y 19 para realizar un promedio de datos con respecto al número de colonias de cada tratamiento y de acuerdo a su respectiva repetición en medio PCA para *Aerobios totales*.

Tabla 21.

Datos promediados medio PCA para Aerobios totales.

Repetición	Tratamientos	Aerobios T0	Aerobios T1	Aerobios T2
1	1	1,7	0	0
	2	0	0	0
	3	8,7	7,7	4,7
	4	5,7	4,7	1,7
2	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	3	2	1,3
	4	2	1,7	1,7
3	1	2,7	0	0
	2	0	0	0
	3	7,7	6,7	2,7
	4	4	2	1,3

Una vez obtenidos los promedios de la Tabla 21 se procedió a aplicar la ecuación explicada en la Tabla 20 para obtener el número de ufc para *Aerobios totales* en medio PCA detallados en la Tabla 22.

Tabla 22.

Número de colonias en medio PCA para Aerobios totales.

Repetición	Tratamientos	Aerobios T0	Aerobios T1	Aerobios T2
1	1	170	0	0
	2	0	0	0
	3	870	770	470
	4	570	470	170
2	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	300	200	130
	4	200	170	170
3	1	270	0	0
	2	0	0	0
	3	770	670	270
	4	400	200	130

Para realizar la obtención en *Mesófilos aerobios* se evaluó en un medio selectivo llamado *Plate Count Agar (PCA)*, durante un periodo de 24 horas entre cada repetición a 37 °C, y replicando el proceso pasando una semana, durante un periodo de 30 días en la cámara de estabilidad a una temperatura de 40 °C y una humedad del 75 % la cual simuló un periodo de 1 año en la crema cosmética. De esta manera se evaluó la crema con sus extractos y el crecimiento microbiano. En este caso de estudio, la variable dependiente constituyo los *Aerobios mesófilos*, y las variables independientes fueron los tratamientos (Tabla 11) con repeticiones en el tiempo. En las Tablas 23, 25 y 27 se visualizan los datos estudiados del análisis de varianza para los distintos tiempos.

Tabla 23.

ANOVA para Mesófilos aerobios totales, en tiempo 0.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	903875,00	180775,00	9,65	0,0078
Repeticiones	2	178716,67	89358,33	4,77	0,0576
Tratamientos	3	725158,33	241719,44	12,90	0,0050
Error	6	112416,67	18736,11		
Total	11	1016291,67			

En la Tabla 24 se analizó diferencias entre medidas de tratamientos del diseño experimental en el tiempo 0, se observó significancias entre tratamientos Figura 11.

Tabla 24.

Prueba de Tukey al 0,5%, ponderación de tratamientos en Mesófilos aerobios tiempo 0.

Tratamientos	Medias	Rango
2	0,00	A
1	146,67	A B
4	390,00	B C
3	646,67	C

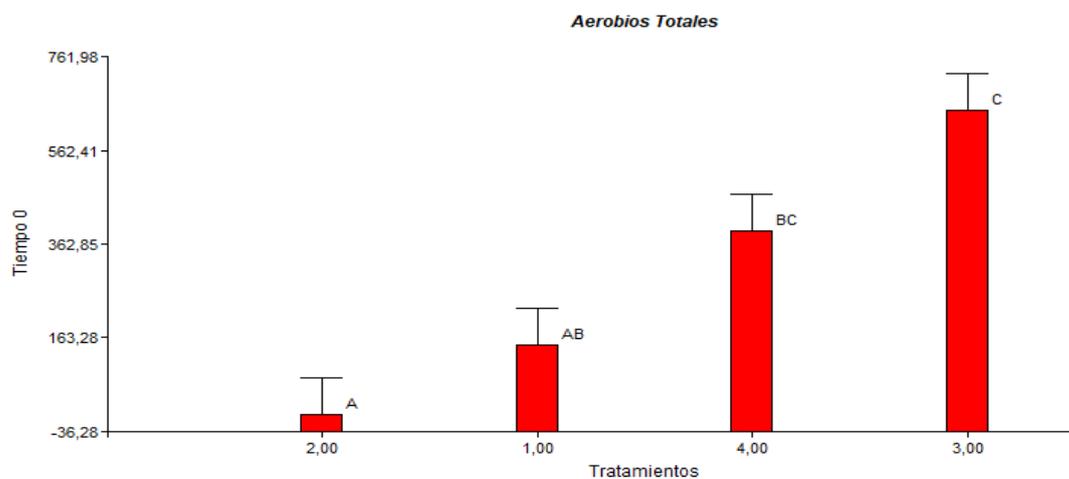


Figura 11. Promedio y desviación Aerobios Mesófilos tiempo 0.

Tabla 25.

Análisis de varianza para Mesófilos aerobios en el tiempo 1.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	714516,67	142903,33	5,93	0,0255
Repeticiones	2	95316,67	47658,33	1,98	0,2188
Tratamientos	3	619200,00	206400,00	8,57	0,0137
Error	6	144550,00	24091,67		
Total	11	859066,67			

En la Tabla 26 se analizó diferencias entre medidas de tratamientos del diseño experimental en el tiempo 1, se observó significancias entre tratamientos Figura 12.

Tabla 26.

Ponderación de tratamientos para Mesófilos aerobios en el tiempo 1, prueba de Tukey al 0,5%.

Tratamiento	Medias	Rango
2	0,00	A
1	0,00	A
4	280,00	A B
3	546,67	B

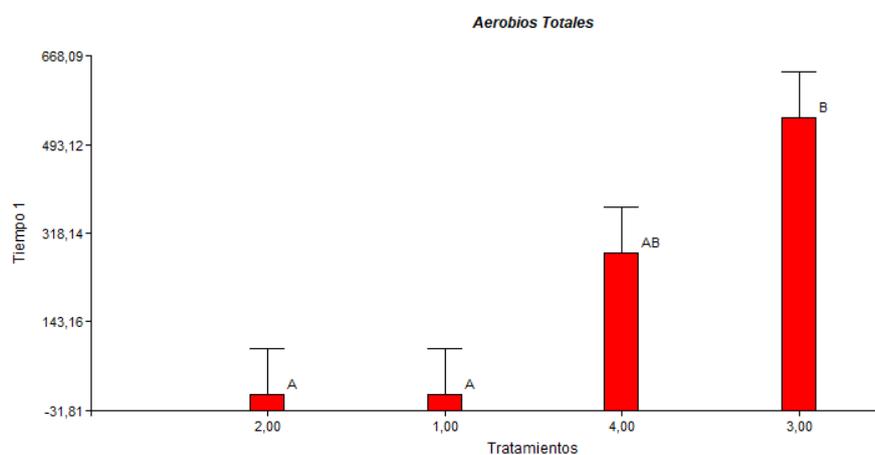


Figura 12. Promedio y desviación *Aerobios Mesófilos* tiempo 1.

Tabla 27.

Análisis de varianza para Mesófilos aerobios en el tiempo 2.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	191566,67	38313,33	5,20	0,0345
Repeticiones	2	15266,67	7633,33	1,04	0,4106
Tratamientos	3	176300,00	58766,67	7,98	0,0162
Error	6	44200,00	7366,67		
Total	11	235766,67			

En la Tabla 28 se analizó diferencias entre medidas de tratamientos del diseño experimental en el tiempo 1, se observó significancias entre tratamientos Figura 13.

Tabla 28.

Ponderación de tratamientos para Mesófilos aerobios totales en el tiempo 2, prueba de Tukey al 0,5% en el tiempo establecido.

Tratamiento	Medias	Rango
2	0,00	A
1	0,00	A
4	156,67	A B
3	290,00	B

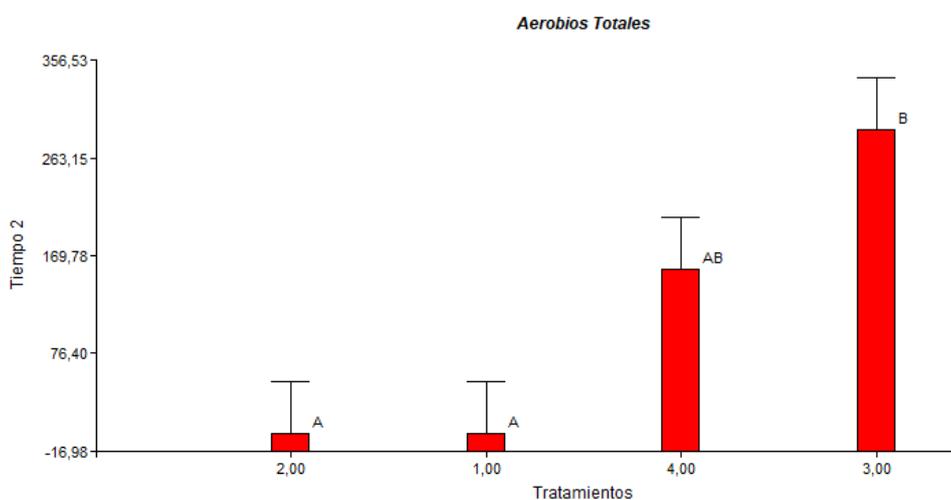


Figura 13. Promedio y desviación Aerobios Mesófilos tiempo 2.

Para comprobar la acción antioxidante y antimicrobiana, José Ojeda en el año 2016 realizó un estudio farmacológico de la planta de caléndula sobre *S. aureus*, *E. Coli*, *E. agglomerans*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. desinterae*, *S. typhi*, *P. aeuroginosa* y *C. albicans*, los resultados de este trabajo demostraron una mayor capacidad antioxidante en el extracto en agua de caléndula, comparado con un tratamiento con vitamina C (Ojeda Cuevas, 2016, pág. 49), mientras que las pruebas microbianas indicaron inhibición de crecimiento para bacterias *B. cereus*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. dysenteria*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*.

El deterioro de un cosmético es menor por los compuestos químicos que son utilizados, pero estos en muchas ocasiones tienen consecuencias adversas sobre la salud, es por esto que las grandes empresas cosméticas buscan reemplazar estos compuesto químicos por compuestos naturales que puedan controlar el crecimiento microbiológico y el enranciamiento oxidativo.

Elizabeth Domínguez realizó un estudio sobre las flores de caléndula y su extracto hidroalcohólico en la mejora del color y vida útil en distintos tipos de pulpa de frutas, el estudio concluyo que la flor de caléndula tiene un alto poder antioxidante en concentraciones grandes. Combinado con un adecuado almacenamiento, puede ayudar al control microbiano principalmente de hongos y levaduras, aumentando considerablemente el tiempo de vida útil del producto por reflejar el poder anti fúngico de la misma (Domínguez, 2012, pág. 108).

Se observó con respecto al control de *Mesófilos aerobios totales*, que se presentó con mayor frecuencia en el tratamiento T1 y T2 como muestra la Tabla 22, para comprobar los resultados se realizó un gráfico de barras donde se analiza el promedio de ufc con respecto a las repeticiones y los tratamientos realizados como se muestra en la Figura 14.

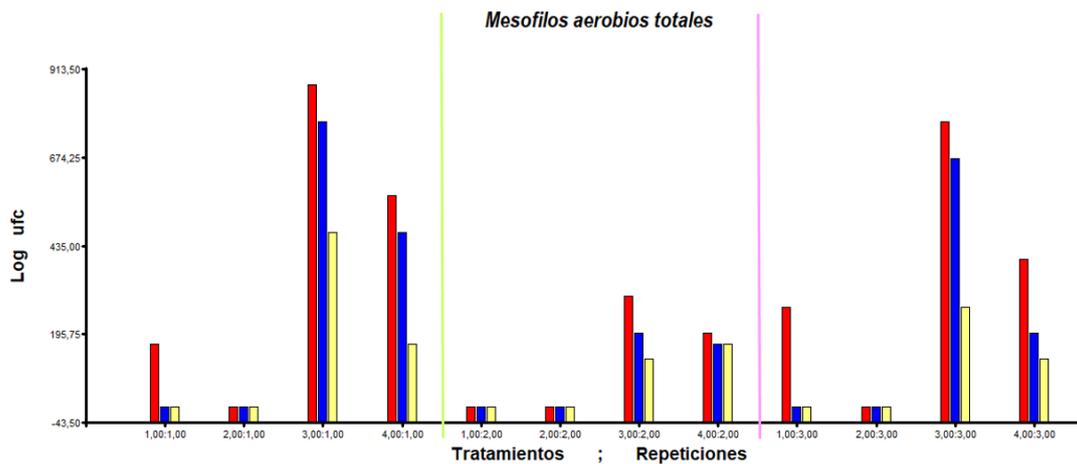


Figura 14. Proliferación de *Aerobios mesófilos*, analizados en el tiempo 0 (rojo), tiempo 1 (azul) y tiempo 2 (amarillo).

Tras el análisis ANOVA evaluando cada resultado obtenido durante el periodo de tiempo establecido, la presencia de microorganismos fue disminuyendo paulatinamente.

Tratamiento 3 (Tabla 22), se observa la mayor incidencia de *aerobios mesófilos* con una ponderación de 870 ufc/mL presentada en la Figura 14.

Tratamiento 2 (Tabla 22), se muestra que la incidencia de aerobios mesófilos es de 0 ufc/mL en las tres repeticiones y tiempos analizados, como se presentada en la Figura 14.

Se puede observar los valores de las ufc de acuerdo a repeticiones y tratamientos, los cuales van disminuyendo de acuerdo a los tiempos en los que se expuso la crema con los extractos de la flor de caléndula.

Los tratamientos T1 y T2 (Tabla 22), fueron los que ayudaron a controlar y mantener la menor incidencia de *aerobios mesófilos* en cada repetición realizada.

Los tratamientos T3 y T4 (Tabla 22), fueron los que mayor contaminación de aerobios mesófilos presentaron en el periodo establecido, teniendo las mismas condiciones que los otros tratamientos.

Se calculó un promedio de las ufc obtenidas de cada tratamiento \pm la desviación estándar (Tabla 30 a la 33) indica el continuo decrecimiento de los microorganismos *aerobios*. Para esto se usa los datos de la Tabla 29, donde se ordena los datos por tratamientos con sus variables en el tiempo.

Tabla 29.

Conteo de ufc divididas por tratamientos con variables en el tiempo.

Mesófilos aerobios totales			
Tratamiento	t0	t1	t2
1	170	0	0
1	0	0	0
1	270	0	0
2	0	0	0
2	0	0	0
2	0	0	0
3	870	770	470
3	300	200	130
3	770	670	270
4	570	470	170
4	200	170	170
4	400	200	130

Tabla 30.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T1)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Aerobios T0	3	146,67	136,50	93,07	170,00
Aerobios T1	3	0,00	0,00	sd	0,00
Aerobios T2	3	0,00	0,00	sd	0,00

Tabla 31.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T2)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Aerobios T0	3	0,00	0,00	sd	0,00
Aerobios T1	3	0,00	0,00	sd	0,00
Aerobios T2	3	0,00	0,00	sd	0,00

Tabla 32.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T3)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Aerobios T0	3	646,67	304,36	47,07	770,00
Aerobios T1	3	546,67	304,36	55,68	670,00
Aerobios T2	3	290,00	170,88	58,92	270,00

Tabla 33.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T4)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Aerobios T0	3	390,00	185,20	47,49	400,00
Aerobios T1	3	280,00	165,23	59,01	200,00
Aerobios T2	3	256,67	23,09	14,74	170,00

4.3.2. Pseudomona aeruginosa

En el análisis que aplicó a *Pseudomona aeruginosa* en el tiempo establecido, se le pudo realizar en agar sangre o AS, el cual es un medio específico para la proliferación de este microorganismo. En la Tabla 34 se tomó los datos de las Tablas 17, 18 y 19 para realizar un promedio de datos con respecto al número

de colonias de cada tratamiento y de acuerdo a su respectiva repetición en medio AS en *Pseudomona aeruginosa*.

Tabla 34.

Datos promediados medio AS para Pseudomona aeruginosa.

Repetición	Tratamientos	Pseudomona T0	Pseudomona T1	Pseudomona T2
1	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	9	6	5
	4	8	0	0
2	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	10	2,7	1,3
	4	4,7	0	0
3	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	9	2	1,33
	4	2,7	1,7	1

Una vez obtenidos los promedios de la Tabla 34 se procedió a aplicar la ecuación explicada en la Tabla 20 para obtener el número de ufc para *Pseudomona aeruginosa* en medio AS detallados en la Tabla 35.

Tabla 35.

Datos promedio del número de colonias en medio AS para Pseudomona aeruginosa.

Repetición	Tratamientos	Pseudomona T0	Pseudomona T1	Pseudomona T2
1	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	900	600	500
	4	800	0	0
2	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	1000	270	130
	4	470	0	0

	1	0	0	0
3	2	0	0	0
	3	900	200	133
	4	270	170	100

Se puede observar en las Tablas de la (36 a 41) de la ponderación de medidas y resultados del análisis ANOVA, se puede comprobar las diferencias significativas en Figuras de la (15 a 17) entre tratamientos y repeticiones dados en el tiempo de exposición.

Tabla 36.

ANOVA para Pseudomonas aeruginosa en el tiempo 0.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	1869550,00	373910,00	19,57	0,0012
Repeticiones	2	35316,67	17658,33	0,92	0,4467
Tratamientos	3	1834233,33	611411,11	32,01	0,0004
Error	6	114616,67	19102,78		
Total	11	1984166,67			

Tabla 37.

Ponderación de tratamientos para Pseudomonas aeruginosa en el tiempo 0, prueba de Tukey al 0,5%.

Tratamiento	Medias	Rango
1	0,00	A
2	0,00	A
4	513,33	B
3	933,33	C

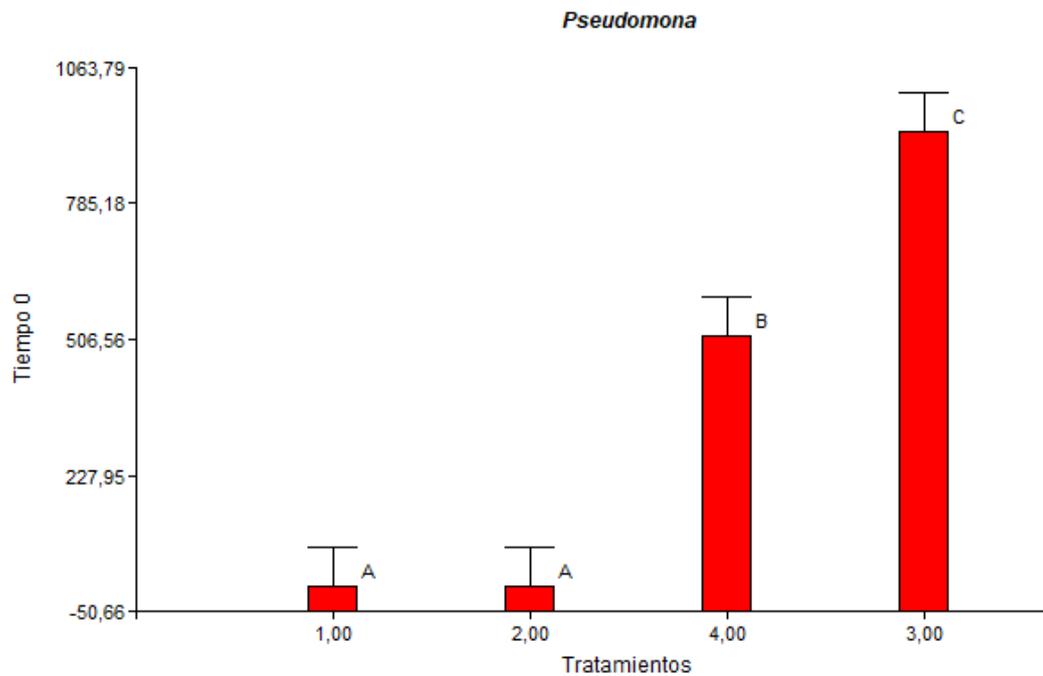


Figura 15. Promedio y desviación *Pseudomona aeruginosa* tiempo 0.

Tabla 38.

ANOVA para *Pseudomona aeruginosa* en el tiempo 1.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	277450,00	55490,00	3,46	0,0813
Repeticiones	2	14316,67	7158,33	0,45	0,6596
Tratamientos	3	263133,33	87711,11	5,47	0,0375
Error	6	96216,67	16036,11		
Total	11	373666,67			

Tabla 39.

Ponderación de tratamientos para *Pseudomona aeruginosa* en el tiempo 1, prueba de Tukey al 0,5% en el día 30.

Tratamiento	Medias	Rango
2	0,00	A
1	0,00	A
4	56,67	A
3	356,67	A

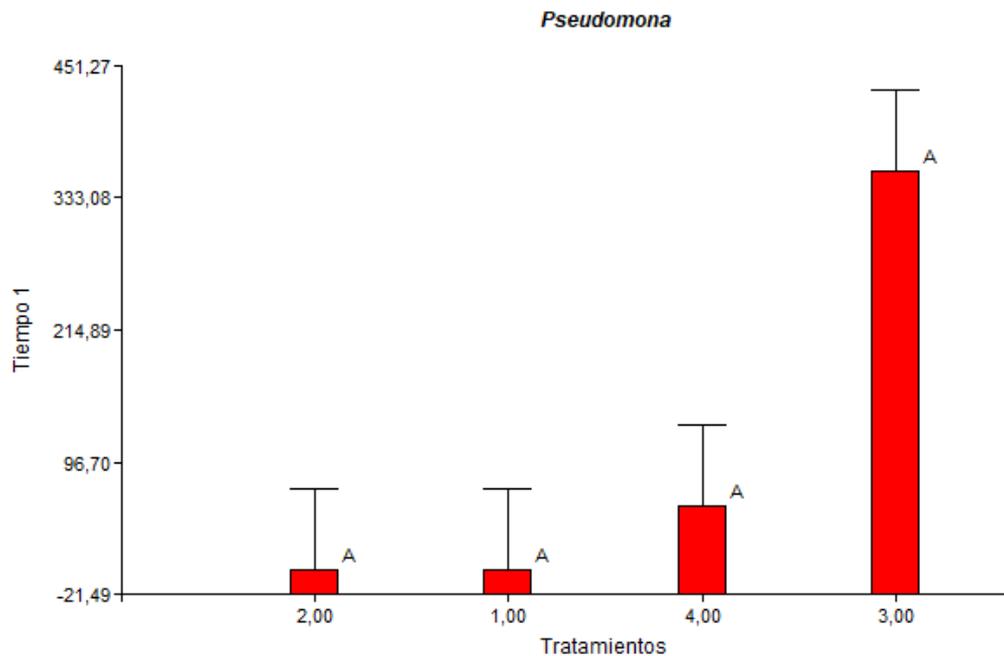


Figura 16. Promedio y desviación *Pseudomona aeruginosa* tiempo 1.

Tabla 40.

ANOVA para *Pseudomona aeruginosa* en el tiempo 2.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	153558,75	30711,75	2,33	0,1659
Repeticiones	2	18233,17	9116,58	0,69	0,5362
Tratamientos	3	135325,58	45108,53	3,43	0,0930
Error	6	78966,17	13161,03		
Total	11	232524,92			

Tabla 41.

Ponderación de tratamientos para *Pseudomona aeruginosa* en el tiempo 2, prueba de Tukey al 0,5% en el tiempo establecido.

Tratamiento	Medias	Rango
2	0,00	A
1	0,00	A
4	33,33	A
3	254,33	A

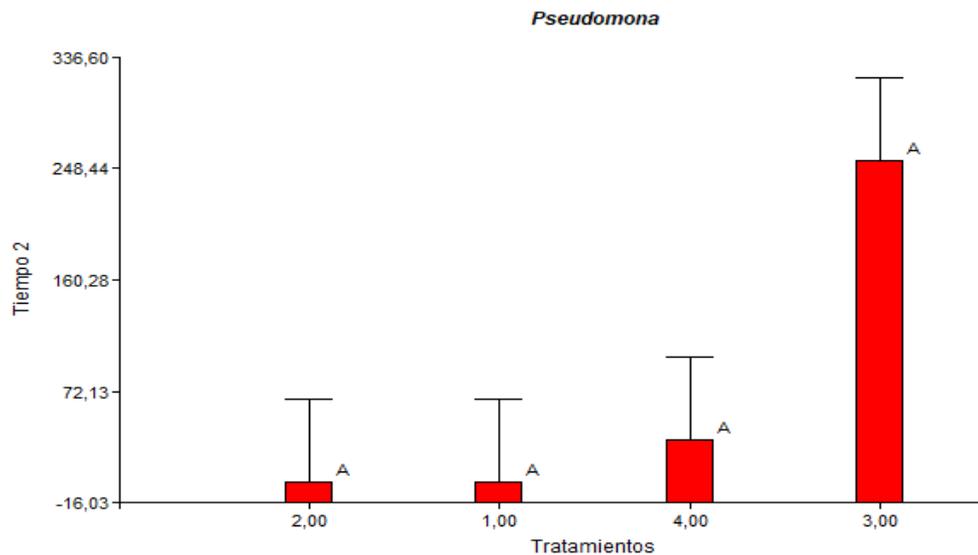


Figura 17. Promedio y desviación *Pseudomona aeruginosa* tiempo 1.

Maribel Bermúdez realizó un estudio para evaluar la capacidad antimicrobiana y antimicótica de una crema a base de caléndula con el uso de un 20 % de esta sobre la fórmula, esta se evaluó la cepa ATCC 9027 *Pseudomona aeruginosa* sobre (Bermúdez. M, 2016, pág. 4), los cuales mostraron una reducción del microorganismo en tiempos de contacto de 5 min. La forma farmacéutica fue aceptable en cuanto a color, textura, olor y capacidad de absorción, estas características otorgan valor agregado. En cuanto al poder bactericida y fúngico de la crema, se observa un 99 % de la reducción del crecimiento del agente infeccioso, concluyendo que la crema puede ayudar al tratamiento de dermatosis cutánea causada por esta bacteria o al control de infecciones cutáneas.

José Ojeda realizó un estudio farmacológico para comprobar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la planta de caléndula sobre *P. aeruginosa*, los resultados de este trabajo demostraron una mayor capacidad antioxidante y antimicrobiano en el extracto con agua de caléndula, comparado con un tratamiento con vitamina C (Ojeda. J, 2016, pág. 49).

Los tratamientos con mejor resultado en el control de *Pseudomona aeruginosa* fueron T2 (Tabla 35) respectivamente, durante el periodo de 30 días expuestos al extracto de caléndula. Para comprobar los resultados se realizó un gráfico de

barras donde se analiza el promedio de ufc con respecto a las repeticiones y los tratamientos realizados como se muestra en la Figura 18.

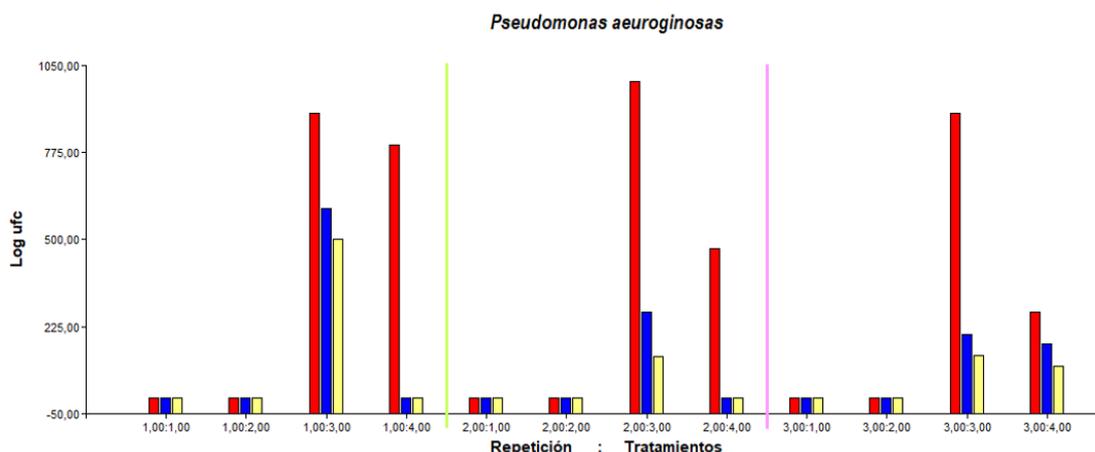


Figura 18. Proliferación de *Pseudomona aeruginosa*, analizados en el tiempo 0 (rojo), tiempo 1 (azul) y tiempo 2 (amarillo).

Aplicando un análisis ANOVA de cada resultado obtenido durante el periodo de tiempo determinado, se concluye que la presencia de microorganismos fue disminuyendo paulatinamente.

En el tratamiento T3 (Tabla 35), podemos observar la mayor incidencia de *Pseudomona aeruginosa* presentada en la Figura 18.

Mientras que en los tratamientos T1 y T2 (Tabla 35) vemos que no hay incidencia de *Pseudomona aeruginosa* como presentada en la Figura 18.

Como se puede observar los valores de las ufc de acuerdo a repeticiones y tratamientos van disminuyendo de acuerdo a los tiempos en los cuales se expuso la crema con los extractos de la flor de caléndula.

Los tratamientos T1 y T2 (Tabla 35), fueron los que ayudo a controlar en su totalidad la incidencia de *Pseudomona aeruginosa* en cada repetición realizada.

Los tratamientos T3 y T4 (Tabla 35), presentaron mayor contaminación de *Pseudomona aeruginosa* en el periodo de estabilidad analizado, el cual tuvo las mismas condiciones que los otros tratamientos.

El promedio de ufc de *p. aeruginosa*, obtenido de cada tratamiento \pm su desviación estándar (Tabla 43 a la 46) indica el continuo decrecimiento de los microorganismos. Para esto se usó los datos de la Tabla 42, donde ordenamos los datos por tratamientos con sus variables en el tiempo.

Tabla 42.

Conteo de ufc divididas por tratamientos con variables en el tiempo.

Pseudomona aeruginosa			
Tratamientos	t0	t1	t2
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
2	0	0	0
2	0	0	0
2	0	0	0
3	900	600	500
3	1000	270	130
3	900	200	130
4	800	0	0
4	470	0	0
4	270	170	100

Tabla 43.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T1)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Pseudomona T0	3	0,00	0,00	Sd	0,00
Pseudomona T1	3	0,00	0,00	Sd	0,00
Pseudomona T2	3	0,00	0,00	Sd	0,00

Tabla 44.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T2)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Pseudomona T0	3	0,00	0,00	Sd	0,00
Pseudomona T1	3	0,00	0,00	Sd	0,00
Pseudomona T2	3	0,00	0,00	Sd	0,00

Tabla 45.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T3)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Pseudomona T0	3	933,33	57,74	6,19	900,00
Pseudomona T1	3	356,67	213,62	59,89	270,00
Pseudomona T2	3	253,33	213,62	84,32	130,00

Tabla 46.

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, mediana, límite superior, límite inferior, T. (T4)

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Pseudomona T0	3	513,33	267,64	52,14	770,00
Pseudomona T1	3	56,67	98,15	173,21	0,00
Pseudomona T2	3	33,33	57,74	173,21	0,00

4.3.3. *Staphylococcus aureus*

El análisis microbiológico para *Staphylococcus aureus* en el periodo establecido, se analizó en Manitol Salado o mejor conocido como agar MS, el cual es un medio de cultivo selectivo para este microorganismo. En la Tabla 47 se tomó los datos de las Tablas 17, 18 y 19 para realizar un promedio de datos con respecto al número de colonias de cada tratamiento y de acuerdo a su respectiva repetición en medio MS en *Staphylococcus aureus*.

Tabla 47.

Datos promediados medio MS para Staphylococcus aureus.

Repetición	Tratamientos	Staphylococcus t 0	Staphylococcus t 1	Staphylococcus t 2
1	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
2	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
3	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0

Maribel Bermúdez realizó un estudio para evaluar la capacidad antimicrobiana y antimicótica de una crema a base de caléndula con el uso de un 20 % de la misma en la formula, la cual evaluó sobre *Staphylococcus aureus cepa MSSA25923* (Bermúdez. M, 2016, pág. 4) los cuales mostraron una reducción del microorganismo en tiempos de contacto de 5 min con una efectividad de 98.8% por el extracto etanólico de la caléndula con halos de inhibición de 13mm +/-1 y 28mm +/-2. La forma farmacéutica fue aceptable en cuanto a color, textura, olor y capacidad de absorción, concluyendo que la crema puede ayudar al tratamiento de dermatosis cutánea causada por esta bacteria o al control de infecciones cutáneas.

Román Ramírez, realizó un estudio sobre extractos de plantas (*Calendula officinalis*) provenientes del área rural de Soracá, Municipio de Colombia, contra *Staphylococcus aureus*. Donde se sometió a la cepa *S. aureus* ATCC 43300 a una concentración de 10 mg/mL del extracto de *Calendula officinalis*, lo cual dio como resultado una alta actividad antibacteriana contra este microorganismo, ya que tanto en el extracto metanólico y diclorometánolico se presentó una inhibición, posterior se determinó la concentración mínima inhibidora, diluyendo

6 veces la concentración inicial hasta llegar a 0,156 mg/mL, donde el extracto de caléndula demostró efectividad hasta una concentración de 1,25 mg/mL, se concluyó que la actividad antibacteriana es buena inhibiendo el crecimiento de esta bacteria. (Ramírez, Ávila, & Espitia, 2015, págs. 4-7)

Se comprobó que los distintos extractos de caléndula controlan adecuadamente las bacterias *Staphylococcus aureus*, durante el periodo de 30 días expuestos al extracto de caléndula.

4.3.4. Escherichia Coli

El análisis realizado para la bacteria *E. Coli* en el periodo establecido, se realizó en agar EMB, el cual es un medio de cultivo selectivo para este microorganismo. En la Tabla 48 se tomó los datos de las Tablas 17, 18 y 19 para realizar un promedio de datos con respecto al número de colonias de cada tratamiento y de acuerdo a su respectiva repetición en medio EMB en *E. Coli*.

Tabla 48.

Datos promediados medio EMB para la bacteria E. Coli.

Repetición	Tratamientos	E. Coli t 0	E. Coli t 1	E. Coli t 2
1	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
2	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
3	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0

José Ojeda también analizó la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la planta de caléndula para el control de la *E. Coli*. Los resultados de este trabajo

demonstraron que el extracto acuoso de caléndula officinalis en concentraciones mayores a 11,95 ug/mL controla la reproducción microbiana (Ojeda. J, 2016, pág. 49), En la tabla 6,8 del trabajo realizado por Ojeda podemos ver que las pruebas microbianas indicaron inhibición de crecimiento para bacterias *B. cereus*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. dysenteria*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*.

Se tiene como base el antecedente del control del extracto de caléndula sobre *E. Coli*, hipótesis que queda demostrada en los tratamientos aplicados (Tabla 48) que los distintos extractos de caléndula controlaron adecuadamente *Escherichia Coli*, durante el periodo de 30 días expuestos al extracto de caléndula (Tabla 11).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los extractos obtenidos de la flor de caléndula presentaron un efecto antioxidante y antimicrobiano, determinando así que puede ser utilizado como un tratamiento en productos agroindustriales. La concentración del extracto de caléndula vario según el tratamiento realizado.

Para el control de microorganismos *Mesófilos aerobios*, se determinó que el tratamiento evaluado con resultados sobresalientes fue el T2 (Aceite esencial de caléndula por hidrodestilación), presentando una inhibición total sobre el microorganismo. Cumpliendo así el lineamiento establecido por la norma INEN 2867 donde el límite máximo permitido es 5×10^3 ufc/g o mL.

En el análisis realizado a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* las diferencias significativas determinaron que los tratamientos T1 (Extracto en agua por destilación con equipo Kjeldahl) y T2 (Aceite esencial de caléndula por hidrodestilación) inhibieron el crecimiento en su totalidad, cumpliendo así con la norma INEN 2867 en la cual el límite máximo permitido es ausencia en 1g o mL.

En el periodo establecido no se presentó unidades formadoras de colonias en los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en ninguno de los tratamientos. Cumpliendo así con los parámetros de la norma INEN 2867, ya que los parámetros establecidos es ausencia en 1 g o mL en ambos microorganismos.

Los extractos obtenidos de caléndula permitieron realizar la elaboración de una línea de producción para fabricación de cremas cosméticas, permitiendo el uso de los distintos métodos de extracción del material vegetal para su uso como materia prima.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios generales de la flor de caléndula, con el fin de determinar el poder antioxidante y antibacterial que tiene sobre distintos tipos de microorganismos, ya que estudios realizados por el momento han sido para

determinar el poder antimicrobiano en microorganismos determinados por las normativas sanitarias para los distintos tipos de productos agroindustriales. Con el fin de establecer si el extracto de flor puede servir para remplazar antioxidantes de origen químico, que actualmente son los más utilizados en la conservación de productos para el uso humano y alimentos.

Se recomienda utilizar extractos de caléndula en diferentes concentraciones a las utilizadas en este trabajo, para comprobar si en concentraciones más altas pueden controlar el ciclo de vida de la bacteria *Pseudomona* y *Mesófilos aerobios*.

Se recomienda realizar estudios sobre la capacidad antimicrobiana de las hojas de caléndula, para disminuir los residuos y mejorar el rendimiento de la planta, en el uso industrial.

REFERENCIAS

- Acosta de la Luz, L., Rodríguez Ferradá, C., & Sánchez Govín, E. (2001). Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(1), 23-27.
- Alzate, C. (2008). *Congelación y liofilización de alimentos*. . Gobernación de Caldas.
- Ara, A. (2003). *40 Plantas Medicinales* . (Vol. 137). EDAF.
- Aron-Brunetière, R. (1985). *Guía de Terapéutica dermatológica*. Barcelona.: 1ª ed.Masson S.A.
- Banos Román, F. F. (2012). *Efecto antimicrobiano" in vitro" de la tintura de arnica montana y calendula officinalis sobre streptococcus mitis* (Doctoral dissertation).
- Benmaman, J. (2005). Desarrollo de una línea de cremas para peinar de bajo costo (Tesis de pregrado). *Universidad Central de Venezuela*. Caracas, Distrito Federal, Venezuela.
- Bezanger-Beauquesne L. Nouveaux. (1985). Aspectos de plantas medicinales, usos. *Rev Plant Med Phyth*, 19(2):109-55.
- Canigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿ indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta farmacéutica bonaerense*, 22(3), 265-279.
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilacion de aceites esenciales*. Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Comunidad Andina de Naciones, Legislación en materia de productos cosméticos, Decisión 516:2002, Marzo 2002
- Comunidad Andina de Naciones, Modificación de la Decisión 516: "Armonización de legislaciones en materia de productos cosméticos", Decisión 777, Noviembre 2012
- Comunidad Andina de Naciones, Modificación de la Resolución 1418: Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos, Resolución 1482, Julio 2012
- De la Torre, L., Navarrete, H., Masia, M., & Balslev, H. (2002). *Plantas utiles del Ecuador*.

- Domínguez, L. (2012). *Efecto de la aplicación del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula (Calendula Officinalis) en la estabilización del color y vida útil en pulpa de frutas (Doctoral dissertation, . Bogota: Tesis para Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos .*
- Draelos Zoe, K. (1995). *Cosméticos en Dermatología*. México: Editorial Limusa, S. A. de CV.
- Eroski, C. (1 de Julio de 2003). Calendula officinalis. *Plantas medicinales*.
- Fang Mercado, L., Herrera Herrera, A., & Díaz Caballero, A. (2013). Enjuagues de Calendula officinalis como alternativa de los antisépticos orales. *Revista Cubana de Estomatología*, 50(4), 436-442.
- Gabriela, B. C. M., Alonso, D., Carlos, R. N. J., & Ronald, A. M. (2011). Formulación de una emulsión dermocosmética para el tratamiento del acné y cicatrices.
- Guerra Millán, F., Mallén Wiechers, C., Struck Garza, A., Varela Vega, T., & Zitlalpopoca Soriano , A. (2008). *Destilación simple*. Universidad Iberoamericana. México DF.
- Guerra Millán, F., Mallén Wiechers, C., Struck Garza, A., Varela Vega, T., & Zitlalpopoca Soriano, Á. (2008). *Destilación simple*. . México DF.: Universidad Iberoamericana.
- Hoyos, M. B., Naranjo, L. M. L., & González, D. A. Z. (2017). Elaboración de un preparado magistral a base de ajo (*Allium sativum*) y caléndula (*Calendula officinalis*) y evaluación de su actividad antimicrobiana y antimicótica. *Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud*, 1, 6-11.
- Inen, N. 2867, (2015). *Productos cosméticos Requisitos (Norma INEN 2867. 2015-03)*.
- Kaye , E. (2000). *Topical antibacterial agents*. Infect Dis Clin North Am.
- Lastra Valdés, H., & Piquet García, R. (1999). *Calendula officinalis*. 33(3), 188-194.
- Lio, P., & Kaye, E. (2004). *Topical antibacterial agents*. . Infect Dis Clin N Am.
- Martínez Fraga, J. (2012). *Los Cosméticos: Características Generales. Cosmetología*.
- Milián Vázquez, P. M., Seife Rodríguez, J. M., Morales Ojeda, R., VÁZQUEZ MONTERO, L., Martín Álvarez, C., & Quiros Enríquez, M. (2010).

Calendula officinalis L. en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal recurrente. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(5).

Muñoz, L. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas*.

Ojeda Cuevas, J. (2016). *Evaluación farmacológica del extracto de Calendula officinalis*.

Palmieri TL, Greenhalgh DG. (2002). Topical treatment of pediatric patients with burns: a practical guide. *Am J Clin Dermatol* 3: 529-34.

Perez, V. (2014). *Caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de myrcia amazonica dc. (myrtaceae)*. . Santarém, Pará. : Universidad federal do oeste de Pará.

Ramírez, R., Ávila, D., & Espitia, M. (2015). *Actividad antibacteriana de extractos de plantas provenientes del área rural de Soracá contra Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM)*. *Ciencia y Salud Virtual*.

Romero Duque, T., & Velásquez Pinzón, M. (2009). *Diseño de la cadena de abastecimiento de hierbas aromáticas y medicinales a Europa*. (Bachelor's thesis, Facultad de Ingeniería).

Romero, A., Xavier, J., & Basurto Jimbo, E. (2017). *Diseño de una crema cosmética a partir de un extracto hidroalcohólico de culantro . coriandrum sativum l*.

Salager, J. (2004). *Surfactantes, Generalidades y Materia Prima FIRP 301*,. Venezuela: Universidad de Los Andes, Facultad de Ingeniería.

Sande, M., & Mandell, G. (1987). *Agentes antimicrobianos*. En: Goodman A, Goodman L, Rall TW, Murad F. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 7ª ed. Buenos Aires:: Médica Panamericana.

Sarmiento Pérez, O. I. (2017). *Cinética de extracción del aceite esencial de Calendula officinalis L. mediante hidrodestilación y calentamiento ohmico asistido por hidrodestilación*.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogota: SECAB.

Tan Hiok-Hee. (2004). *Topical antibacterial treatments for acne vulgaris: comparative review and guide to selection*. *Am J Clin Dermatol*.

Tejada, C. (2016). *Emulsionantes y fabricación de cosméticos*. . Universidad de Sevilla. : Facultad de Farmacia.

Thornton, C., Tutrone, W., & Weinberg, J. (2003). *Topical antibacterial agents for wound care: a primer*. Dermatol Surg.

Universidad de Granada. (2006). *Secado por liofilización*. doi:1071

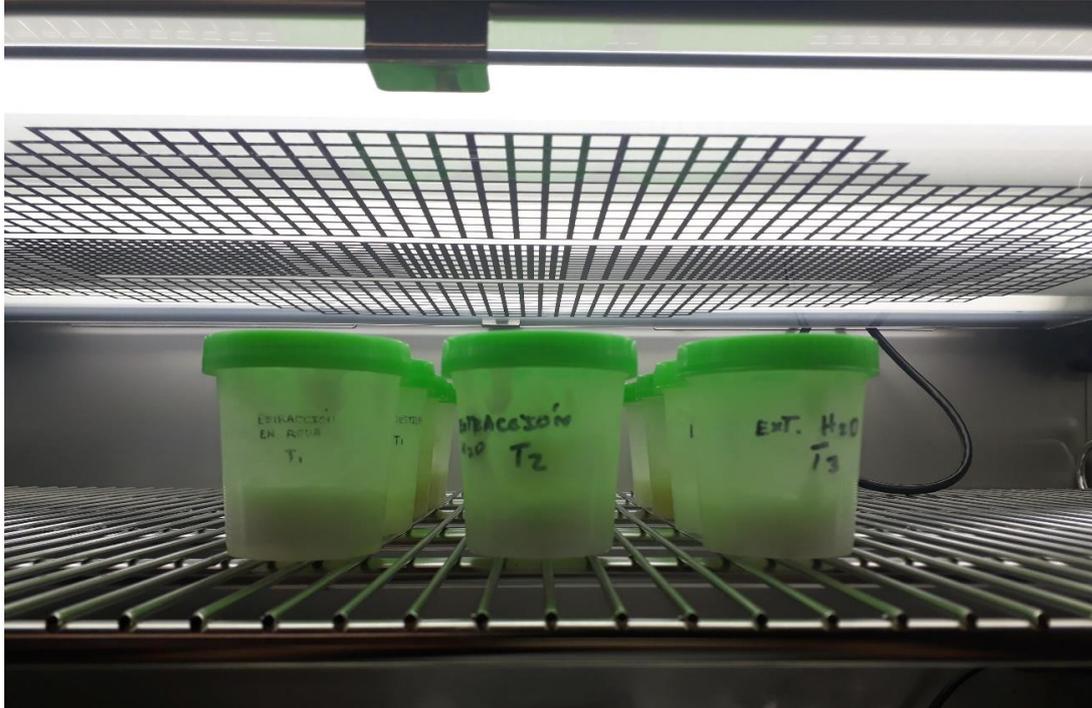
Wilkinson, J., & Moore, R. (1990). *Cosmetología de Harry*. Madrid: Ediciones Diaz de Santos.

ANEXOS

Anexo 2. Conteo de colonias totales presentes en los tratamientos durante la repetición 2, evaluado en el mes 5 al 8 dentro de la cámara de estabilidad.

Repetición 2									
Aerobios totales (PCA)									
Tratamiento	t0			t1			t2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	3	3	3	2	2	2	2	1	1
T4	2	2	2	2	2	1	2	2	1
Pseudomona aeruginosa (AS)									
Tratamiento	t0			t1			t2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	10	11	9	3	2	3	1	2	1
T4	4	5	5	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus (MS)									
Tratamiento	t0			t1			t2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E. Coli (EMB)									
Tratamiento	t0			t1			t2		
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

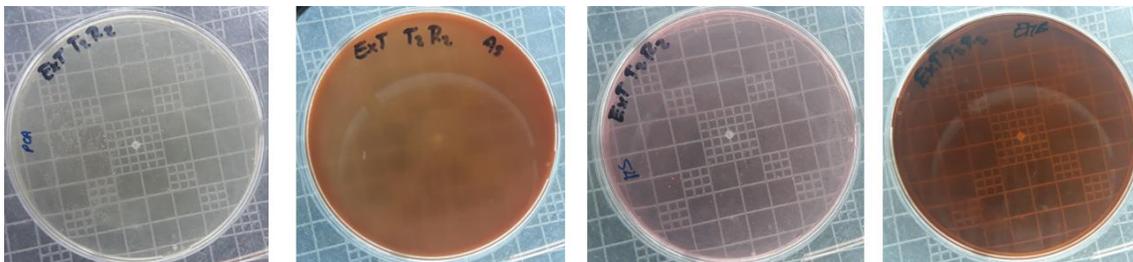
Anexo 4. Cremas cosméticas con sus distintos tratamientos y repeticiones, dentro de la cámara de estabilidad a 40 °C, con 37% humedad, simulación para determinar 1 año de vida útil del producto.



Anexo 5. Resultado del tratamiento 2 (Extracción en agua del extracto de caléndula) para la repetición número 1, en el tiempo 2. (Mejor tratamiento)



Anexo 6. Resultado del tratamiento 2 (Extracción en agua del extracto de caléndula) para la repetición número 2, en el tiempo 2. (Mejor tratamiento)



Anexo 7. Resultado del tratamiento 2 (Extracción en agua del extracto de caléndula) para la repetición número 3, en el tiempo 2. (Mejor tratamiento)

