



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LA EFICACIA DEL EXTRACTO DE *Kalanchoe pinnata* COMO
CONSERVANTE EN UNA EMULSIÓN COSMÉTICA

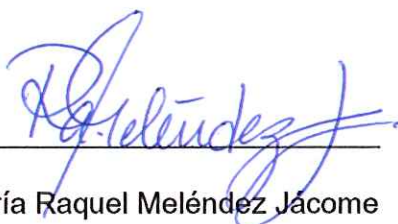
AUTORAS

Fátima Camila Tinoco Mesa
Gianina Isabel Verdesoto Pazmiño

AÑO
2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Análisis de la eficacia del extracto de *Kalanchoe pinnata* como conservante en una emulsión cosmética, a través de reuniones periódicas con las estudiantes Fátima Camila Tinoco Mesa y Gianina Isabel Verdesoto Pazmiño, en el semestre 202010, 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".



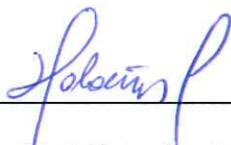
María Raquel Meléndez Jácome

Máster en Protección Vegetal y Fitofarmacia

CI: 1709384067

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Análisis de la eficacia del extracto de *Kalanchoe pinnata* como conservante en una emulsión cosmética, de las estudiantes Fátima Camila Tinoco Mesa y Gianina Isabel Verdesoto Pazmiño, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Héctor Abel Palacios Cabrera

Doctor en Tecnología de Alimentos

CI: 0912277480

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL LAS ESTUDIANTES

"Declaramos que este trabajo es original, de nuestra 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."



Fátima Camila Tinoco Mesa

CI: 1722748348



Gianina Isabel Verdesoto Pazmiño

CI: 1717879116



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LA EFICACIA DEL EXTRACTO DE *Kalanchoe pinnata* COMO
CONSERVANTE EN UNA EMULSIÓN COSMÉTICA

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

Profesor Guía

M. Sc. María Raquel Meléndez Jácome

Autoras

Fátima Camila Tinoco Mesa

Gianina Isabel Verdesoto Pazmiño

Año

2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá, quien siempre ha estado a mi lado y ha sabido apoyarme día tras día. A mis hermanos por siempre confiar en mí, ser mi inspiración y motivarme siempre. A Ricardo por siempre apoyarme a lograr mis sueños y metas. A Giani por su amistad y confianza a lo largo de toda mi carrera universitaria, lo que nos ha permitido terminar esta gran etapa juntas. A Raquel Meléndez por ser nuestra guía y transmitirnos sus conocimientos de la mejor manera. A todos quienes conforman Agrodely, bríndame la oportunidad y confianza para desarrollarme profesionalmente

Camila Tinoco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por haberme permitido tener esta experiencia, culminar esta carrera y colocar personas indicadas durante el camino.

A mi familia, por ser el eje principal y apoyarme en cada momento. A Cami, por la amistad y confianza en estos años. Además, por compartir esta experiencia conmigo y ser la mejor amiga.

A mis docentes y tutora Raquel por los conocimientos y apoyo brindado. A mis amigos y amigas por convertirse en personas de apoyo incondicional.

A Mateo, por ser una motivación día a día y ser mi compañero de aventuras.

Gianina Verdesoto

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi mamá y mis hermanos quienes quiénes fueron mi motor para concluir con mi carrera universitaria.

Camila Tinoco

DEDICATORIA

A mis padres Gloria y Guillermo por su apoyo, paciencia en todo momento y por darme los valores que tengo. A mi hermano, por confiar en mi en todo momento.

A mis amigos que siempre están en los buenos y malos momentos,

Gianina Verdesoto

RESUMEN

Durante los últimos años, la tendencia en cosmética se ha trasladado a un enfoque más “verde”, es decir, amigable con el ambiente. La necesidad aparece por satisfacer a un mercado alternativo, además, de reglamentos y leyes que desempeñan un rol importante en estos cambios. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la eficacia del extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* como conservante en una emulsión cosmética por medio de la metodología Challenge test, utilizada como referencia de la norma ISO 11930. Además, se analizó la estabilidad físico química acelerada de la emulsión cosmética durante 28 días, tomando en cuenta los parámetros de pH, actividad de agua (A_w) y resistencia mecánica. Por último, se realizó un análisis sensorial analizando por medio de una escala hedónica el grado satisfacción de los panelistas no entrenados. Los resultados obtenidos por medio de esta investigación mostraron eficacia antimicrobiana del extracto acuoso en concentraciones (g/100g) de *Kalanchoe pinnata* (1.5, 2.0, 2.5, 3.0) contra *Staphylococcus aureus* (0 UFC/g al día 28), *Escherichia coli* (0 UFC/g al día 28), *Aspergillus niger* (0 UFC /g al día 28), *Candida albicans* (0 UFC/g al día 28) y en la *Pseudomona aeruginosa* no hubo efecto inhibitorio presentando un conteo de 2.7×10^5 UFC/g al día 28. En cuanto a la estabilidad fisicoquímica se demostró que todos los tratamientos cumplían con el pH establecido por la NTE INEN 2867 entre 4,5 a 7. En cambio, para la actividad de agua solo los tratamientos con 2.5% y 3% de extracto cumplieron con el límite permitido ($\leq 0,75$) por la misma norma; la resistencia mecánica fue favorable para todos los tratamientos sin mostrar diferencia significativa. Finalmente, los resultados del análisis sensorial evidenciaron que el extracto no genera cambios en la emulsión cosmética en cuanto a olor, pero sí en color y textura.

ABSTRACT

During recent years, trend in cosmetics has moved to "green" movement, that is to say, friendly to the environment. The need appears to satisfy an alternative market, besides regulations and laws that play an important role in these changes. This work had the objective to analyze the effectiveness of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* as a preservative in a cosmetic emulsion through the Challenge test methodology used as a reference of ISO 11930. In addition, it was analyzed accelerated physical chemical stability of the cosmetic emulsion during 28 days, taking into account the parameters of pH, water activity (A_w) and mechanical resistance. Finally, a sensory analysis was performed by using a hedonic scale the degree satisfaction of the non-trained panelists. The results obtained in this study showed the antimicrobial potential of the aqueous extract in concentrations (1.5, 2.0, 2.5, 3.0) of *Kalanchoe pinnata* against *Staphylococcus aureus* (0 CFU/g on day 28), *Escherichia coli* (0 CFU /g on day 28), *Aspergillus niger* (0 CFU /g on day 28), *Candida albicans* (0 CFU /g on day 28) and in *Pseudomonas aeruginosa* there was no inhibitory effect by presenting a count of 2.7×10^5 CFU/g on day 28. For the physiochemical stability it was demonstrated that all treatments carry out the pH established by NTE INEN 2867 between 4,5 and 7. While in water activity only the treatments with 2.5% and 3% perform the limit allowed ($\leq 0,75$) by the same regulation; the mechanical strength was favorable for all treatments. Finally, the results of the sensory analysis showed that the extract does not generate changes in the cosmetic emulsion in terms of odour, but if in color and texture.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	4
1.1 Objetivo General	4
1.1.1 Objetivos Específicos	4
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Caracterización botánica de <i>Kalanchoe pinnata</i>	4
2.1.1 Descripción fitoquímica.....	6
2.1.2 Actividad biológica y usos.....	7
2.2 Producto cosmético.....	8
2.2.1 Clasificación de los cosméticos	9
2.2.2 Emulsión.....	10
2.2.3 Emulsión aceite – agua (O/W)	11
2.3 Estudios, factores y pruebas de estabilidad	11
2.3.1 Estabilidad en los cosméticos	12
2.4 Conservantes cosméticos	15
2.4.1 Conservantes químicos y naturales utilizados en los cosméticos	15
2.5 Challenge test	18
2.5.1 Características de los microorganismos evaluados en el Challenge test.	19
2.6 Análisis sensorial	22
3 Metodología.....	24
3.1 Materiales y métodos	24
3.1.1 Recolección del material vegetal.....	24
3.1.2 Obtención del extracto acuoso	24
3.1.3 Elaboración de la emulsión de O/W	25
3.1.4 Elaboración de medios de cultivo	26
3.1.5 Metodología Challenge Test	27
3.1.6 Método experimental Challenge Test	30
3.1.7 Pruebas fisicoquímicas	32
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35

4.1	Obtención del extracto acuoso obtenido a partir de <i>Kalanchoe pinnata</i>	35
4.2	Análisis del efecto del extracto acuoso obtenido de <i>Kalanchoe pinnata</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.2.1	Resultados del Challenge test en <i>Aspergillus niger</i>	37
4.2.2	Resultados del Challenge test en <i>Candida albicans</i>	39
4.2.3	Resultados del Challenge test en <i>Escherichia coli</i>	41
4.2.4	Resultados del Challenge test en <i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.2.5	Resultados del Challenge test en <i>Pseudomona aeruginosa</i>	45
4.3	Evaluación de los parámetros fisicoquímicos en la emulsión O/W	46
4.3.1	Evaluación del pH.....	49
4.3.2	Evaluación del a_w	51
4.3.3	Evaluación de resistencia mecánica por centrifugación	53
4.4	Resultados del análisis de satisfacción	54
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
5.1	Conclusiones	58
5.2	Recomendaciones	59
	REFERENCIAS	60
	ANEXOS	74

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la tendencia en cosmética se ha encaminado en productos naturales, orgánicos e inclusive amigables con el ambiente (González & Bravo, 2017). Por esta razón, la industria cosmética responde a esta tendencia de consumo por medio de investigaciones y desarrollo de nuevas materias primas debido a la seguridad del consumidor e impactos ambientales que se han generado (Bom, Jorge, Ribeiro, & Marto, 2019). Los estudios se enfocan más en compuestos naturales como aceites esenciales, conservantes y antioxidantes debido al déficit de opciones para su aplicación como parte de la vida útil del producto (Vega Picón, 2015). Además, numeras investigaciones sobre el rendimiento y uso de ingredientes para cosmética están incrementando por la falta de definición (Hernández & Pardo, 2015).

La diversidad que existe en la naturaleza es extraordinaria, sobre todo en las plantas medicinales por sus funciones biológicas. Durante la historia, la medicina tradicional se conoce por su metodología en la prevención, mantenimiento y curación de enfermedades y tratamientos (Rodrigues, Félix-Silva, & Xavier-Santos, 2019). De tal forma que la Organización Mundial de la Salud (2015), reconoce a la medicina tradicional como ámbito de la salud (atención sanitaria). En la última década, plantas aromáticas y medicinales han sido fuente de investigación para obtención de extractos naturales con principio antibacterianos para manejo industrial (Vieira, Bessa, Martins, & Arantes, 2017).

Los conservantes tienen un amplio uso con respecto a su capacidad de conservación contra bacterias, levaduras y hongos, siempre y cuando exista un equilibrio con las propiedades químicas del producto en contacto (International Cooperation on Cosmetics Regulation, 2014). Dentro de los conservantes más utilizados se encuentran los parabenos, estas son sustancias químicas sintéticas que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas utilizadas por su bajo costo, alta efectividad e inocuidad (Pastor-Nieto, y otros, 2017).

Como se mencionó, las tendencias actuales de los consumidores a nivel global se han enfocado en lo natural, de igual manera ha sucedido a nivel local, sin embargo, en el Ecuador no se ha definido de manera oficial una clasificación para los cosméticos naturales (Vivanco Carrillo, 2016). Por lo tanto, actualmente las industrias se encuentran investigando alternativas nuevas en cuanto a conservantes de origen natural, entre ellos extractos de plantas y aceites esenciales, los cuales son considerados como conservantes multifacéticos, ya que, a diferencia de los conservantes de origen sintético estos presentan múltiples beneficios en la piel (Jeffries, 2005).

Debido a esto, los grandes proveedores de materias primas se encuentran en necesidad de responder a estas tendencias. Los conservantes son parte fundamental de las formulaciones cosméticas, debido a que, determinan la calidad y vida útil de un producto y por lo tanto son los más controversiales, importantes y escasos (Vega Picon, 2015).

En el Ecuador desde el 27 de Febrero del 2017 quedó prohibido el uso de parabenos de cadena larga en la formulación de productos cosméticos, esto debido a que, en dicha fecha se publicó la resolución 1905 por la Comunidad Andina de Naciones (Comunidad Andina de Naciones, 2017). Por otra parte, el Código orgánico de la salud en el artículo 361, determina la prohibición al uso de bienes y productos cosméticos derivados del petróleo (Ministerio de Salud, 2016). Es importante tomar en cuenta que como en el Ecuador, existen muchos países que han prohibido el uso de parabenos, sin embargo, los parabenos muestran menor incidencia de alergias al compararlos con otros conservantes sintéticos (Sagara, Nakada, y Iijima, 2008). En contraparte, otros estudios han demostrado que la incidencia de secuelas en la piel es causada por aquellos medicamentos de uso tópico que poseen parabenos en su formulación, pero no

sucede lo mismo con aquellos cosméticos que poseen parabenos (Yim, Nole, y Tosti, 2014).

En el Ecuador las exportaciones de cosméticos en el año 2018 representaron 11.433.605,01 millones de dólares, las cuales son superadas por las importaciones que representaron 274.198.666,62 millones de dólares (Pro Cosméticos, 2018). Estas estadísticas demuestran la importancia en la investigación y desarrollo de cosméticos y conservantes naturales, los cuales sustituyan en gran parte a los parabenos y otros conservantes sintéticos.

La presente investigación busca evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* en una emulsión cosmética, además determinar si este extracto proporciona características que puedan quitarle estabilidad a la emulsión, así como características organolépticas que no satisfagan los requerimientos del consumidor.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Analizar la eficacia del extracto de *Kalanchoe pinnata* como conservante en una emulsión cosmética.

1.1.1 Objetivos Específicos

Determinar la concentración óptima del extracto de *Kalanchoe pinnata* como conservante de una emulsión cosmética.

Identificar la estabilidad de parámetros físico químicos de una emulsión cosmética.

Evaluar la aceptabilidad de la emulsión cosmética con extracto de *Kalanchoe pinnata* mediante un análisis sensorial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Caracterización botánica de *Kalanchoe pinnata*

El género *Kalanchoe* se la ubica dentro de las plantas perennes suculentas y es una de las especies más reconocidas entre las plantas medicinales de la familia de las Crasuláceas. Su crecimiento se da naturalmente en zonas templadas alrededor de todo el mundo (Asiedu-Gyekye, Antwi, Bugyei, & Awortwe, 2012). Geográficamente, se encuentra ampliamente distribuida en Asia, Australia, Polinesia, África meridional, Arabia y América tropical, pero su origen se lo atribuye en Madagascar (Obregón-Díaz, Pérez-Colmenares, & Obregón-Alarcón¹, SAGE Journals, 2018).

Kalanchoe pinnata es un arbusto suculento, perenne que puede llegar a crecer hasta 1,5 m de altura, su forma de reproducción es mediante las semillas, sus hojas, bulbos y tallos. Su tallo es hueco y puede tener una coloración amarillenta con el paso del tiempo (Quazi Majaz, Tatiya AU, & Khurshid M, 2011). Las hojas son de color verde oscuro carnosas, las cuales se reconocen por su festoneado

y su borde ligeramente rojizo, pueden medir entre 8-12cm. Muchas veces las hojas producen yemas en sus extremidades que al caer se convierten en nuevas plantas. Se la clasificaba como una planta ornamental introducida, pero actualmente crece como maleza alrededor de cultivos del lugar y zonas templadas (Okwu & Nnamdi, 2011).

Esta especie se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de muchas enfermedades como: úlceras, dolor de oído, picadura de insectos, infecciones del tracto respiratorio superior, tos y como antiinfecciosos en algunos países de Asia, África y América (Biswas, Chowdhury, Das, & Hosen, 2011). Las preparaciones derivadas de esta especie se basan principalmente en la administración interna o externa de los extractos crudos o un jugo propio de la planta (Kolodziejczyk-Czepas & Stochmal, 2017). Los usos de la planta a nivel mundial pueden clasificarse según las características de la tabla 1.

Tabla 1.

Usos a nivel mundial de Kalanchoe pinnata

Brasil	Para abscesos, artritis, pie de atleta, furúnculos, bronquitis, conjuntivitis, tos, eczema, fiebre, glaucoma, dolor de cabeza, infecciones, inflamaciones, picadura de insectos, cálculos renales, úlceras en la boca, reumatismo, problemas de piel y como sedante.
Ecuador	Para moretones, huesos rotos.
Guatemala	Para dolores, diarrea, problemas de piel.
India	Por dolor abdominal, furúnculos, contusiones, cortes, diabetes, cólera, diarrea, disentería, flatulencia, dolores de cabeza, cálculos renales, indigestión, picaduras de insectos, ácaros, llagas, heridas, insuficiencia urinaria.
México	Para infecciones en los ojos, dolores de cabeza, inflamaciones, desordenes menstruales, acné, heridas.

Nicaragua	Para dolores, quemaduras, resfríos, fiebre, dolores de cabeza, infecciones en vías respiratorias.
Nigeria	Para la tos, eczema, inflamaciones, acné.
Perú	Para infecciones bacteriales, bronquitis, conjuntivitis, epilepsia, fiebre, dolores de cabeza, náusea, problemas de piel, úlceras.
USA	Para varicela, fiebre, dolor de estómago.

Obtenido de Quazi Majaz, 2011

2.1.1 Descripción fitoquímica

Los estudios fitoquímicos referentes al género *Kalanchoe* indicaron presencia de flavonoides, triterpenos, ácidos grasos, fenoles, alcaloides, esteroides, saponinas y otros componentes (Kuo, Hung, & Liao, 2017). Se le atribuye numerosas propiedades farmacológicas como antimicrobiano, antiviral, antioxidante, antihistamínico, insecticida, entre otras (Rajsekhar, Arvind Bharani, & Ramac, 2016). Entre los estudios se puede mencionar la actividad antihistamínica para mejorar la calidad de sueño en mujeres embarazadas (Schleier, Nakamura, & Perlatto, 2016). Por otra parte, los compuestos fenólicos, bufadienólidos, y triterpenos son los que le otorgan su actividad antimicrobiana. Estos metabolitos se encuentran en las hojas, flores, frutos de las plantas (Thibane, Ndhlala, & Finnie, 2018). A continuación, se describe los compuestos presentes en la planta.

- Los fenoles, fenilpropanoides y flavonoides son compuestos que se encuentran en las partes aéreas de la planta. Se puede encontrar ácido siríngico, ácido caféico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxi-3metoxi cinámico, ácido p-cumárico, astragalina, quercetina, 3,8-dimetoxi-4,5,7 trihidroxyflavona, friedelina.
- Los flavonoides pueden ser un marcador químico de la planta de alto potencial terapéutico (Pattewar, 2012). Además la planta contiene triterpenos como amirinas, amirinacetato, taraxerol, fridelin, glutinol, el contenido de esteroides y cardenólidos incluye una citotoxicidad potencial (Pattewar, 2012).

- Quazi Majaz, et al (2011), menciona que dentro de la planta actúan proteínas de forma enzimática como la anhidrasa, oxidasa, quinada, ADN topoisomerasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.
- Los ácidos grasos presentes en la planta se dividen en 89% ácido palmítico, 10% para ácido esteárico, y trazas de ácido araquidónico. Además, contiene ácido cítrico, oxalacetato, ácido málico y succínico.
- Se considera que es alta en aminoácidos, riboflavina, tiamina, niacina, ácido ascórbico, entre otros. Mientras que en minerales es una buena fuente en sodio, calcio, fósforo, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre y zinc. En los azúcares se encuentra rafinosa, lactosa, glucosa, galactosa, fructosa. Otros compuestos de la planta son alcaloides y los taninos (Pattewar, 2012).

2.1.2 Actividad biológica y usos

Varios estudios han reportado actividades antimicrobianas, antiulcerosas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antivirales entre otras. Se ha reportado el potencial de esta planta para inhibir la inflamación alérgica por eventos relacionados con enfermedades de las vías respiratorias (Fürer, Simões-Wüst, & Hamburger, 2016).

Para la actividad antimicrobiana, los estudios demuestran que los compuestos como fenoles, taninos, saponinas, glucósidos son responsables en una medida de las propiedades antibacterianas existentes en la planta (Cabrera Rodríguez, Sánchez, & Guerra, 2011). Un estudio menciona que el extracto metanólico de las hojas obtenidas de *Kalanchoe pinnata*, inhibe el crecimiento de microorganismos pero se identificó resistencia en *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Mientras que en otros estudios demuestran que si hay inhibición en *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Quazi Majaz, et al, 2011).

Por otro lado, la actividad anticancerígena es mencionada por Supratman, Fujita y Akiyama (2000), en los estudios aislaron bufadienólidos y examinaron los efectos inhibitorios dando una fuerte sugerencia de que estos compuestos son un potencial para uso de agentes quimiopreventivos de cáncer. Por otra parte, la actividad antidiabética y enfermedades del corazón han sido estudiadas con el manejo de hierbas del género *Kalanchoe* (Pattewar, 2012).

2.2 Producto cosmético

El Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo lo define como: “Toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos mantenerlos en buen estado o corregir olores corporales”. Dentro del Reglamento se menciona productos que no son considerados cosméticos: “aquellos productos destinados para prevención, diagnóstico, tratamiento de enfermedades. Tampoco aquellos que son para acción contra microorganismos, hongos o parásitos”. Se conoce que las propiedades mencionadas para prevención, diagnóstico, etc. Son atribuidas a los medicamentos.

Se define como cosmético natural aquel que no contiene sustancias químicas en su composición su porcentaje no es mayor al 10%.

Tabla 2.

Diferencia entre cosmético y medicamento

Cosmético	Medicamento
Vía tópica, su aplicación es externa	Uso por ingesta, inhalación, inyección, vía tópica.
Función: limpiar, perfumar, decorar, proteger, mejorar	Función: prevenir, diagnosticar, curar

2.2.1 Clasificación de los cosméticos

Los productos cosméticos son parte de la vida cotidiana de los seres humanos, estos se clasifican según la legislación del país o zonas del cuerpo. La normativa ecuatoriana NTE INEN 2867 (2015), clasifica a los productos cosméticos según su campo de aplicación. A continuación, se muestra la clasificación más general:

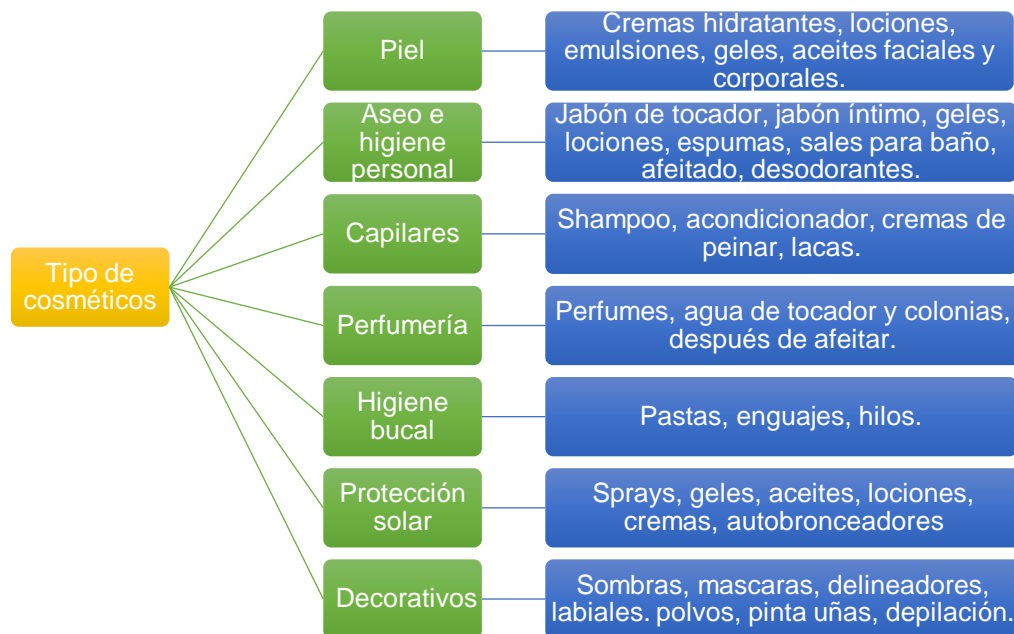


Figura 1. Clasificación de cosméticos según su uso

Obtenido de Cosmetic Europe, 2010

En los cosméticos, así como en cualquier producto, existen los principios activos que son los responsables de realizar la función principal del producto a utilizar, sin esto los cosméticos no realizarían la función deseada (Badía Vila & García Miranda, 2012). Las funciones dentro de los cosméticos pueden ser:

Tabla 3.

Funciones de los cosméticos

Higiene	Ayuda el estado de la piel, y su principio activo son los detergentes.
---------	--

Protección	Protege a la piel de agentes externos como químicos, mecánicos, ambientales. Por lo cual su principio activo es el PABA (ácido paraminobenzoico).
Correctora	Permite corregir o tratar imperfecciones de la piel que no sea patológicas. Para esto el principio activo dependerá del tratamiento a realizar.
Decorativa	Se conoce aquella que sirve para embellecer o enmascarar imperfecciones, por ello su principio activo son los pigmentos.
Perfumadora	Añade olores por lo cual su principio activo será esencias o aceites.

Obtenido de Badía Vila y García Miranda, 2012

2.2.2 Emulsión

Se considera una emulsión a un sistema constituido por dos o más fluidos no miscibles homogenizados. En donde una de las fases se encuentra distribuida dentro de la otra, esto se le conoce como una fase dispersa y forma continua (Muñoz, Alfaro, & Zapata, 2007). La fase continua, también denominada fase externa se conoce como aquella que contiene a la fase dispersa, debido a que es el líquido circundante de la fase dispersa. La fase dispersa o interna son gotas o globulos inmiscibles en la fase continua, la cual el tamaño de la partícula puede ser entre 0,5 a 100 μm (Arranberri, Binks, Clint, & Fletcher, 2006).

La clasificación de emulsiones suele basarse según la polaridad de la fase continua contra la fase dispersa. En la mayoría de emulsiones, el agua y una grasa o aceite son los fluidos a utilizar, por lo cual las gotas de agua en aceite se conoce como emulsiones (W/O) y gotas de aceite en agua (O/W) respectivamente (Reyes & Di Scipio, 2012). Existen muchas aplicaciones de emulsiones en alimentos, nutracéutica, cosmética, cuidado personal, detergentes, industrias médicas y farmacéuticas. Las emulsiones comúnmente

son estabilizados por agentes tensioactivos sintéticos o animal basada emulsionantes (Zhu, 2018).

2.2.3 Emulsión aceite – agua (O/W)

Este tipo de dispersiones coloidales se compone de pequeñas gotitas de aceite dispersas en una fase continua acuosa que usualmente es agua (McClements, 2016). Las emulsiones O/W dan no tienen textura pegajosa, son ligeras a la piel, e hidratantes. Pueden utilizarse tanto para enjuagar y dejar en piel (Iwata & Shimada, 2013).

2.3 Estudios, factores y pruebas de estabilidad

La Organización de Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (2018), define a la estabilidad como la cualidad de un producto cosmético para mantener sus propiedades de calidad dentro del rango establecido por el fabricante, por un período de tiempo (llamado vida útil), en un material de envase definido.

Los estudios de estabilidad se realizan para evidenciar posibles cambios en aspectos físicos, químicos, microbiológicos y organolépticos que se puedan dar durante un período de tiempo. El objetivo es comprobar la funcionalidad del producto en las condiciones apropiadas durante su almacenamiento y uso (ANVISA, 2005).

ONUUDI 2018, menciona que los cambios que ocurren dentro de un producto, son los que ayudan a definir parámetros generales como: la orientación de la formulación final del producto, las especificaciones del material de envasado y empaque, el tiempo de vida útil, las condiciones de almacenamiento y transporte.

Los procedimientos que se realizan como prueba, están diseñados para proporcionar la información deseada en menor tiempo posible. Para lograr esto, las muestras se mantienen bajo condiciones destinadas a acelerar los cambios

que se producen en condiciones normales (International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, 1992).

2.3.1 Estabilidad en los cosméticos

La mayor parte de conservantes cosméticos son considerados como efectivos, tanto en amplios rangos de pH como en altas temperaturas, sin embargo, la definición de efectividad en los conservantes se establece bajo las condiciones de formulación ideales (Toler, 1984). De tal manera, el conservante ideal debe ser compatible con todos los ingredientes de la formulación. Además debe ser activo a bajas concentraciones, contra la mayor parte de microorganismos sin causar irritaciones o sensibilidad en la piel, sin embargo este último factor es uno de los más complicados de controlar en la industria cosmética ya que gran parte de estos conservantes causan sensibilización alérgica, causando principalmente dermatitis alérgica (Sasseville, 2004).

Es importante mencionar, que la capacidad de un cosmético para resistir a la contaminación microbiológica depende de varios factores además de la adición de conservantes, como la actividad de agua, el mecanismo de distribución y el efecto de algunos agentes quelantes, los cuales aumentan el efecto de ciertos conservantes. Se debe tomar en cuenta que muchos cosméticos se formulan con ingredientes que pueden tener efectos antimicrobianos como las fragancias (Dyrgaard Lundov, Moesby, Zachariae, & Duus Johansen, 2009).

2.3.1.1 Factores fisicoquímicos en los cosméticos

Todos los componentes, sean activos o no, de un producto afectan a la estabilidad, por ello los factores pueden dividirse en factores extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos: se refiere a factores externos que el producto se ve expuesto como tiempo. Temperatura, luz, oxígeno, humedad, material de envasado y microbiología (INVIMA, 2018).

Los factores intrínsecos según ANVISA, 2005 son propios del producto debido a la interacción entre sus componentes y el material de acondicionamiento, aquí se identifica a:

Parámetros físicos: se denomina incompatibilidad física aquella propiedad donde sus compuestos son afines entre sí para la formulación. Cuando no existe una relación o hay alteraciones se puede observar precipitación, separación de fases, cristalización entre otros.

Parámetros químicos: se conoce como incompatibilidad química a la interacción de los componentes generando reacciones indeseables alterando o anulando su función. Aquí se puede medir factores como pH, reacciones oxidación-reducción, hidrólisis.

Dentro de los factores físico químicos de importancia al evaluar la estabilidad de un cosmético encontramos la actividad de agua que se define como la cantidad de agua que se encuentra biológicamente disponible en la formulación de los cosméticos y puede ser determinada al comparar la presión de vapor de agua que contiene la fórmula en relación con la presión de vapor del agua pura (Varvaresou et al., 2009).

El pH es la concentración de H^+ de una solución; en cuanto a la estabilidad de los cosméticos la concentración de iones de hidrógeno determina la viabilidad de los microorganismos, siendo lo más común que la tasa de crecimiento de los microorganismos disminuya mientras el pH sea más ácido, sin embargo, existen mohos y levaduras que son resistentes a los medios ácidos (Varvaresou et al., 2009).

La fuerza de gravedad se define por métodos como la centrifugación, que es un método de separación de sistemas homogéneos, los cuales poseen al menos una de sus fases en estado líquido al aplicar la fuerza centrífuga (Huerta Ochoa,

2000). La centrifugación se considera una prueba de estabilidad en cosméticos, siendo lo recomendable someter a la muestra por 30 minutos a una velocidad de 3000 rpm, el resultado deseado será la estabilidad, caso contrario, la formulación cosmética necesitará reformulación.

El proceso de centrifugación simula el incremento de la fuerza de la gravedad, por lo que la muestra estará bajo estrés físico, lo cual, provoca el aumento del movimiento de las partículas apresurando una inestabilidad posible de la muestra. La pérdida de la estabilidad se puede observar tanto en la separación de fases como en precipitaciones, aparición de escamas, entre otros (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2005). Existen otros factores físico químicos como lo es la viscosidad, conductividad eléctrica, humedad, granulometría, materiales volátiles, entre otros.

La estabilidad preliminar, también llamada prueba de selección o corto plazo, tiene como finalidad la orientación a las formulaciones que cumplan con los requisitos deseados. Esta prueba se realiza en la fase de desarrollo, ya que utiliza distintas formulaciones para adaptar en condiciones extremas de temperatura (Ministerio de Salud y Protección , 2018). De esta forma se aceleran los procesos y se puede evidenciar si existe alguna problemática en la formulación. En esta prueba no se verifica la vida útil, sino que colabora en la elección de una formulación que cumple ciertos parámetros a elegir. Su duración normalmente es de 15 días en condiciones de calentamiento y enfriamiento (Gallegos, 2015).

La estabilidad acelerada, es conocida como estabilidad exploratoria que utiliza condiciones exageradas de mantenimiento para aumentar reacciones de degradación química, física y biológica para verificar la estabilidad del producto y valorar la vida útil (Secretaria de Salud Mexicana, 2015). Usualmente se realiza la prueba durante noventa días, pero en algunos estudios lo realizan durante seis

meses hasta un año dependiendo del producto. Las evaluaciones durante la prueba se realizan en los tiempos cero, 24 horas, 7, 15, 30, 60, y 90 días (Gallegos, 2015).

2.4 Conservantes cosméticos

En la actualidad los conservantes más utilizados en la industria cosmética corresponden a los parabenos, esto se debe a que es menos irritante y no sensibiliza la piel al compararlos con otros conservantes como los liberadores de formaldehído y las isotiazolinonas (Lee, An, Choi, Moon, & Chang, 2007).

2.4.1 Conservantes químicos y naturales utilizados en los cosméticos

Los conservantes son utilizados en los cosméticos con el fin de proporcionarles una estabilidad biológica a los mismos, ya que, la contaminación microbiológica causa el deterioro de los cosméticos además de la posible infección al consumidor provocada por los mismos. Sin embargo, los conservantes aplicados deben ser previamente evaluados, con el fin de adicionar al producto la menor concentración posible, manteniendo el efecto antimicrobiano, para evitar la dermatitis alérgica de contacto (Lundov, Johansen, Zachariae, & Moesbyà, 2010). Para determinar la efectividad de un conservante, este debe presentar características de estabilidad, compatibilidad con los ingredientes de la formulación, amplia actividad antimicrobiana y Activo ante un amplio rango de pH (Denis, 2004).

En la actualidad los conservantes más utilizados en la industria cosmética corresponden a los parabenos, esto se debe a que es menos irritante y no sensibiliza la piel al compararlos con otros conservantes como los liberadores de formaldehído y las isotiazolinonas (Lee, An, Choi, Moon, & Chang, 2007).

Tabla 4.

Conservantes químicos más utilizados

Tipo de conservante	Nomenclatura química	Nombre comercial
Ésteres de parabenos	-Metil-4-hidroxibenzoato -Etil-4-hidroxibenzoato - Propil-4-hidroxibenzoato Butil-4-hidroxibenzoato	-Metil parabeno -Etil parabeno -Propil parabeno Butil parabeno
Formaldehído y liberadores de formaldehído	-Formaldehyde 1-(3-chloroalil)-3,5,7-triazo-1 azoniaadamantano cloruro imidazolidinil urea diazolidinyl urea 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol -Dimetiloldimetil hidatoína (DMDM hidatoína, Glydant) -Hexahidro-1,3,5-tris-(2-hydroxiethyl) triazine (Grotan BK)	-Metanal -Quaternium-15 -Germall 115 -Germall II -Bronopol -DMDM hidatoína, Glydant -Grotan BK
Isotiazolinonas	-2-metil-5-cloro-4- iothiazolin-3-uno/2-metil-4- isothiazolin-3-uno -2-n-octil-4-isothiazolin-3- uno -1,2-benzisothiazolin-3-uno	-MCI/MI, Kathon CG -Kathon 893 -BIT, Proxel
Metildibromoglutaronitrilo	-1,2-dibromo-2,4- dicianobutano -3-yodo-2-propinil- butilcarbamato	-Glycasil, Troyosan KK-108a -Biodocarb C450

Obtenido de Sasseville, 2004

Existen conservantes naturales, los cuales se han desarrollado, debido a las tendencias del mercado actuales por la seguridad que representan. Sin embargo, los fabricantes consideran al desarrollo de los conservantes naturales como un reto, debido a la vida útil deseada; razón por la que en la actualidad se desarrollan investigaciones sobre el efecto conservante de aceites esenciales, extractos de plantas, frutas y granos (Jeffries, 2005).

Los conservantes de origen vegetal son los más estudiados hasta el momento (Flanagan, 2011). Esto se debe a que, el efecto antimicrobiano produce: la desnaturalización de las proteínas de la membrana de los microorganismos, evitando la activación de las enzimas que están involucradas en la síntesis de aquellos componentes estructurales de las bacterias; desestabiliza la fuerza propulsora de los protones, el intercambio de electrones, el transporte activo, el proceso de coagulación del contenido celular, la barrera permeable es descompuesta, en células bacterianas se inhibe la síntesis de ADN, ARN, proteínas y polisacáridos, las vías del metabolismo se ven afectadas, principalmente la división celular (Herman, 2018).

En contraparte, aún se habla sobre los problemas que pueden presentar los distintos tipos de conservantes naturales, debido a la elevada carga microbiana que estos pueden presentar. De manera comercial, los conservantes naturales se encuentran como polvos, extractos acuosos o alcohólicos, siendo los más estables microbiológicamente los polvos (Hill, 1995), sin embargo, no están exentos de la probabilidad de presentar esporas bacterianas, virus, priones, toxinas microbianas, bacterias, esporas de clostridios, mohos, estafilococos , entre otros (Scholtyssek, 2001); en cuanto a los extractos alcohólicos es importante asegurar la dosis del solvente para que sea suficiente ante la actividad microbiana.

Por último los extractos acuosos son los más propensos a la biodegradación, por lo que, su proceso de extracción debe asegurar la descontaminación de los mismos, además se deberá definir un método adecuado de conservación (Hill, 1995). En caso de que su método de conservación sea insuficiente, pueden desarrollarse microorganismos gramnegativos como lo es *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, al ser utilizados en la fabricación de soluciones, dispersiones o emulsiones (Scholtyssek, 2001).

Como ya se ha mencionado anteriormente, dentro del estudio de nuevos conservantes naturales es importante determinar un proceso de extracción adecuado, pero además las prácticas como las “Buenas Prácticas de Manufactura”, proporcionan al proceso mayor seguridad y control (Dao et al., 2017). Los conservantes, independientemente de su origen, son considerados materias primas en la fabricación de cosméticos, por lo que necesitan especial cuidado y protección ante la contaminación microbiológica, durante el transporte, almacenamiento, uso y producción, ya que, si una materia prima contaminada ingresa al proceso de producción, esta podría cargar e incluso sobrecargar la capacidad conservante del producto y por lo tanto volver ineficaz al conservante que este posea (Scholtyssek, 2001).

2.5 Challenge test

El Challenge Test es un análisis de eficacia de preservantes, el cual es utilizado como método de referencia en la norma ISO 11930 “Cosméticos – Microbiología”. Esta metodología permite determinar si en la concentración evaluada del conservante se desarrollan microorganismos, los cuales puedan generar daños en la seguridad del producto (García, García, y Cesisergue, 2013).

La metodología del Challenge test se basa en inocular microorganismos específicos (*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*,

Burkholderia y Escherichia coli) a una concentración (UFC/ml) conocida en el producto a ser evaluado (AINIA, 2016). Los microorganismos que se deben utilizar en esta metodología deben provenir de cepas liofilizadas certificadas, las cepas ATCC (American Type Culture Collection) son las más comunes (Cuesta, 2014), estas cepas deben ser activadas antes de su inoculación al producto a evaluar.

2.5.1 Características de los microorganismos evaluados en el Challenge test.

2.5.1.1 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo ascomycete filamentosos que se encuentra en el medio ambiente y ha sido implicado en las infecciones oportunistas de los seres humanos. Además de su papel como un patógeno humano oportunista, *A. niger* es económicamente importante como un organismo de fermentación utilizado para la producción de sustancias como aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y otros metabolitos secundarios. Su principal uso es en la producción de ácido cítrico (Baker, 2006). Este organismo saprófito de suelo con una gran variedad de enzimas hidrolíticas y oxidativas involucrados en la descomposición de la planta en la lignocelulosa (Bogucka-Kocka, Zidorn, & Kasprzycka, 2016).

El género *Aspergillus* se clasifica como un hongo aerobio de crecimiento rápido, primero su colonia tiene una coloración blanca la cual mientras crece tiene un aspecto algodonoso y aterciopelado. Mientras envejece la colonia se producen las esporas, las cuales darán lugar a coloraciones de acuerdo a la especie, en el caso de *A.niger* su coloración es negra (Carrillo, 2003).

Su crecimiento se da en el aire, suelo, animales, entre otros, tiene resistencia a temperaturas altas, pero su temperatura óptima va desde 15° C hasta los 60° C. Dentro de los medios de cultivo para el hongo, se encuentra el SDA (Sabouraud dextrose agar), agar Czapek a 25°C y 37°C (Ministerio de Salud Perú, 2010). En

el caso de realizar aislamiento del microorganismo, se utiliza Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-Diclorán que son medios selectivos para apoyar crecimiento de hongos e inhibir propagación bacteriana. El tiempo de incubación de las placas es de 3 a 7 días en una temperatura de 22-25° C (Neogen, 2010).

2.5.1.2 *Candida albicans*

Se identifica como levaduras pertenecientes a la familia de los Sacaromicetos que a la vista macroscópica son colonias levaduriformes con bordes lisos y limitados, su forma puede ser ovalada o circular, tienen una ligera elevación concava blanda y son de color blanco (Castañón, 2017). Las especies de *Candida* suelen residir como comensal en los seres humanos como parte de la microflora normal de la piel, la cavidad bucal, el tracto gastrointestinal y la vagina. Se considera un patógeno oportunista y en el ser humano puede causar varias patologías como candidiasis (Kitahara, Morisaka, & Aoki, 2015).

Su temperatura de crecimiento es 25° C en la naturaleza, pero en un huésped puede ser a 37° C. Como levadura actúa de forma sapófito, cohabitando con su huésped, pero cuando se comporta como hongo filamentoso es un parásito patógeno. Generalmente esta especie crece en medios aerobios, no necesita de medios diferenciales y su crecimiento se da en pH de 2.5 a 7.5 con temperaturas entre 20° - 38° C (INSST, 2012).

2.5.1.3 *Staphylococcus aureus*

La bacteria *Staphylococcus aureus* fue descubierta en el año de 1880, desde entonces, es considerado un patógeno de gran potencial, causal de distintas infecciones, tanto al ser humano como a otros animales (Cervantes García, García Gonzalez, y Salazar Schettino, 2014). *S. aureus* es un estafilococo gram-positivo, el cual, se desarrolla en forma de racimos de uva. Es una bacteria de gran importancia, ya que, existen 17 subespecies del género, teniendo una

capacidad adaptiva importante, de hecho, gracias a esta característica de adaptación, se puede propagar de una especie a otra, como lo es el caso más común de animal a humano y viceversa (Zendejas, Avalos, y Soto, 2014). *S. aureus* forma parte del microbioma de una piel normal, sin embargo, en algunas ocasiones puede desarrollarse como un patógeno (Gannesen et al., 2019). Específicamente aquellas cepas patógenas corresponden a las que producen coagulasa, las cuales, provocan infecciones en la piel (Pinon, Alexandre, Cupferman, Crozier, y Vialette, 2007).

2.5.1.4 *Pseudomona aeruginosa*

La *Pseudomona aeruginosa* fue descubierta por primera vez a finales del siglo XIX y fue aislada por primera vez en el año 1882 (Paz-Zarza et al., 2019). La *P. aeruginosa* es uno de los principales patógenos de su familia “*Pseudomonadaceae*”, de manera más específica esta bacteria es un bacilo gramnegativo, el cual, se desarrolla mejor de manera aerobia; la *P. aeruginosa* no es fermentativa, pero si logra acidificar aquella materia que contenga distintos azúcares como la fructosa, glucosa, sacarosa y lactosa (Montero, 2012). Esta bacteria es la que más frecuentemente se encuentra en cosméticos (Neza y Centini, 2016).

2.5.1.5 *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* es una enterobacteria, la cual, se identificó en el ser humano por primera vez en 1982 (Tarr y Neill, 2001). Más específicamente la *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa, la cual, predomina la flora intestinal del ser humano, sin embargo, es importante mencionar que esta bacteria puede llegar a producir infecciones cuando el ser humano se encuentra inmunosuprimido, debilitado o cuando se infringen las barreras gastrointestinales (Kai, Konishi, y Obata, 2010). La *E. coli* es una de las bacterias encontradas en productos cosméticos, así como otras bacterias y hongos, y su contaminación se puede deber a la utilización de materias primas no estériles, contaminación dentro del

proceso de producción o contaminación durante su uso (Dadashi y Dehghanzadeh, 2016).

2.6 Análisis sensorial

El análisis sensorial no es un método nuevo, existen escritos bíblicos desde el año 320 a.C. donde se han encontrado referencias hacia los atributos sensoriales, principalmente el olor (Hernandez, 2005). En general se define al análisis o evaluación sensorial como la interpretación, identificación, análisis, medida científica como respuesta a los sentidos del ser humano percibidos a través de un producto (González, Rodeiro, Sanmartín, & Vila, 2014).

El análisis sensorial o evaluación organoléptica, es una herramienta que permite definir, analizar, evaluar y descifrar características de un producto a través de los sentidos, es decir, por medio de propiedades olfativas, gustativas, visuales, táctiles y auditivas en el caso necesario (Claustrioux, 2001). Cuando se realizan pruebas orientadas hacia la preferencia del consumidor, se obtiene una muestra aleatoria de personas consideradas como posibles usuarios del producto y que no sean panelistas entrenados (Watts, Ylimaki, Jeffery, & Elías, 1992).

Dentro de la industria de los cosméticos, de manera similar a la industria alimenticia, responder a las necesidades de los consumidores se ha convertido en prioridad, por lo que, las características sensoriales pueden lograr una mejor aceptabilidad en el consumidor y por lo tanto mejorar las ventas de los productos cosméticos (Moussour, Lavarde, Pensé-Lhéritier, y Bouton, 2017).

Para un análisis sensorial es necesario contar con evaluadores, existen 4 tipos de evaluadores: los expertos, son aquellos que poseen experiencia en el análisis sensorial de un tipo de producto, por lo tanto, tienen la sensibilidad necesaria para determinar, identificar y analizar las características de un producto. Por otro

lado, se encuentran los evaluadores entrenados, son aquellos que poseen gran habilidad para detectar ciertas propiedades sensoriales, sabores o texturas en particular. Los evaluadores semi entrenados, son aquellos que no miden propiedades o determinan características sensoriales por medio de escalas, sino que pueden determinar diferencias entre muestras (Quinde Tenecela, 2017). Por último, los evaluadores consumidores, se caracterizan por ser personas tomadas al azar, que realizan únicamente pruebas afectivas y no discriminativas o descriptivas (Picallo, 2009).

Dentro del análisis sensorial se encuentran distintos tipos de pruebas según la característica sensorial que se desea evaluar. Entre las más comunes encontramos: las pruebas discriminativas, las cuales tienen como objetivo determinar si la diferencia entre muestras es percibida por el evaluador o no, además las pruebas discriminativas se dividen en dos tipos de pruebas que pueden ser de diferenciación o de sensibilidad (Hernandez, 2005); las pruebas descriptivas dan a conocer las características que posee el producto evaluado; por ultimo las pruebas afectivas permiten conocer el grado de aceptabilidad que presenta un producto, este tipo de pruebas utilizan escalas hedónicas (Liria Domínguez, 2007).

Existen dos tipos de escalas hedónicas: la hedónica verbal, donde el panelista o evaluador informa su grado de complacencia frente a la muestra, por medio de una escala presentada por el evaluador, la cual debe ser impar y deberá presentarse desde el grado de satisfacción más alto, por ejemplo “me gusta muchísimo” hasta el grado de satisfacción más bajo “me disgusta muchísimo” (Hernandez, 2005); la hedónica facial, es similar a la hedónica verbal, pero sustituye a las palabras de la escala por dibujos, sin embargo, este tipo de escala debe ser utilizada al realizar una prueba en niños o personas con dificultad para leer (Domene SMA, Torneros JZ, y Taddei JAAC, 2008).

3 Metodología

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Recolección del material vegetal

La recolección del material vegetal de la especie *Kalanchoe pinnata*, se efectuó en el parque Inglés ubicado en la zona norte de Quito. Las hojas seleccionadas fueron aquellas que no presentaban daños físicos, deshidratación y en un estadio previo a la floración de la planta. Las hojas se caracterizan por su coloración verde oscuro. Además, se recolectó material vegetal completo (desde la raíz), para mantenerlo en el domicilio, debido a que, en verano la planta se deshidrata, dificultando su recolección en el estado deseado.

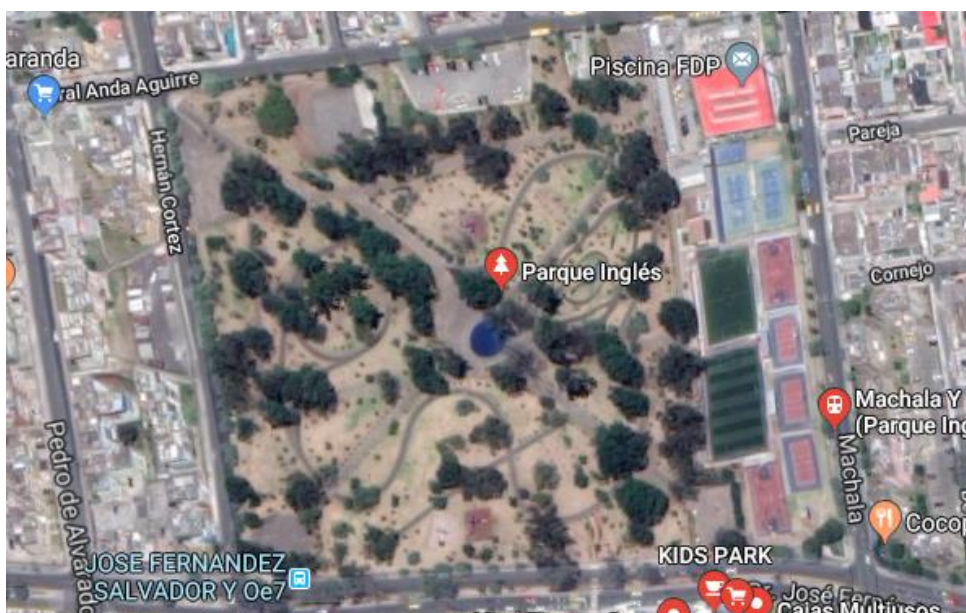


Figura 2. Ubicación de recolección del material vegetal

Tomado de: Google maps, 2019

3.1.2 Obtención del extracto acuoso

Para la obtención del extracto de *Kalanchoe pinnata*, se lavó las hojas con hipoclorito de sodio al 1%. Se escogió las hojas sanas y con coloración verde oscura, preferiblemente sin partes amarillas. Se pesaron las hojas, y se llevaron a trituración mediante el uso de la licuadora. con una relación de 1:0.5 hojas-

agua. La mezcla obtenida se filtró por medio de un embudo con un papel filtro de 20-25 μm . Al líquido obtenido se le añadió hexano en una relación de 1:0.5 lo cual permite la separación de las clorofilas presentes. Esta solución se vuelve a filtrar hasta obtener una coloración amarillenta. Se dejó la solución obtenida en reposo por 48 horas a temperatura ambiente para la evaporación del hexano. Finalmente, el extracto obtenido fue colocado en frascos de vidrio esterilizados, y se guardó en refrigeración.

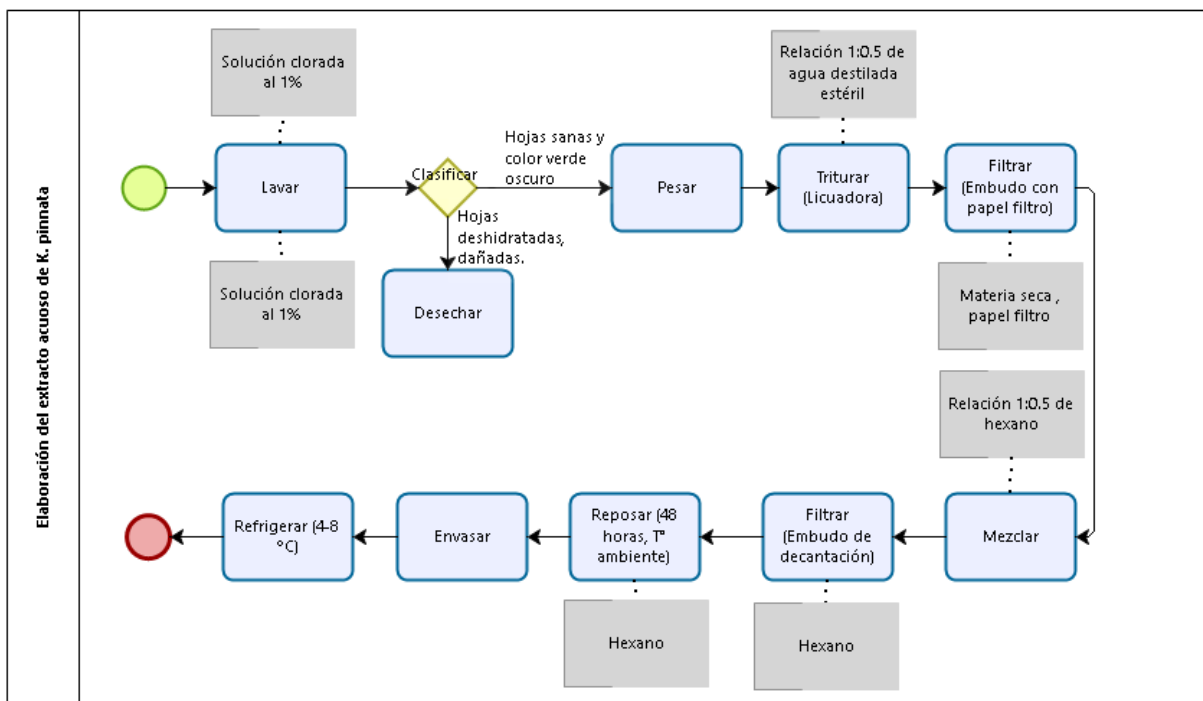


Figura 3. Proceso para la obtención del extracto acuoso

3.1.3 Elaboración de la emulsión de O/W

Para la emulsión primero se pesan todos los insumos: crema base, di etanolamina de coco, alcohol cetílico, ácido esteárico, glicerina y agua. En una plancha de calentamiento se disolvió las materias grasas (ácido esteárico, alcohol cetílico, crema base) en un vaso de precipitación llegó a una temperatura entre 70°C y 90°C. Adicional en otra plancha de calentamiento se disolvió a la glicerina y la di etanolamina de coco en el agua a las mismas temperaturas mencionadas anteriormente. Se realizó una agitación con varilla a las mezclas para incorporar todos los insumos. Cuando ambos vasos presentaron todos los

insumos disueltos de manera homogénea, se incorporó las mezclas manteniendo una temperatura y agitación constante hasta que se formó la emulsión. Finalmente, cuando la emulsión presentó una apariencia homogénea, se dispensó la crema en envases asépticos de 100g en la cámara de flujo.

Tabla 5.

Fórmula de la emulsión

Insumos	Cantidad %
Agua	84
Crema base	10
Ácido esteárico	3
Glicerina	1
Dietanolamina de coco	1.8
Alcohol cetílico	0.3

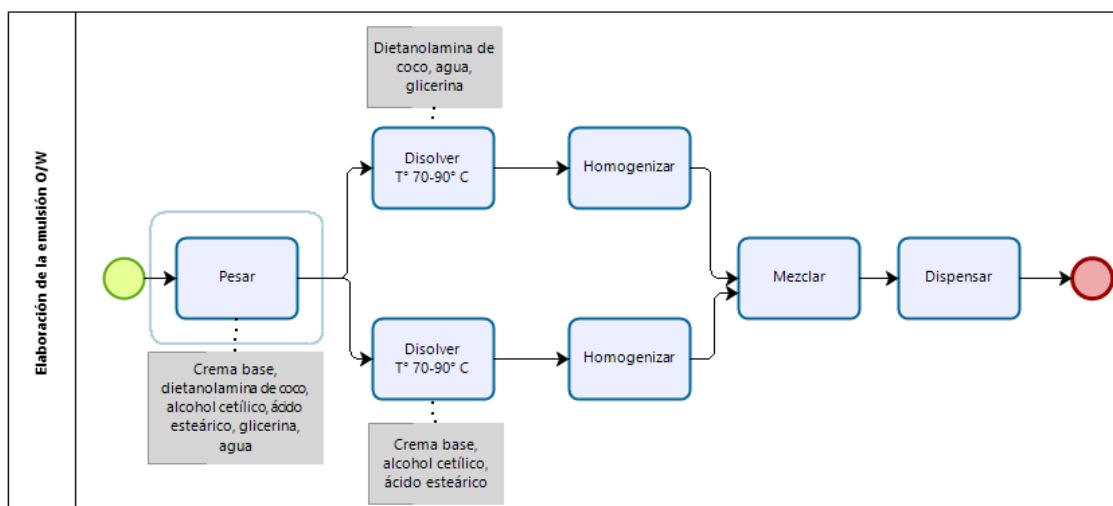


Figura 4. Proceso para la elaboración de emulsión O/W

3.1.4 Elaboración de medios de cultivo

Se realizaron 4 medios de cultivo distintos: EMB para evaluar *E. coli*, Mueller Hinton para evaluar *P. aeruginosa*, Manitol sal para evaluar *S.aureus* y SDA para evaluar *C. albicans* y *A. niger*.

Primero se pesa los medios de cultivo (EMB, Mueller Hinton, Manitol Sal, SDA) directamente en frascos de vidrio para mezclar con agua destilada. Se agita por unos minutos la mezcla hasta que esté completamente homogenizado. Estos frascos ingresan al autoclave durante 30 minutos a 121°C.

3.1.5 Metodología Challenge Test

Dentro de esta metodología se realizan dos procedimientos macros, la estandarización del inóculo por medio de la escala McFarland y la siembra en placas de muestras a realizar.

3.1.5.1 Metodología para la escala de McFarland

Se preparó la escala McFarland con el uso de una solución cloruro de bario a 0.048M y ácido sulfúrico a 0.36M. Se realizó una serie de diluciones como muestra la siguiente tabla:

Tabla 6.

Soluciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico para diluciones

Nº	Cloruro de bario 0.048M ml	Ácido sulfúrico 0.36M ml	Nº de células / bacterias aproximadas
0.5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
1	0,1	9,9	3×10^8
2	0,2	9,8	6×10^8
3	0,3	9,7	9×10^8
4	0,4	9,6	12×10^8
5	0,5	9,5	15×10^8
6	0,6	9,4	18×10^8
7	0,7	9,3	21×10^8
8	0,8	9,2	24×10^8

9	0,9	9,1	27×10^8
10	1	1	30×10^8

Obtenido de Becton Dickinson y Compañía, 2011

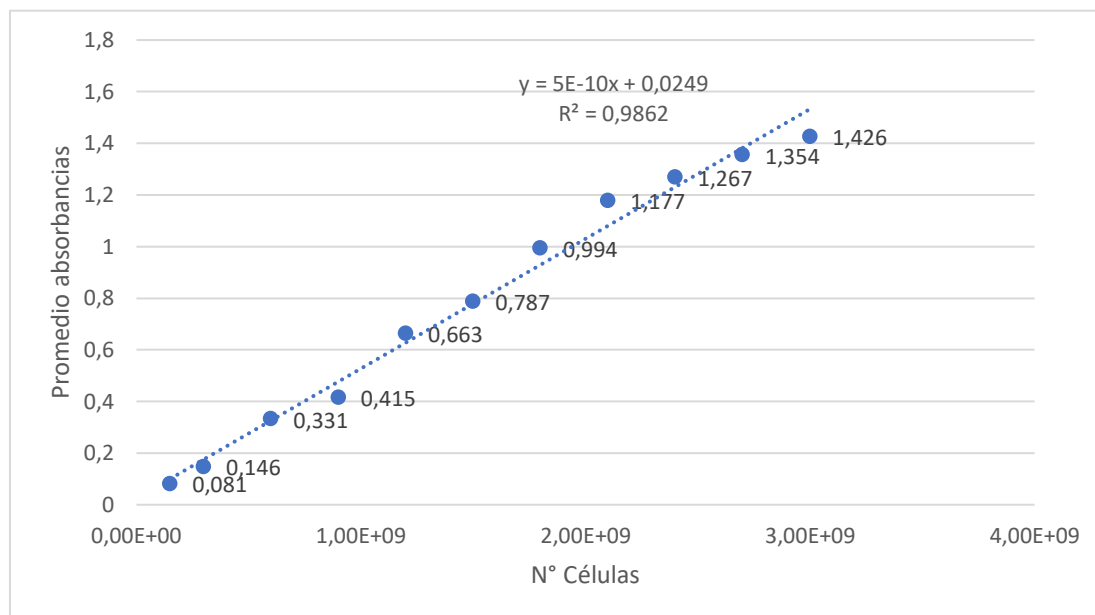


Figura 5. Recta del promedio de las absorbancias

3.1.5.2 Preparación de los microorganismos para el inóculo

Los inóculos estandarizados por el Challenge Test, se preparó con la metodología de espectrofotometría mediante densidad óptica. El National Committee for Clinical Laboratory Standards Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (NCCLS) ha evaluado otros métodos de preparación de inóculo, obteniendo como conclusión que el método por espectrofotometría es aquel procedimiento con una baja variabilidad en sus resultados (Cermeño & Torres, 1998).

Para la activación de las cepas, se realizó la metodología de cultivo "Overnight". Cada perla de microorganismo de CRYOBANK se colocó en distintos tubos de ensayo con 9 ml de caldo peptona cada uno. Se dejó por 24 horas en incubación a los tubos a temperaturas de a 37 °C para bacterias y 25 °C para hongos y

levaduras. Este método es utilizado para conseguir microorganismos en fase de multiplicación o crecimiento, de forma que se garantiza el uso de colonias jóvenes de cada microorganismo para utilizarse posteriormente (Kragh, Alhede, & Rybtke, 2018). Luego para las cepas de *A. niger*, *C. albicans* y *E.coli* se tomó 1ml de caldo para llevar a placa que contiene el medio de cultivo específico para el desarrollo de cada microorganismo. Estas cajas son incubadas a 25 °C para hongos y levaduras y 37 °C para bacterias durante 2 a 5 días.

3.1.5.2.1 Obtención de esporas para inóculo de *A. niger*

Se realizó una siembra del hongo 4 a 6 días antes de realizar el inóculo, de manera que el hongo tenga mayor cantidad de esporas para su obtención. Primero se inició con la colocación de agua peptona entre 3 a 5 ml directo en la caja del hongo, de forma que la parte superficial del hongo quede húmeda. Se realizó un raspado suave con asa microbiológica (sin romper el agar) de forma que las esporas se liberen en el agua. Se realizó el proceso entre uno 1 a 3 minutos. Cuando el agua se encontró turbia, con una micropipeta se recogió el sobrenadante para colocarlo en un vaso de precipitación. El sobrenadante se colocó por un embudo que contenga una gasa para que el micelio no pase y las esporas vayan al vaso. Para asegurar que se utilizó esporas, se tomó una gota del líquido y se observó en microscopio. Verificando que en el líquido se encuentran esporas y no micelio.

Una vez filtrado el sobrenadante, se obtuvo 1 ml para colocar en una celda y medir en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 530nm. Se midió el sobrenadante y se verificó que estaba fuera de la curva estándar de McFarland, por lo cual se realizó una dilución tomando 1 ml del sobrenadante y mezclar con 9 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. Este proceso se repitió 3 veces para ajustar a 10^5 .

3.1.5.2.2 Inóculo de *C. albicans* y *E. coli*

Para el inóculo de *C. albicans* y *E. coli* se repitió el proceso del *A. niger*, pero no se realizó la filtración con gasa. Es decir, se procedió directo a la siembra de la levadura y la bacteria 24 horas antes de realizar el inóculo. Se inició con la colocación de suero fisiológico entre 3 a 5 ml directo en la caja del microorganismo, de forma que la parte superficial quede húmeda. Luego un raspado suave con asa microbiológica (sin romper el agar) de forma que las colonias se liberen en el agua. Esto se lo realizó durante 1 a 2 minutos. Cuando el agua se encuentra turbia, con una micropipeta se recogió el sobrenadante para colocarlo en un vaso de precipitación. Se midió el sobrenadante y se verificó que estaba fuera de la curva estándar de McFarland, por lo cual se realizó 3 diluciones para ajustar a 10^5 en el caso de la levadura y se realizó 2 diluciones para la bacteria para ajustar a 10^6 .

3.1.6 Método experimental Challenge Test

Se procedió a inocular la crema y realizar las siembras en placa de cada emulsión. En los frascos de emulsión de 100 g se colocó 1 ml del inóculo correspondiente (*C. albicans*, *A. niger*, *E. coli*, *P.aureginosa*, *S.aureus*) y el porcentaje de extracto a utilizar, en este caso las 4 concentraciones mencionadas de 1,5%, 2%, 2,5%, y 3%. Se realizó tres repeticiones por cada tratamiento y se dejó en incubación a las cremas durante 28 días a temperaturas de 37 °C para bacterias y 25 °C para hongos y levaduras. Esto se puede observar en la tabla 7.

Tabla 7.

Tratamientos utilizados en las cremas

Microorganismo	Tratamiento	Cantidad de Inóculo	Repeticiones
<i>C. albicans</i>	1,5%	1 ml	3
	2%	1 ml	3

	2,5%	1 ml	3
	3%	1 ml	3
<i>A. niger</i>	1,5%	1 ml	3
	2%	1 ml	3
	2,5%	1 ml	3
	3%	1 ml	3
<i>E. coli</i>	1,5%	1 ml	3
	2%	1 ml	3
	2,5%	1 ml	3
	3%	1 ml	3
<i>P.aureginosa</i>	1,5%	1 ml	3
	2%	1 ml	3
	2,5%	1 ml	3
	3%	1 ml	3
<i>S.aureus</i>	1,5%	1 ml	3
	2%	1 ml	3
	2,5%	1 ml	3
	3%	1 ml	3

Se realizó siembras en placas en 4 tiempos a los 0, 7, 14, 28 días, los cuales se ejecutó tomando 1 ml de crema y colocando en 9ml de suero fisiológico estéril para realizar una dilución. A partir de esta dilución se tomaron 100µl y se colocó en placa para una siembra por extensión con el uso del asa de Drigalsky. Estas placas se colocaron en incubación durante 48 horas para bacterias y levadura, y en hongos hasta 7 días, a temperaturas mencionadas anteriormente.

Para la determinación de la concentración óptima del extracto de *Kalanchoe pinnata* como conservante en una emulsión cosmética se realizó un ANOVA simple y se plantearon las siguientes hipótesis.

Hipótesis nula (H₀)

No existen diferencias significativas entre los tratamientos de las distintas concentraciones de extracto acuoso obtenidas a partir de hojas de *Kalanchoe pinnata* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.

Hipótesis alternativa (Ha)

Existen diferencias significativas entre los tratamientos de las distintas concentraciones del extracto acuoso obtenidas a partir de hojas de *Kalanchoe pinnata* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.

3.1.7 Pruebas fisicoquímicas

Se realizó las pruebas fisicoquímicas en los laboratorios de Química de la Universidad de las Américas, se colocó las muestras en cámara de estabilidad acelerada durante 28 días, y se procedió a medir los parámetros de pH, actividad de agua y centrifugación.

3.1.7.1 Centrifugación

El equipo que se utilizó para el proceso de centrifugación fue el siguiente: centrífuga: Marca: Boeco , Modelo: BT-600. Para la centrifugación de la emulsión O/W se procedió a colocar 7 gramos de muestra en los respectivos tubos cónicos para centrífuga “Falcon” de 15 ml de capacidad, se colocó 8 tubos en el equipo el cual se configuró previamente a 3000 rpm por un tiempo de 15 minutos. Terminado el proceso se procedió a sacar los tubos y observar si existió la separación de fases, tanto en cada uno de los tratamientos experimentales, como en el testigo. Este proceso se realizó durante cuatro semanas, los días martes y jueves.

3.1.7.2 Actividad de agua

El equipo utilizado para la determinación de actividad de agua fue el siguiente: Marca: Novasina Modelo: LabSwift a_w . El proceso inició con la calibración, una vez calibrado el equipo, se procedió a colocar las muestras de emulsión cosmética en cada una de las capsulas para muestra. Las muestras se colocaron en el interior del equipo y se esperó el tiempo necesario hasta que este se estabilice, 2-5 minutos aproximadamente. Este proceso se realizó durante cuatro semanas, los días martes y jueves.

3.1.7.3 pH

El equipo utilizado para la medición de pH fue el siguiente: Marca: Modelo: Boeco BT-600. Al iniciar el proceso se calibró el equipo con las respectivas soluciones buffer. Una vez calibrado el equipo se procedió a realizar las respectivas mediciones una a una limpiando el potenciómetro con agua destilada entre cada medición. Este proceso se realizó durante cuatro semanas, los días martes y jueves.

Para la identificación de la estabilidad de una emulsión cosmética por medio de parámetros físico-químicos, se realizó un ANOVA simple y se plantearon las siguientes hipótesis.

Hipótesis nula (H_0)

No existen diferencias significativas entre los tratamientos de las distintas concentraciones del extracto acuoso obtenidas a partir de hojas de *Kalanchoe pinnata* sobre el pH, a_w y la resistencia mecánica de la emulsión.

Hipótesis alternativa (H_a)

Existen diferencias significativas entre los tratamientos de las distintas concentraciones del extracto acuoso obtenidas a partir de hojas de *Kalanchoe pinnata* sobre el pH, a_w y la resistencia mecánica de la emulsión.

3.1.7.4 Pruebas de aceptabilidad

Se realizó pruebas de satisfacción de los tratamientos seleccionados a partir de la estadística previa de microbiología y las pruebas fisicoquímicas realizadas anteriormente. Esto se ejecutó en la Universidad de las Américas mediante un análisis sensorial a través de una encuesta con escala hedónica verbal, esta es una herramienta que permite evaluar mediante los sentidos al producto en personas consideradas como posibles consumidores.

Se realizó la encuesta a 50 personas para que valoren según su preferencia a los atributos de color, olor, y textura (ver formato en Anexos).

Tabla 8.

Puntuación de la encuesta hedónica

Puntuación	
1	Me gusta disgusta mucho
2	Me disgusta moderadamente
3	Me disgusta un poco
4	No me gusta ni me disgusta
5	Me gusta poco
6	Me gusta moderadamente
7	Me gusta mucho

Obtenido de González, RODEIR, Sanmartín, Vila, 2014

Para la evaluación de la aceptabilidad de la emulsión cosmética con extracto de *Kalanchoe pinnata*, se ejecutó un ANOVA simple y Test de Friedman y se plantearon las siguientes hipótesis.

Hipótesis nula (H₀)

No existen diferencias significativas entre los tratamientos de las distintas concentraciones del extracto acuoso obtenidas a partir de hojas de *Kalanchoe pinnata* sobre el color, olor y textura de la emulsión cosmética.

Hipótesis alternativa (Ha)

Existen diferencias significativas entre los tratamientos de las distintas concentraciones del extracto acuoso obtenidas a partir de hojas de *Kalanchoe pinnata* sobre el color, olor y textura de la emulsión cosmética.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del extracto acuoso obtenido a partir de *Kalanchoe pinnata*

Los extractos se prepararon según los componentes activos que se desea obtener, estos pueden ser a partir de distintas partes de las plantas como tallos, flores, frutos, hojas, y raíces (Recalde, 2007). En la metodología se realizó la obtención del extracto acuoso mediante el uso de disolventes orgánicos. López (2011), menciona que existen dos procedimientos para la obtención de extractos vegetales, física (presión mecánica) y química (uso de disolventes). El extracto presentó una coloración amarilla como se observa en la figura 6, esto se debe a la eliminación de clorofilas por el hexano añadido. Se utilizó hexano debido a que los solventes no polares como cloroformo o hexano tienen una disolución sencilla con estos compuestos. Por esto, el manejo de hexano o sustancias orgánicas se utilizan para eliminación de aceites esenciales, lípidos y clorofilas como paso previo al uso destinado (Afandi & Sarijan, 2013).

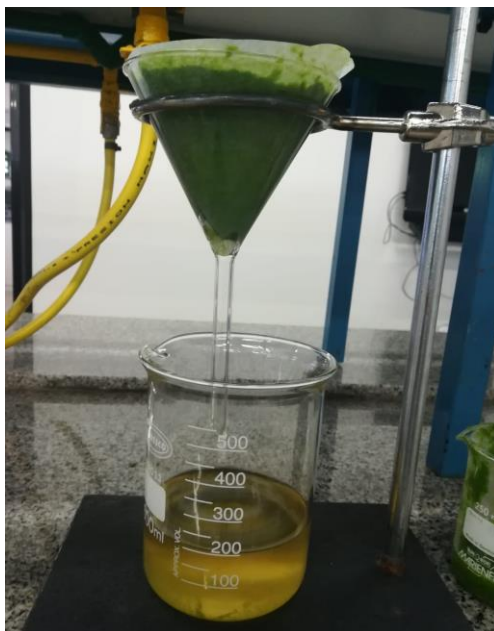


Figura 6. Extracto acuoso obtenido a partir de *Kalanchoe pinnata* con hexano

4.2 Análisis del efecto del extracto acuoso obtenido de *Kalanchoe pinnata* sobre *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

En el presente trabajo, se evidenció la eficacia del extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* contra microorganismos que se encuentran comúnmente en formulaciones cosméticas. El extracto presentó una actividad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia. coli*, y *Staphylococcus aureus*, pero no contra *Pseudomona aeruginosa* en las concentraciones ensayadas. Estudios manifiestan que existe presencia de glucósidos, saponinas, alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos y bufadienólidos en el extracto de *Kalanchoe pinnata* (Pattewar, 2012), y su efecto antimicrobiano se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides), glucósidos y taninos (Cabrera Rodríguez, Sánchez , & Guerra, 2011).

También, estudios acerca de extractos naturales como aceites esenciales, compuestos fenólicos y antioxidantes se menciona la actividad antimicrobiana. En muchos casos, efectos antimicrobianos de diversos extractos vegetales han

sido atribuidos a su contenido en flavonoides (Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011). Los flavonoides actúan como un agente bacteriostático y bactericida por alterar la membrana celular, la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, y metabolismo de diferentes cepas bacterianas (Khalid, Rahman, Bilal, & Dan-Feng, 2019). Sin embargo, para establecer la efectividad de antimicrobianos naturales, se debería evaluar de forma aislada y en conjunto con otros factores de preservación (Board & Gould, 1991).

Datos contradictorios han sido reportados por diferentes autores para los mismos compuestos antimicrobianos. Davidson (1993) investigó que el modo de acción de los compuestos fenólicos no ha sido definido, pero estos compuestos pueden molestar en la funcionalidad de la célula patógena. En cambio, Cabral, Pinto y Patriarca (2013), señalan que la forma de acción de los compuestos fenólicos modifica la permeabilidad celular microbiana, causando pérdida de macromoléculas resultando en cambios estructurales.

4.2.1 Resultados del Challenge test en *Aspergillus niger*

A continuación, en la figura 7 se observa los resultados del ANOVA por el cual se determinó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos al 5%. Para el día 28 no se ejecutó un ANOVA, debido a que los resultados fueron los mismos en las tres repeticiones por lo que no existen diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en *Aspergillus niger* a través del análisis funcional Tukey al 0,05%, determinó que no existe diferencias significativas entre las concentraciones de los tratamientos. Pero si existió diferencia significativa de los tratamientos en comparación del Testigo como se observa en la figura 7.

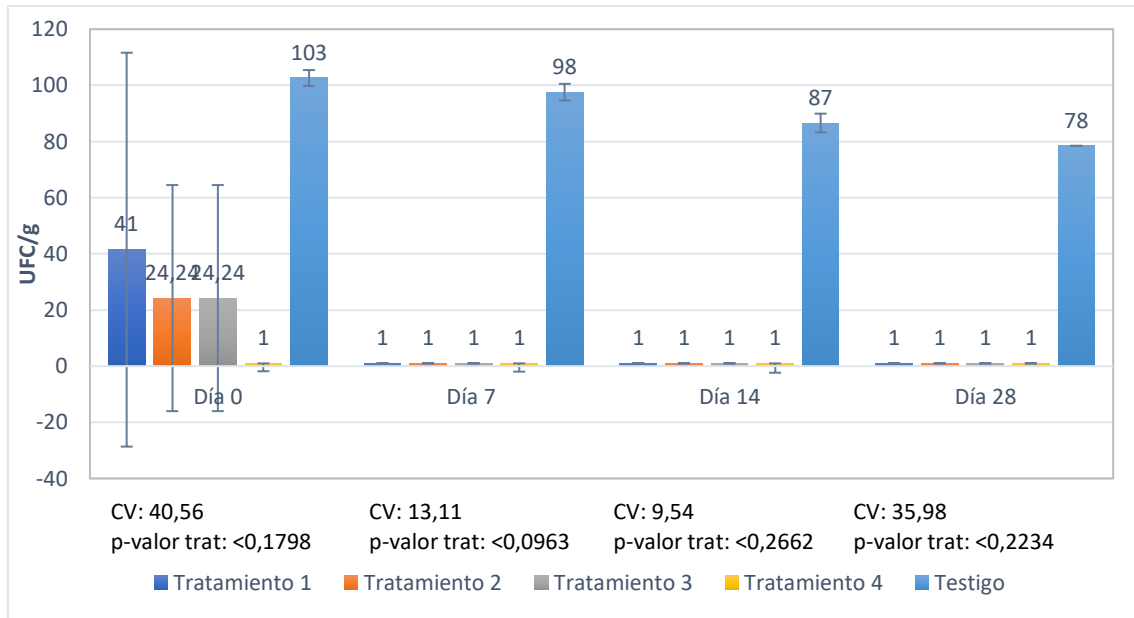


Figura 7. UFC/g de *Aspergillus niger* presentes en cada tratamiento, evaluados por el método Challenge Test a lo largo del tiempo (día 0, 7, 14, 28), siendo el tratamiento 5 el testigo.

Juárez-Segovia y Díaz-Darcía (2019), reportaron que algunos extractos vegetales contienen metabolitos que exponen un resultado directo en la disminución o total inhibición del crecimiento del género *Aspergillus*. En este caso, se corrobora el efecto de inhibición de *Aspergillus* debido a los resultados obtenidos en los tiempos 7, 14 y 28 días. Estos metabolitos, realizan la degeneración de elementos estructurales como pared celular, membrana celular, y organelos. Esta degeneración se da por los compuestos mencionados anteriormente y que están presentes en la planta. Además, Nychas (1995), indicó que los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar las enzimas responsables de la germinación de esporas, o interferir con aminoácidos involucrados en la germinación. Es importante mencionar que los valores altos en el coeficiente de variación > 10% se deben a la diferencia que existe entre los tratamientos y el testigo, ya que, en la mayoría de microorganismos se evidenció inhibición, y en el tratamiento testigo se evidenció un mayor crecimiento de UFC/g.

Prindle y Wright (1977), determinaron que el modo de acción de los compuestos fenólicos como antimicrobianos es dependiente de la concentración. En bajas concentraciones, afectan la actividad enzimática relacionada con la producción de energía, mientras que en altas concentraciones pueden causar precipitación de proteínas, ralentiza los procesos y evita la multiplicación del microorganismo.

Estos procesos se evidenciaron en la presencia al día cero, ya que las placas con menor concentración (1,5%) mostraron un mayor crecimiento radial del hongo y en la mayor concentración utilizada (3%) no hubo presencia del hongo.

4.2.2 Resultados del Challenge test en *Candida albicans*

En la figura 8, se observa los resultados del ANOVA por el cual se determinó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos al 5%.

Los resultados obtenidos en *Candida albicans* fueron similares a los obtenidos en *Aspergillus niger*. Se determinó que no existe diferencias significativas entre las concentraciones de los tratamientos. Pero si existió diferencia significativa de los tratamientos en comparación del Testigo como se observa en la figura 8.

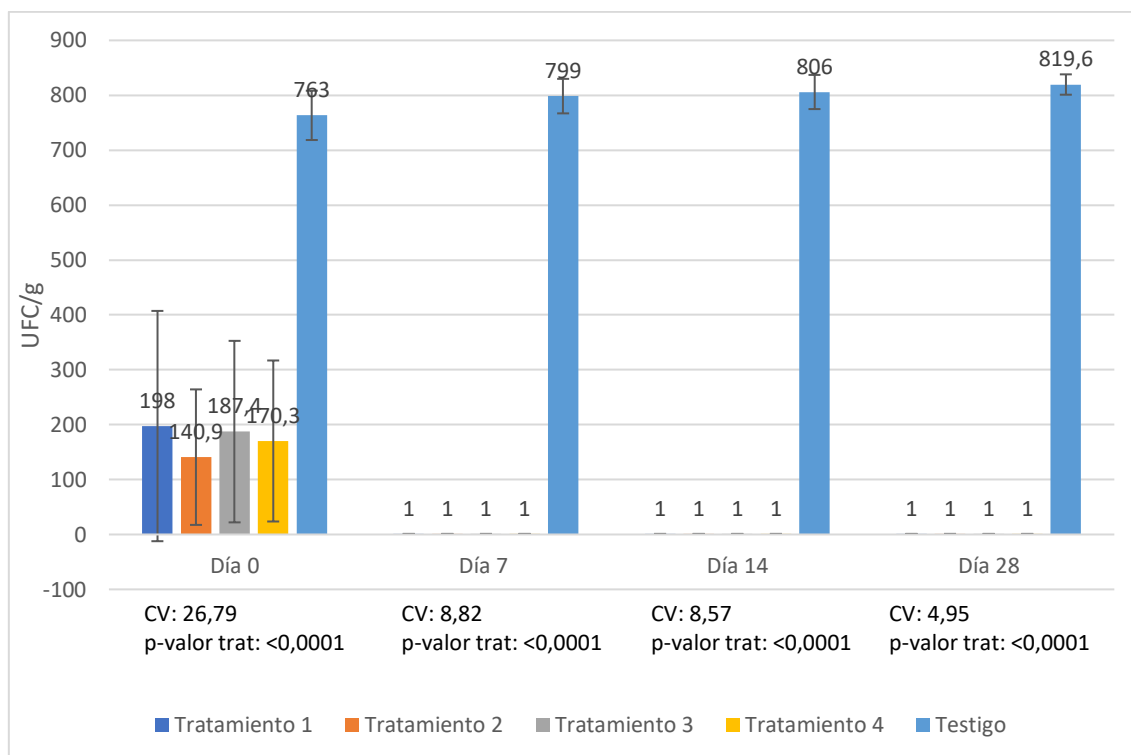


Figura 8. UFC/g de *Candida albicans* presentes en cada tratamiento, evaluados por el método Challenge Test a lo largo del tiempo (día 0, 7, 14, 28), siendo el tratamiento 5 el testigo.

En los resultados obtenidos se evidenció una inhibición del microorganismo, en las placas durante los 7, 14 y 28 días, solo presentó crecimiento al día cero como en el caso del *Aspergillus niger*. Estos resultados concuerdan con Raut y Karuppaiyl (2016), al mencionar que los compuestos fenólicos/poli fenólicos (se incluye flavonoides, quinonas, taninos, entre otros) tienen una excelente actividad inhibitoria como biopelículas contra *Candida albicans*. Los flavonoides se almacenan en células especializadas, donde pueden estar presentes en el tejido atacado (Beckman, 2000). Por otro lado, los resultados obtenidos en *Candida*, tienen información en debate, Adenike, Oladipupo y Chinedum (2008), concluyen que ninguno de los extractos de *Kalanchoe pinnata* inhiben cepas de *Candida*. Pérez González (2016), coincide de que el extracto metanólico no presentó ninguna actividad frente *Candida albicans*, pero que si es eficiente como antibacteriano (se atribuye por la presencia de glucósidos de flavonoides).

A pesar de las contradicciones, la presencia de compuestos fenólicos en la mayoría de estudios realizados, indican que esta planta puede ser utilizado como agente antimicrobiano. Esta planta ha sido ampliamente utilizada en desinfecciones de hongos, levaduras y bacterias en la medicina tradicional y sigue siendo el estándar con el cual se comparan otros bactericidas (Okwu & Nnamdi, 2011). Los compuestos fenólicos y flavonoides algunas veces son llamados fitoalexinas, estos son compuestos antimicrobianos tóxicos para una extensa variedad de microorganismos patógenos y hongos que en altas concentraciones limita la difusión del patógeno (Treutter, 2005). En otros casos, el patógeno reacciona con muerte celular programada como mecanismo de defensa del patógeno (Beckman, 2000). Algunos flavonoides pueden estar ligados directa o indirectamente en la inhibición de enzimas del patógeno, en particular, de la pared celular de plantas (Treutter, 2005).

4.2.3 Resultados del Challenge test en *Escherichia coli*

En la figura 9, se observa los resultados del ANOVA por el cual se determinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos con el Testigo al 5%. Para el día siete, catorce y veintiocho no se ejecutó un ANOVA, debido a que los resultados fueron los mismos en las tres repeticiones por lo que no existen diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en *Escherichia coli*, determinó que no existe diferencias significativas entre las concentraciones de los tratamientos. Pero si existió diferencia significativa de los tratamientos en comparación del Testigo como se observa en la figura 9.

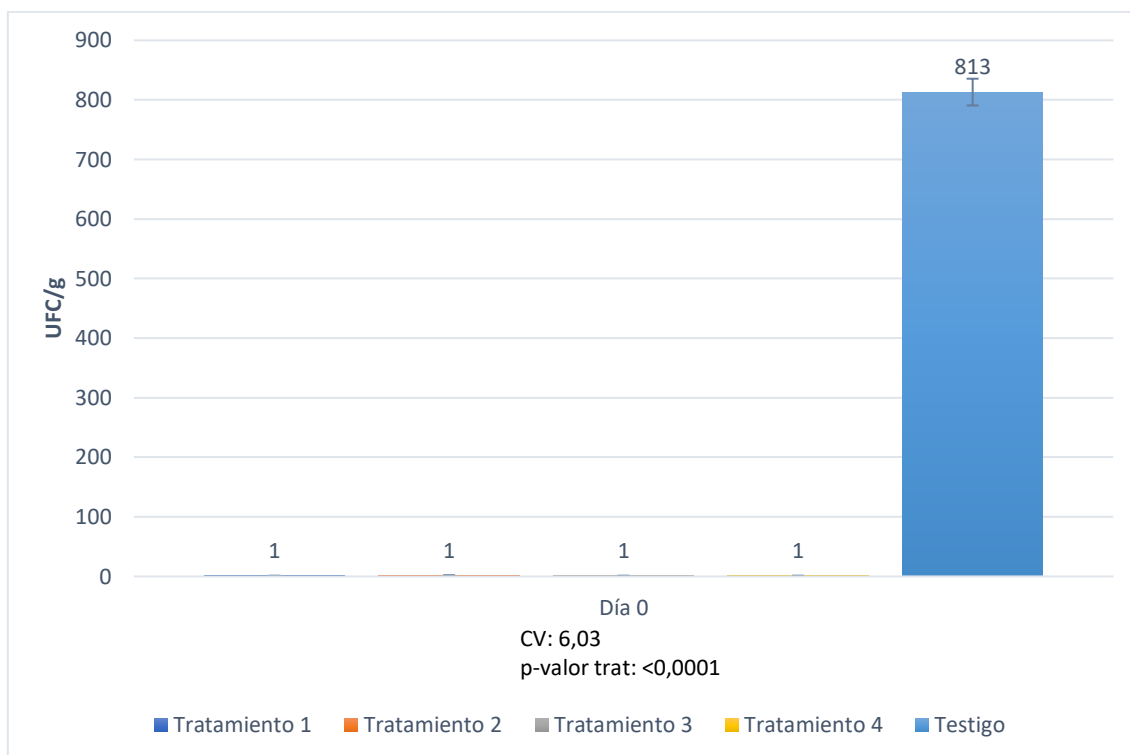


Figura 9. UFC/g de *Escherichia coli* presentes en cada tratamiento, evaluados por el método Challenge Test a lo largo del tiempo (día 0, 7, 14, 28), siendo el tratamiento 5 el testigo.

Como se puede observar en la figura 9, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos a las concentraciones de 1.5%, 2%, 2.5% y 3%, pero si con relación al tratamiento testigo, poniendo en evidencia la efectividad antimicrobiana del extracto de *K. pinnata* frente a *Escherichia coli*. Resultados similares se obtuvieron en un estudio, donde se evaluó la capacidad conservante de varios extractos y aceites naturales, siendo el aceite esencial de canela el de mejor efecto inhibitorio en *E. coli*, así como el extracto de *Matricaria chamomilla*, Aloe vera y *Calendula officinalis*, que mostraron también un efecto inhibitorio favorable (Herman, Herman, Domagalska, y Młynarczyk, 2013). Esto se debe a los compuestos fenólicos antioxidantes de la *K. pinnata*, por ejemplo, el ácido cafeico en una concentración de 0.4% es suficiente para inhibir el crecimiento de algunas bacterias, entre ellas *E. coli* y *S. aureus* (Herman, 2018), y su modo de acción para inhibir a las bacterias se basa en la alteración del transporte activo por la ruptura de la membrana citoplasmática causando daño en su función

(Pattewar, 2012). Esto provoca la coagulación del contenido celular (Herman, 2018).

4.2.4 Resultados del Challenge test en *Staphylococcus aureus*

En la figura 10, se observa los resultados del ANOVA por el cual se determinó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos al 5%. Los resultados obtenidos en *Staphylococcus aureus*, determinó que no existe diferencias significativas entre las concentraciones de los tratamientos. Pero si existió diferencia significativa de los tratamientos en comparación del Testigo como se observa en la figura 10.

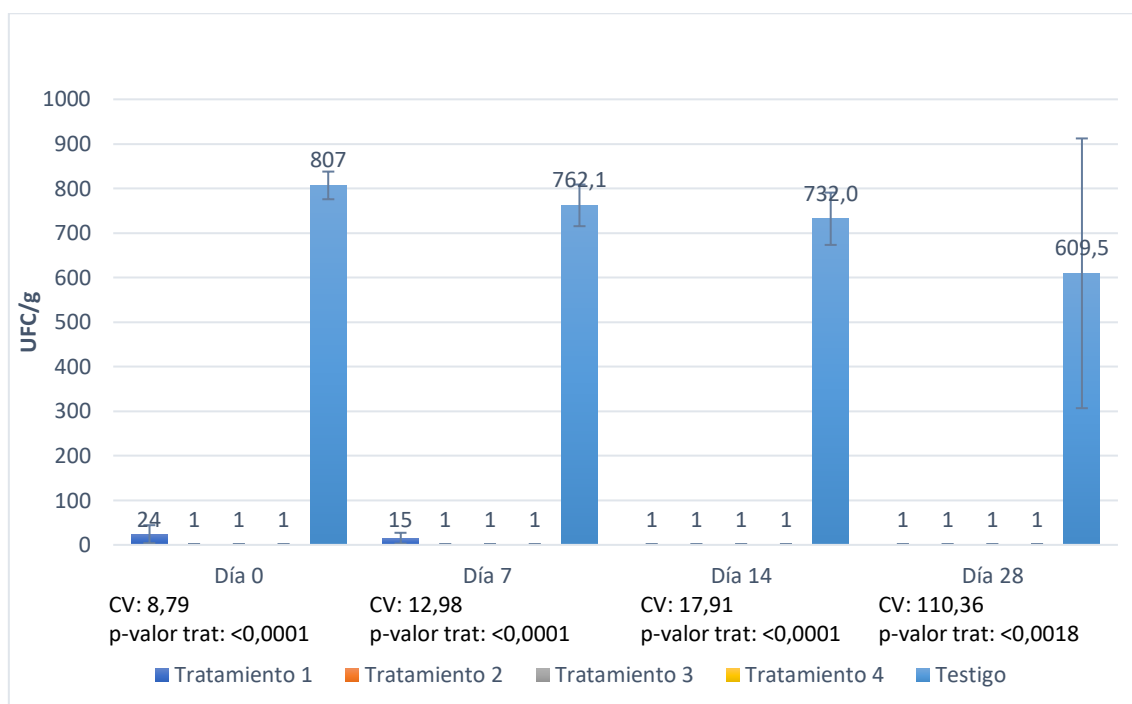


Figura 10. UFC/g de *Staphylococcus aureus* presentes en cada tratamiento, evaluados por el método Challenge Test a lo largo del tiempo (día 0, 7, 14, 28), siendo el tratamiento 5 el testigo.

Como se puede observar en la figura 10, durante los 28 días se observó que no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de conservante al 1.5%, 2%, 2.5% y 3%, pero si con relación al tratamiento testigo, en donde se evidenció el rápido crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* durante los 28 días de evaluación. Algo similar sucede en el estudio realizado por Sikora y

Kalemba, 2009, donde los aceites esenciales de té y lavanda lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus* después de 48 horas de incubación, sin embargo al realizar una mezcla de aceite de limón y té, este efecto inhibitorio ya no se reflejó mostrando una actividad inhibitoria débil; además se demostró que el sinergismo y antagonismo que existe entre los aceites esenciales y los compuestos lipídicos de la emulsión cosmética limita la accesibilidad de los aceites esenciales como conservantes a la fase acuosa, lo cual complica la reducción de la actividad microbiana, lo contrario a lo que sucede con los extractos naturales acuosos.

Por otro lado como lo menciona Pattewar (2012), los compuestos fenólicos que posee la *K. pinnata* son compuestos inhibitorios de la actividad microbiana, además el jugo de la hoja posee un gran espectro tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas, como *S. aureus*. En otro estudio se demostró que el extracto metanólico de hojas de *Azadirachta indica* logró inhibir varias bacterias gram negativas y gram positivas, entre ellas el *S. aureus*, debido a la presencia de compuestos fenólicos, triterpenos carotenoides, esteroides, valavinooides, cetonas y tetratriterpenoides (A. Grover, B.S. Bhandari, 2011), los cuales la *K. pinnata* también posee, entre ellos como ya se ha mencionado, los compuestos fenólicos, flavonoides, esteroides y terpenos.

En otro estudio se demostró que distintos extractos formulados de *Lonicera caprifoleum* y *Lonicera japonica* desde el 0.2% inhibieron el crecimiento de *S.aureus* en todas las emulsiones cosméticas probadas, de manera que los extractos formulados tuvieron un efecto antimicrobiano, tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas, incluso teniendo en cuenta que el menor valor de a_w que permite el desarrollo de *S. aureus* es 0.86, además que una condición de pH ácido ayuda a todo el sistema de conservación (Papageorgiou, Varvaresou, y Tsirivas, 2010).

4.2.5 Resultados del Challenge test en *Pseudomona aeruginosa*

En la figura 11, se observa los resultados del ANOVA por el cual se determinó la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos al 5%. Los resultados obtenidos en *Pseudomona aeruginosa*, determinó que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los tratamientos como se observa en la figura 11.

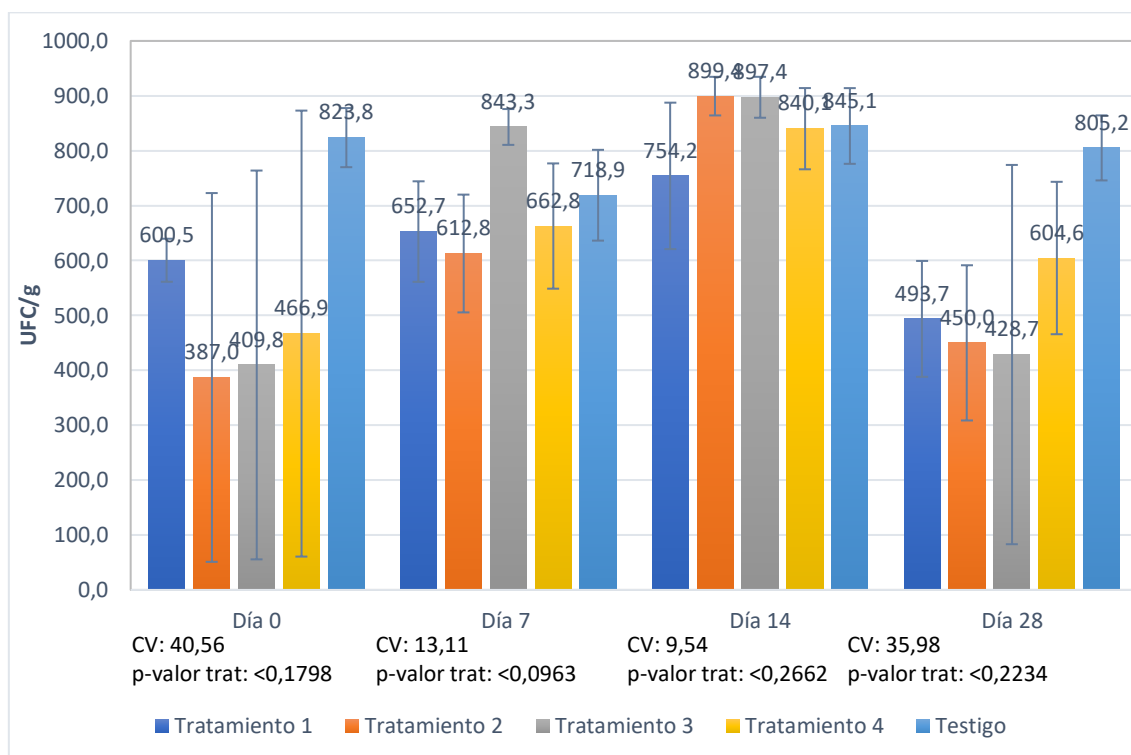


Figura 11. UFC/g de *Pseudomona aureginosa* presentes en cada tratamiento, evaluados por el método Challenge Test a lo largo del tiempo (día 0, 7, 14, 28), siendo el tratamiento 5 el testigo.

Como se puede observar en la figura 11, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, poniendo en evidencia la carencia de efecto antimicrobiano sobre *Pseudomona aeruginosa* del extracto acuoso de *K. pinnata*. Esto coincide con Herman, Herman, Domagalska, y Młynarczyk (2013), donde se probó el efecto antimicrobiano de extractos naturales de *Matricaria chamomilla*, *Aloe vera*, *Calendula officinalis* y aceites esenciales de *Lavandulla officinallis*, *Maleuca alternifolia* y *Cinnammomun zelanicum* en una emulsión cosmética y no hubo efectos inhibitorios en *Pseudomonas*.

Sin embargo, en el mismo estudio, haciendo un análisis con aceite esencial de árbol de té, la inhibición contra *P. aeruginosa* fue irrelevante, ya que, mostró únicamente un diámetro de 8 mm de inhibición, aunque, al combinar aceites esenciales con pequeñas dosis de conservante sintético se inhibió el crecimiento de aquellos microorganismos considerados como los más resistentes, dentro ellos la *P. aeruginosa* demostrando la sinergia que se puede dar entre un aceite esencial y un conservante sintético.

En el mismo estudio se demostró que el metil parabeno a una concentración del 0.4% no es efectivo contra esta bacteria; en contraparte el extracto de *Calendula officinalis* mostró efectos positivos contra esta bacteria, con un crecimiento nulo en las placas analizadas. A la vez, en dicha investigación no se realizó una determinación de los compuestos de cada uno de los extractos. Además, en otro estudio, se ha puesto en evidencia la alta resistencia de la bacteria *P. aeruginosa*, ya que, se realizó una búsqueda en la base de datos "RAPEX" sobre cosméticos contaminados microbiológicamente desde la primera semana del 2008 hasta la semana 26 del 2014, dando a conocer que el microorganismo patogénico más frecuentemente encontrado es la *P. aeruginosa* representando un 35.48% (Neza y Centini, 2016).

Flanagan (2011), denomina a los conservantes naturales como conservantes pobres, además de no ser efectivos contra gran variedad de microorganismos. Por lo tanto, son inadecuados para la fabricación de cosméticos a gran escala y la gran mayoría no son efectivos contra bacterias y sobre todo contra *Pseudomonas spp.* las cuales son bacterias de contaminación por medio del agua en la producción cosmética.

4.3 Evaluación de los parámetros fisicoquímicos en la emulsión O/W

La estabilidad preliminar o acelerada se realiza en la fase de desarrollo del producto, sirve como un estudio predictivo para evaluar la estabilidad o validez

del producto en un plazo definido. Es decir, tiene como objetivo predecir la estabilidad del producto, el tiempo de vida útil y la afinidad de la formulación con el material de empaque (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2005).

Los parámetros fisicoquímicos se evaluaron durante 28 días en la cámara de estabilidad acelerada (6 meses en tiempo real) a temperatura 40° C de y 75% humedad. La tabla 9 se puede observar el equivalente en días en la cámara de estabilidad, el cual mostró un promedio de 6 meses por los 196 días.

Tabla 9.

Equivalencia de días en cámara de estabilidad acelerada

Días fuera de cámara de estabilidad acelerada	Días en cámara de estabilidad acelerada
1	7
28	196

Se determinó que los tratamientos se mantuvieron estables para el parámetro de separación de fases, pero para valores de a_w y pH, existió variabilidad durante el tiempo, esto se puede observar en la figura 12 y 13.

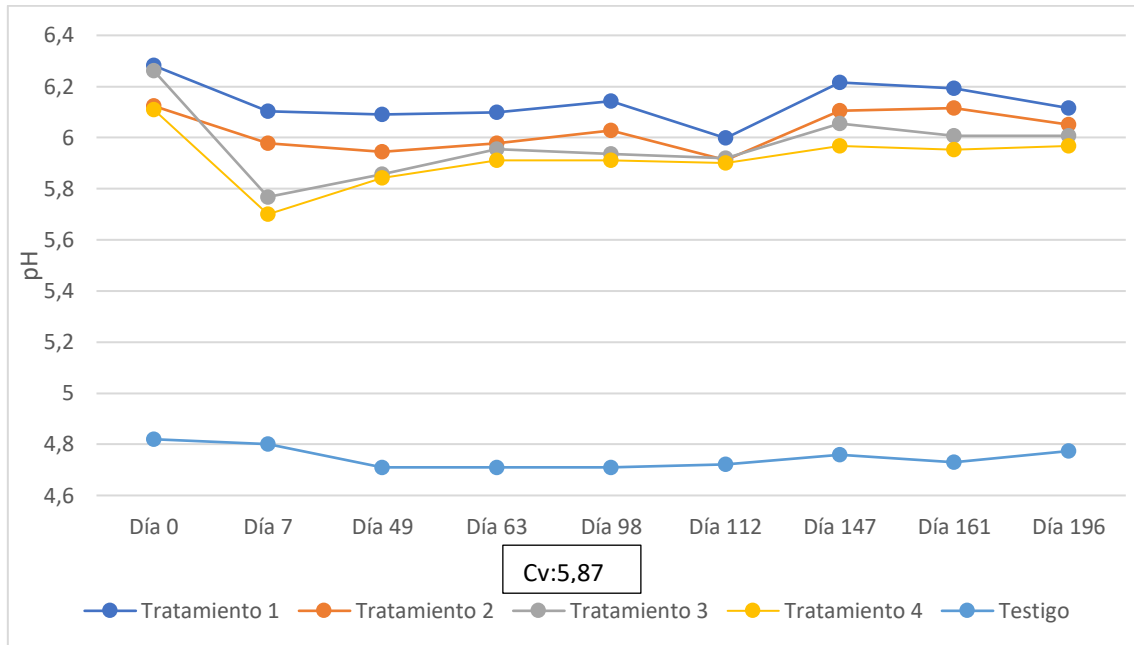


Figura 12. Comportamiento de pH durante los veintiocho días, siendo el tratamiento 5 el testigo.

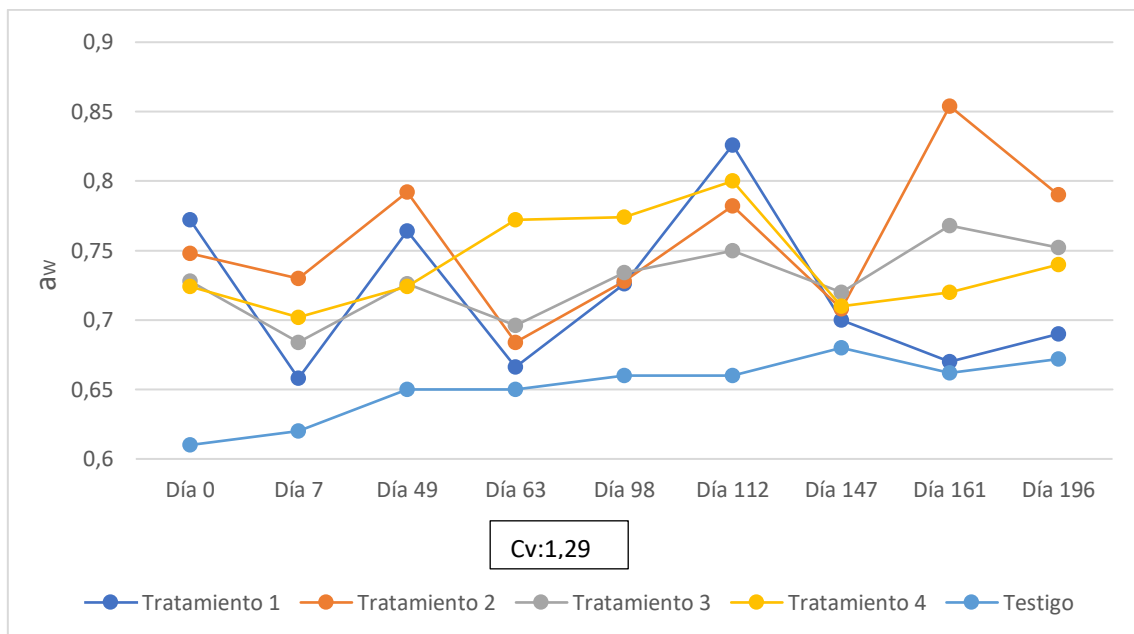


Figura 13. Comportamiento de a_w durante los veintiocho días, siendo el tratamiento 5 el testigo.

El pH se encontró dentro de los parámetros permitidos ya que van de acuerdo al pH de la piel que es de 4.5 a 5.9 (Orlandi, 2004). Mientras que la actividad de agua durante el tiempo tuvo una variabilidad en sus tratamientos, por lo cual solo

se escogió aquellos tratamientos que cumplieran la normativa NTE INEN 2867 al presentar una actividad de agua $\leq 0,75$. Eskin y Robinson (2000), nombran a los parámetros de temperatura, actividad de agua y pH como los factores más importantes para controlar los cambios físicos, químicos y microbiológicos en productos alimenticios y no alimenticios.

4.3.1 Evaluación del pH

En la tabla 10, se observa los resultados del ANOVA por el cual se determinó la presencia de diferencias significativas entre tratamientos al 5%.

Tabla 10.

ANOVA para análisis de varianza de pH entre tratamientos durante veintiocho días.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	58,84	4	14,71	2672,45	<0,0001
Tiempo	1,26	8	0,16	28,63	<0,0001
Total	61,26	224			

Los tratamientos tuvieron cambios durante el tiempo, por ello existió la diferencia significativa entre los mismos. La mayor parte del tiempo el pH de los tratamientos se encontró en intervalos de 5.9 a 6.15 y el Testigo entre 4.7 a 4.85.

Los resultados de pH durante el tiempo sufrieron cambios debido a la exposición de temperatura elevada y humedad para simular los días en tiempo real. En la emulsión se dieron procesos de oxidación por parte de los compuestos, ya que los tratamientos no llevaban ningún tipo de conservante en su formulación. Este fenómeno ocurre usualmente en estudios de estabilidad (Mahmood & Akhtar, 2013). A pesar de la variabilidad de los resultados durante los veintiocho días, todos los valores se encuentran dentro del rango para el pH de la piel. Este rango

varía entre 4.5 y 5.9 dependiendo del contenido de ácido láctico y ácido urocánico derivados del sudor, aminoácidos dicarboxílicos (glutámico-aspártico) y ácidos grasos libres (Orlandi, 2004).

El control del pH en la cosmética es muy importante para asegurar su preservación en el uso recomendado. Galembeck y Csordas (2009), identifican que la piel/epidermis se encuentra recubierta por una delgada capa de grasa conocida como manto ácido que impermeabiliza la piel contra la entrada de agua y protege al ataque de microorganismos, manteniendo un pH entre 3.5 y 5.0. Es por esto, que cualquier alteración en el manto ácido puede causar efectos negativos en la salud. En efecto, en este manto se encuentra la mayoría de microorganismos y éstos podrían verse beneficiados por las condiciones de pH (SebaMed, 2013). Existen una cantidad de productos específicos para las zonas a utilizar para evitar alteraciones (SebaMed, 2013).

El tener un rango de pH entre 4 a 6, permite controlar o limitar la proliferación de microorganismos, en especial si se usan medios con pH ácido (por debajo de 5, en general). El manejo de este parámetro, se realiza con la adición controlada de ácidos débiles, usualmente, los ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido ascórbico (Galembeck & Csordas, 2009). Esto provoca la multiplicación de microorganismos se reduzca, aunque existen levaduras y mohos capaces de soportar medios ácidos pero la mayor parte de microorganismos sufren alteraciones metabólicas por condiciones menores a 4 y mayores a 10 (Varvaresou, Papageorgiou, & Tsirivas, 2009). Además, el manejo de un pH ácido es conveniente cuando se utiliza compuestos fenólicos como es el caso, ciertos estudios han demostrado que estos compuestos son parcialmente estables en ambientes ácidos porque en pH alcalinos se oxidan generando residuos de componentes no deseables (Strauss & Gibson, 2004).

4.3.2 Evaluación del a_w

En la tabla 11 se observa los resultados del ANOVA al 5% por el cual se determinó la presencia de diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 11.

ANOVA para análisis de varianza de a_w entre tratamientos durante veintiocho días.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	0,3	4	0,07	41,53	<0,0001
Tiempo	0,13	8	0,02	8,8	<0,0001
Total	0,8	224			

Los tratamientos tuvieron cambios durante el tiempo, por ello existió la diferencia significativa.

El equipo utilizado para las mediciones fue el Novasina Modelo: LabSwift a_w , el sistema del equipo determina la fracción de agua libre en la muestra ya sea de comida, cosméticos o productos farmacéuticos (Novasina, 2010). Los resultados en a_w fueron similares a pH teniendo una variabilidad durante el tiempo, pero en este caso hubo mediciones que no cumplían la normativa NTE INEN 2867 al presentar una actividad de agua mayor a 0,75. El factor del agua es muy determinante para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, por eso las formulaciones tratan de restringir la disponibilidad de agua creando un obstáculo para la flora bacteriana que se encuentre (Varvaresou, Papageorgiou, & Tsihrivas, 2009). Existen distintas tolerancias a la actividad de agua por parte de los microorganismos, por ejemplo, las bacterias y levaduras requieren mayores cantidades de agua (Brannan, 1997). En la tabla 12, se observa una clasificación general de los límites a los que sobreviven los microorganismos.

Tabla 12.

Clasificación de los microorganismos según su límite de a_w

Microorganismos	Límite de a_w
Bacterias generales	0,91
Levaduras generales	0,88
Mohos generales	0,8
Bacterias halófilas	0,75
Mohos xerofílicos	0,65
Levaduras osmofílicas	0,60

Obtenido de Guzmán, Torán y Guzmán (2006)

La tabla 12 nos indica que al existir un valor menor de a_w , este tipo de microorganismo no podrá desarrollarse con facilidad, debido a que no es su ambiente óptimo. Además, si existe un a_w menor a 0,6 la reproducción microbiana será difícil y el producto posee mayor seguridad contra los mismos (Stevenson & Burkhardt, 2015). Los microorganismos necesitan de un estado turgente con su medio extracelular (por medio de ósmosis). Debido a la falta de turgencia, estos entran a una fase de latencia, disminuyendo el crecimiento y reduciendo el número de células microbianas (NF EN ISO 29621, 2017).

La tecnología viene desarrollando nuevas técnicas para mejorar estas propiedades fisicoquímicas, una de estas ha sido la reducción de la actividad de agua con sustancias ligantes como las sales, aceites esenciales, polioles, aminoácidos, hidrocoloides y proteínas hidrolizadas (Kerdudo, Fontaine-Vive, Dingas, Faure, & Fernandez, 2014). El uso de cada sustancia varía de acuerdo al uso destinado del producto debido a que pueden cambiar sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas y no ser agradables al consumidor.

4.3.3 Evaluación de resistencia mecánica por centrifugación

Los resultados obtenidos en la centrifugación a 3000rpm durante 15 minutos no tuvieron diferencias ya que en ninguna de las emulsiones hubo una separación de fases.

Tabla 13.

Resultados de centrifugación de los tratamientos

Día	Tratamientos				
	1.5%	2%	2.5%	3%	Testigo
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-

NOTA: Se denomina “-“cuando el resultado de la centrifugación no mostro separación de fases y “+” cuando si se mostró separación de fases.

Como podemos observar en la tabla 13, en ninguno de los tratamientos analizados (incluyendo el testigo) se observó una desestabilización mecánica de la emulsión al someterlos a centrifugación. Lo cual, indica que la formulación de la misma, incluyendo el extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* en 4 distintas concentraciones, no alteran la estabilidad de esta, lo que demuestra la adecuada formulación (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2005). Los resultados obtenidos concuerdan con un estudio realizado en una emulsión cosmética, a la cual se le añadió extracto de té verde y posteriormente se sometió a una prueba

de centrifugación exagerada, se sometió a la emulsión a 5000 rpm por 20 minutos durante un periodo de 28 días, se demostró que la emulsión fue estable y resistió a esta prueba; esto se debe a que los glóbulos de aceite dispersos en agua no cambian de tamaño cuando la emulsión es estable mecánicamente (Mahmood y Akhtar, 2013). Kowalska, Ziomek, y Zbikowska (2015), menciona que las emulsiones de tipo O/W, suelen ser más inestables y por lo general presentan sedimentación, sin embargo, esta desestabilización es reversible y las partículas de la fase dispersa no se alteran en cuanto a tamaño, pero tienden a sobreponerse en la superficie de la emulsión; estado que no ocurrió con la emulsión analizada en este estudio.

4.4 Resultados del análisis de satisfacción

Se realizó una encuesta de satisfacción a 50 panelistas no entrenados en la Universidad de las Américas. Con los resultados obtenidos de pH y a_w se eligió a las concentraciones de 2,5% y 3% para ser evaluadas. Se seleccionó estas concentraciones ya que los tratamientos que tuvieron esa dosis cumplieron con los parámetros de la normativa NTE INEN 2867 para los parámetros fisicoquímicos.

Se realizó la prueba de Friedman, y los resultados se muestran en la tabla 15. Los atributos de olor, color y textura se analizaron individualmente. Las propiedades organolépticas de color y textura evaluadas poseen un valor p menor a $p < 0.05$ lo cual muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. A excepción de la propiedad del olor, el valor p es superior a $p > 0.05$ lo cual indica que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 15.

Resultados de la evaluación con Friedman 0,05%

Tratamiento	Color	Olor	Textura

C072	1,8 a	1,87 a	1,66 a
K273	1,9 ab	2,03 a	1,84 ab
K961	2,3 c	2,1 a	2,5 c
p	0,0014	0,3821	<0,0001

Se determinó la presencia de diferencias significativas en color y textura. Mientras que en olor no existió diferencias significativas entre tratamientos, esto demostró que las personas no encontraron características que difieran a los tratamientos evaluados.

El olor no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. En un estudio en donde se realizaron emulsiones cosméticas con extractos y aceites esenciales naturales, se realizó un análisis sensorial revelando la preferencia de los panelistas por aquellos productos con extractos etanólicos, es decir, aquellos que poseían un aroma proporcionado por los aceites esenciales (Soto et al., 2018). En el presente estudio, se pretendió analizar si el extracto de *Kalanchoe pinnata* proporciona un aroma perceptible por los panelistas, el cual pudiera ser agradable o desagradable para los mismos, sin embargo, al no presentarse diferencias significativas queda revelado que el extracto acuoso no proporciona características de olor a la emulsión cosmética; esto se debe a que, las hojas de *Kalanchoe pinnata* poseen únicamente el 2.1% de monoterpenos, los cuales son denominados como los compuestos más volátiles y por lo tanto los más odoríferos (Obregón-Díaz et al., 2019). Soto y otros, mencionan que los extractos naturales proporcionan a las formulaciones cosméticas aromas tanto deseables como indeseables para el consumidor, lo que limita el grado de satisfacción y aceptabilidad de los consumidores, 2018.

En cuanto al color se mostró una mejor aceptabilidad en el tratamiento control, sin embargo, estadísticamente este tratamiento es igual al tratamiento 3, a

diferencia del tratamiento 2 el cual es estadísticamente igual al tratamiento 3 pero no al 1, lo que demuestra que el extracto no influye sobre el color de la emulsión cosmética. Lo cual, difiere de los resultados obtenidos por Soto, Parada, Falqué, y Domínguez, 2018 donde evaluaron 4 tipos de extractos naturales distintos en varios productos cosméticos, aquellos que proporcionaron un color y aroma distinto, fueron valorados con un puntaje mayor, proporcionado por el extracto de flores de *Acacia dealbata* y *Letinus edodes*. Es importante recalcar que dentro de la metodología para obtener el extracto acuoso de *K. pinnata* se añadió hexano, con el fin de evaporar las sustancias que le dan color a la planta como lo son las clorofilas, lo cual dio como resultado un extracto con un leve color amarillo.

Cuando se plantea determinar el perfil del producto cosmético la aplicación sobre la piel es un factor decisivo, ya que se evalúan factores como facilidad de aplicación, suavidad, adhesión (Cañizo, 2005). Los resultados de la textura de los tratamientos, muestran que existe diferencia significativa entre el tratamiento control y los tratamientos con extracto. Esto puede darse debido a la composición de la crema control (crema comercial sin color y olor). En la tabla 14, se puede observar la formulación para de cada emulsión utilizada.

Tabla 14

Comparación de ingredientes de la crema testigo y crema realizada.

Ingredientes de crema Testigo	Ingredientes de crema realizada
Agua, cetil palmitato, glicerina, parafina líquida, alcohol cetílico, polibuteno, monoestearato de sorbitano, almidón de yuca, patenol, dimeticona, fenoxietanol, carbopol, pentanodiol, citrato de sodio, octanodiol, ácido cítrico, hidróxido de sodio.	Agua, crema base, ácido esteárico, glicerina, dietanolamina de coco, alcohol cetílico

En la tabla 14, los ingredientes de los tratamientos son menores a comparación del tratamiento testigo. Además, los únicos compuestos que contienen ambas formulaciones son la glicerina y alcohol cetílico que brindan las propiedades de humectante y espesante respectivamente (Instituto de Dermocosmética, 2018). Las industrias utilizan estos compuestos para emular resultados hidratantes (Pareja, 2002). Se conoce que la glicerina, es el humectante más utilizado en formulaciones de este tipo debido a su forma de atraer el agua de la dermis (Carrasco, 2009). Es uno de los pocos humectantes que persiste luego de su aplicación debido a su capacidad de modular los canales de agua de la piel conocidos como acuaporinas (Sánchez, 2003).

La diferencia en las formulaciones establece la preferencia a la emulsión testigo como se muestra en los resultados de la figura 22 del análisis sensorial. Como menciona el Instituto Nacional de Seguridad y Salud (2012), aquellos productos que contienen ingredientes con características disolventes, espesantes, hidratantes tendrán una mejor aplicación sobre la piel.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto, se concluye que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (4 concentraciones distintas de extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* sobre el desarrollo de bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, hongos *Aspergillus niger* y levadura *Candida albicans*. Por lo cual, los resultados presentaron que el extracto acuoso inhibe el desarrollo de estos microorganismos desde la concentración al 1.5% hasta el 3%. Sin embargo, para *Pseudomona aeruginosa* no presento diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, por lo que se concluye que el extracto no es efectivo contra este microorganismo en las concentraciones mencionadas.

Se determinó que no existió una concentración óptima debido a que los resultados microbiológicos no existieron diferencias significativas entre concentraciones. Por otro lado, al realizar el estudio de estabilidad las emulsiones que contenían estas concentraciones presentaron menor variabilidad en pH y a_w ; además, estos tratamientos cumplieron con los requisitos establecidos por la NTE INEN 2867 en cuanto a a_w .

En los parámetros físico químicos, se identificó que todos los tratamientos se encontraron dentro del rango de pH permitido por la NTE INEN 2867. Para los tratamientos 3 y 4 (concentración 2.5% y 3%), se obtuvo valores promedio de 5,97 y 5,92 respectivamente. En cuanto a la actividad de agua, no todos los tratamientos cumplían con los parámetros establecidos por la norma, a excepción del tratamiento 3 y 4 con valores promedios de 0,73 y 0,74 respectivamente. Finalmente, para la resistencia mecánica no se mostró separación de fases en ninguno de los tratamientos, concluyendo así que todos los tratamientos presentan estabilidad mecánica.

Se evaluó las características de color, olor y textura de la emulsión por medio de un análisis sensorial. En el parámetro de olor no existió diferencias significativas y no mostró preferencia al tener calificaciones estadísticamente iguales. En contraparte el parámetro de textura, presentó una preferencia por el tratamiento de control, y los dos tratamientos analizados fueron estadísticamente iguales. Por último, el parámetro de color presentó una preferencia en el tratamiento de control y el tratamiento 3 (3%) los cuales fueron estadísticamente iguales.

5.2 Recomendaciones

Se sugiere realizar un estudio complementario utilizando formulaciones entre el conservante de *Kalanchoe pinnata* y aceites esenciales con características antimicrobianas, creando un sistema completamente sinérgico y antagónico con mejores características.

Se recomienda investigar sobre los componentes del extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* para determinar específicamente cuales son los que generan el efecto antimicrobiano.

Se puede experimentar con la adición de un conservante sintético en conjunto con el extracto de *Kalanchoe pinnata* el sistema de conservación ideal para emulsiones cosméticas O/W, de manera que el conservante sintético genere actividad antimicrobiana para aquellos que el extracto no fue suficiente.

El efectuar estudios de estabilidad en tiempos mayores a 90 días se podría identificar la vida útil del producto. Además de crear una guía de análisis sensorial en cosméticos.

Realizar un análisis a profundidad sobre la calidad de agua utilizada en el estudio y en las distintas fábricas de cosméticos, buscando un sistema de mejoramiento de esta.

REFERENCIAS

- A. Grover, B.S. Bhandari, N. R. (2011). Antimicrobial Activity of Medicinal plants- Azadirachta indica A. Juss, Allium cepa L. and Aloe vera L. 3(2), 1059–1065. Obtenido de [http://sphinxesai.com/vol3.no2/pharm/pharmpdf/PT=65\(10591065\)AJ11.pdf](http://sphinxesai.com/vol3.no2/pharm/pharmpdf/PT=65(10591065)AJ11.pdf)
- Abat, J. K., Mattoo, A. K., y Deswal, R. (2008). S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant Kalanchoe pinnata - Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. FEBS Journal, 275(11), 2862–2872. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06425.x>
- AEMPS. (2015). AEMPS. Obtenido de <https://www.aemps.gob.es/cosmeticosHigiene/cosmeticos/FAQs-Reglamento-CE-1223-2009.htm#p1>
- Afandi, A., y Sarijan, S. (2013). Journal of Tropical Resources and Sustainable Science. Obtenido de <http://www.jtrss.org/JTRSS/volume1/UN-6/1-1-62-70.pdf>
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. (2005). Portal ANVISA. Obtenido de <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Gu%C3%ADa+de+Estabilidad+de+Productos+Cosm%C3%A9ticos/dd40ebf0-b9a2-4316-a6b4-818cac57f6de>
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. (2005). Serie Calidad en Cosméticos (Primera ed). Obtenido de <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guía+de+Estabilidad+de+Productos+Cosméticos/dd40ebf0-b9a2-4316-a6b4-818cac57f6de>
- AINIA. (2016). Seguridad en los cosméticos: técnicas de control microbiológico en el desarrollo de productos. Obtenido de AINIA: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/seguridad-en-los-cosmeticos-tecnicas-de-control-microbiologico-en-el-desarrollo-de-productos/>

ANVISA. (2005). ANVISA. Obtenido de <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Gu%C3%ADa+de+Estabilidad+de+Productos+Cosm%C3%A9ticos/dd40ebf0-b9a2-4316-a6b4-818cac57f6de>

Arranberri, I., Binks, B., Clint, J., y Fletcher, P. (2006). Researchgate. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Bernard_Binks/publication/255671706_ELABORACION_Y_CARACTERIZACION_DE_EMULSIONES_ESTABILIZADAS_POR_POLIMEROS_Y_AGENTES_TENSIOACTIVOS/links/53ea018f0cf2fb1b9b675026.pdf

Arunkumar, S., y Muthuselvam, M. (2009). Analysis of Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activities of Aloe vera L. Against Clinical Pathogens. 5(5), 572–576. Obtenido de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.415.3003yrep=rep1ytype=pdf>

Asiedu-Gyekye, I., Antwi, D., Bugyei, K., y Awortwe, C. (2012). Academic Journals. Obtenido de http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1381240394_Asi-edu-Gyekye%20et%20al.pdf

Badía Vila, M., y García Miranda, E. (2012). Google Books. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=q0DGwuShJQsCyprintsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_rycad=0#v=onepage&yqyf=true

Baker, S. (2006). Watermark Silverchair. Obtenido de https://watermark.silverchair.com/44-supplement_1-s17.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAoEwggJ9BgkqhkiG9w0BBwagggJuMIICagIBADCCAmMGCSqGS1b3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMrbzH-81ODIncpheTAgEQgIICNAYUzniDvmZCR_nvDoHFeWY8NaDFtr8fsLj

Beckman, C. (2000). Science Direct. Obtenido de www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088557650090287X

Becton Dickinson y Compañía. (2011). Becton Dickinson y Compañía. Obtenido de

https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29_es.pdf

Biswas, S., Chowdhury, A., Das, J., y Hosen, S. (2011). African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Obtenido de [https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/fb5a-CC-BY-2/10.5897/ajpp11.273.pdf?X-Amz-Security-](https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/fb5a-CC-BY-2/10.5897/ajpp11.273.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoGZXIvYXdzELv%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaDlvc5ojckEe8dX2cRSKfBKtjxpxJT%2BVMuja%2FIDoKo7owR7b6PSxutF%2FkU6TK6XTxkpuu)

[Token=FQoGZXIvYXdzELv%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaDlvc5ojckEe8dX2cRSKfBKtjxpxJT%2BVMuja%2FIDoKo7owR7b6PSxutF%2FkU6TK6XTxkpuu](https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/fb5a-CC-BY-2/10.5897/ajpp11.273.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoGZXIvYXdzELv%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaDlvc5ojckEe8dX2cRSKfBKtjxpxJT%2BVMuja%2FIDoKo7owR7b6PSxutF%2FkU6TK6XTxkpuu)

Board, R., y Gould, G. (1991). Future Prospects, In Food Preservatives. Glasgow: Blackie y Son Ltd.

Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., y Kasprzycka, M. (2016). Mendeley. Obtenido de [https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/92c9-](https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/92c9-ELSEVIER/10.1016/j.sjbs.2016.01.037/Phenolic_acid_content_antioxidant_and_cytotoxic_activities_of_four_Kalancho_species.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoGZXIvYXdzEK7%2F)

[ELSEVIER/10.1016/j.sjbs.2016.01.037/Phenolic_acid_content_antioxidant_and_cytotoxic_activities_of_four_Kalancho_species.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoGZXIvYXdzEK7%2F](https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/92c9-ELSEVIER/10.1016/j.sjbs.2016.01.037/Phenolic_acid_content_antioxidant_and_cytotoxic_activities_of_four_Kalancho_species.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoGZXIvYXdzEK7%2F)

Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H., y Marto, J. (2019). Science Direct. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652619309655%2F%2F%2F%2>

Brannan, D. (1997). Cosmetic Microbiology. Ney York: CRC Press. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=26rSwpkIHZcCyoifndypg=PA1ydq=Handbook+of+Cosmetic+Microbiologyyots=wE7GCngC78ysig=6r4MOsdT->

[_SHcMbfI9vkyK2Mwl0yredir_esc=y#v=onepageyq=Handbook%20of%20Cosmetic%20Microbiologyyf=false](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=26rSwpkIHZcCyoifndypg=PA1ydq=Handbook+of+Cosmetic+Microbiologyyots=wE7GCngC78ysig=6r4MOsdT-_SHcMbfI9vkyK2Mwl0yredir_esc=y#v=onepageyq=Handbook%20of%20Cosmetic%20Microbiologyyf=false)

Butler, H. (1993). Microbiological control of cosmetics. (1976).

- Cabrera Rodríguez, D., Sánchez, Y., y Guerra, D. (2011). Redalyc. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/863/86317320007.pdf>
- Campana, R., Scesa, C., Patrone, V., Vittoria, E., y Baffone, W. (2006). Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. 43, 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01952.x>
- Carrillo, L. (2003). Microbiota. Obtenido de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/4aspergilos.pdf>
- Cashman, A. L., y Warshaw, E. M. (2005). Parabens: A review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*, 16(2), 57–66. <https://doi.org/10.1097/01206501-200506000-00001>
- Castañón, L. R. (2017). Facultad de Medicina UNAM. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.htm>
- Cermeño, J., y Torres, J. (1998, Mayo 19). *Revista Iberoamericana de Micología*. Obtenido de <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/155157.pdf>
- Cervantes García, E., García Gonzalez, R., y Salazar Schettino, P. M. (2014). The dezincification of brass. *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 11(4), 11–14. <https://doi.org/10.1108/eb020168>
- Claustrioux, J.-J. (2001). Researchgate. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/26392492_Considerations_sur_l'analyse_statistique_de_donnees_sensorielles
- Comunidad Andina de Naciones. (2017). Resolución N° 1905. Obtenido de Comunidad Andina de Naciones: <http://www.comunidadandina.org/StaticFiles/DocOf/RESO1905.pdf>
- Conde-Salazar Gómez, L., y Heras Mendaza, F. (2012). ¿Se deberían prohibir los parabenos en los cosméticos? *Piel*, 27(9), 481–483. <https://doi.org/10.1016/j.piel.2012.04.007>

- Connolly, P., Bloomfield, S. F., y Denyer, S. P. (1993). A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. (1983). Obtenido de <https://sfamjournals-onlinelibrary-wiley-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02802.x>
- Cosmetic Europe. (2010). Cosmetic Europe. Obtenido de <https://www.cosmeticseurope.eu>.
- Cuesta, A. (2014). Aseguramiento de calidad, Cultivos de referencia. Obtenido de FAO: www.fao.org › old › prior › comagric › codex › rla3014 › pdf › presen4
- Dadashi, L., y Dehghanzadeh, R. (2016). Investigating incidence of bacterial and fungal contamination in shared cosmetic kits available in the women beauty salons. *Health Promotion Perspectives*, 6(3), 159–163. <https://doi.org/10.15171/hpp.2016.25>
- Dao, H., Lakhani, P., Police, A., Kallakunta, V., Ajjarapu, S. S., Wu, K., ... Murthy, S. N. (2017). Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0875-1>
- Denis, S. (2004). Hypersensitivity to preservatives. 17(3), 251–263.
- Domene SMA, Torneros JZ, y Taddei JAAC. (2008). Facial Hedonic Scale Adaptation To Measure Food Preferences. *Revista Chilena de Nutrici[On]*, 35, 38–41. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v35n1/art05.pdf>
- Dooley, L. M., Adhikari, K., y Chambers IV, E. (2009). A general lexicon for sensory analysis of texture and appearance of lip products. *Journal of Sensory Studies*, 24(4), 581–600. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2009.00227.x>
- Dyrgaard Lundov, M., Moesby, L., Zachariae, C., y Duus Johansen, J. (2009). Contamination versus preservation of cosmetics : a review on legislation , usage , infections , and contact allergy. *Contact Dermatitis*, 70-78.
- Eguino, P., Sanchez, A., Agesta, N., Lasa, O., Raton, J. A., y Diaz-Perez, J. L. (2003). Allergic contact dermatitis due to propylene glycol and parabens in

an ultrasonic gel. *Contact Dermatitis*, 48(5), 290. Obtenido de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12931739

El Abdellaoui, S., Destandau, E., Toribio, A., Elfakir, C., Lafosse, M., Renimel, I., ... Landemarre, L. (2010). Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: Extraction, purification, and identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(3), 1329–1338. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4047-3>

Flanagan, J. (2011). NATURAL PRESERVATIVES AND PRESERVING NATURAL COSMETICS. 169–178.

Françalanci, S. (2001). Metamizol as a cause of postoperative erythroderma Allergic contact dermatitis caused by parabens in a compress.

Fürer, K., Simões-Wüst, A., y Hamburger, M. (2016). Thieme. Obtenido de <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0042-106727#N69794>

Galembeck, F., y Csordas, Y. (2009). A Graça da Química. Obtenido de <http://old.agracadaquimica.com.br/quimica/arealegal/outros/175.pdf>

Gallegos, W. (2015). Dspace UPS. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8005/1/UPS-QT06640.pdf>

Gannesen, A. V., Borrel, V., Lefeuvre, L., Netrusov, A. I., Plakunov, V. K., y Feuilloley, M. G. J. (2019). Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity, and surface properties of acneic strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *MicrobiologyOpen*, 8(3), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mbo3.659>

García, R. A., García, A. L., y Cesisergue, S. G. (2013). Evaluación de seguridad y test de eficacia de la conservación del “ Champú Preventivo Junior RF ” Actual legislación. 1–10. Obtenido de http://www3.uah.es/dianas/article/4/1/dianas_2015_4_1_e20150902_arbete-ta-garcia_etal.pdf

- González Regueiro, V., Rodeiro Mauriz, C., Sanmartín Fero, C., y Vila Plana, S. (2014). Introducción al análisis sensorial Estudio hedónico del pan en el IES Mugardos. Sgapeio, 26. Obtenido de www.seio.es › descargas › Incubadora2014 › GaliciaBachillerato%0A
- González, V., Rodeiro, C., Sanmartín, C., y Vila, S. (2014, Junio). INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS SENSORIAL. Obtenido de www.seio.es de Sociedad de Estadística e Investigación Operativa: <http://www.seio.es/descargas/Incubadora2014/GaliciaBachillerato.pdf>
- Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., ... Barreiro, M. F. (2018). Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*, 23(7), 1–42. <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>
- Herman, A. (2018). Antimicrobial Ingredients as Preservative Booster and Components of Self-Preserving Cosmetic Products. *Current Microbiology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1492-2>
- Herman, A., Herman, A. P., Domagalska, B. W., y Młynarczyk, A. (2013). Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 232–237. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0329-0>
- Hernandez, E. (n.d.). SENSORIAL. Obtenido de [http://www.inocua.org/site/Archivos/libros/m evaluacion sensorial.pdf](http://www.inocua.org/site/Archivos/libros/m%20evaluacion%20sensorial.pdf)
- Hernández, J., y Pardo, J. (2015). Repositorio UDCA. Obtenido de <http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/bitstream/11158/387/1/TEISIS%20FINAL%20JOHN%20HERNANDEZ-DIEGO%20PARDO%20ESTUDIO%20MONOGRAFICO%20DEL%20USO%20Y%20APLICACION%20DE%20PRODUCTOS%20NATURALES.pdf>
- Hill, G. (1995). Preservation of cosmetics and toiletries. 356. Obtenido de https://link-springer-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/chapter/10.1007/978-94-011-1354-0_13

Huerta Ochoa, S. (2000). Universidad Autónoma de Madrid. Obtenido de Centrifugación: <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Centrifugacion-PIS.pdf>

INEN. (2015). Apps INEN. Obtenido de <http://manualzilla.com/doc/6193092/ntenin-2867---servicio-ecuatoriano-de-normalizaci%C3%B3n?page=2>

INSST. (2012). INSST. Obtenido de <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Candida+albicans.pdf/807f3982-1e35-4c03-b626-a73873867028>

International Cooperation on Cosmetics Regulation. (2014). Preguntas generales y técnicas más frecuentes (FAQ) sobre conservantes en los cosméticos. Obtenido de ICCR: <https://www.aemps.gob.es/cosmeticosHigiene/cosmeticos/docs/ICCR-FAQ-conservantes-cosmeticos.pdf>

International Federation of Societies of Cosmetic Chemists. (1992). IFSCC. Obtenido de <http://ifsc.org/wp-content/uploads/2018/05/2-Fundamentals-of-Stability-Testing.pdf>

INVIMA. (2018). INVIMA. Obtenido de <https://www.invima.gov.co/documents/20143/453029/ASS-RSA-GU055.pdf/44b5b1ec-b5ab-b761-fd17-3399a09e401a?t=1540909864133>

Iwata, H., y Shimada, K. (2013). Springer. Obtenido de https://link-springer-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/content/pdf/10.1007%2F978-4-431-54061-8_3.pdf

Jeffries, N. (2005). Natural Preservatives Gain Ground. (August), 48–50.

Kai, A., Konishi, N., y Obata, H. (2010). [Diarrheagenic *Escherichia coli*]. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 68 Suppl 6(1), 203–207. <https://doi.org/10.1016/b978-012677530-3/50289-0>

Katz, M. J. (2006). *From research to manuscript: a guide to scientific writing*. Springer.

- Kerdudo, A., Fontaine-Vive, F., Dingas, A., Faure, C., y Fernandez, X. (2014). Wiley Library. Obtenido de <https://onlinelibrary-wiley-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/doi/epdf/10.1111/ics.12164>
- Khalid, M., Rahman, S.-u., Bilal, M., y Dan-Feng, H. (2019). Science Direct. Obtenido de <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2095311919625554?token=379D542684737E40B8AB5756700A1FF15DED3E506052B08DD1CE866D4AEF9023D37F860DE3BA7E2F70D36005058FEDE4>
- Kitahara, N., Morisaka, H., y Aoki, W. (2015). Springer Open. Obtenido de <https://amb-express.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s13568-015-0127-2>
- Kočevár Glavač, N., y Lunder, M. (2018). Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. *International Journal of Cosmetic Science*, 40(3), 276–284. <https://doi.org/10.1111/ics.12461>
- Kolodziejczyk-Czepas, J., y Stochmal, A. (2017). NCBI. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5696496/>
- Korać, R., Krajišnik, D., y Milić, J. (2016). Sensory and instrumental characterization of fast inverting oil-in-water emulsions for cosmetic application. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(3), 246–256. <https://doi.org/10.1111/ics.12282>
- Kowalska, M., Ziomek, M., y Zbikowska, A. (2015). Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(4), 408–416. <https://doi.org/10.1111/ics.12211>
- Kragh, K., Alhede, M., y Rybtke, M. (2018). NCBI. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5812950/>
- Kuo, P.-C., Hung, H.-Y., y Liao, Y.-R. (2017). Science Direct. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674638418300273>

- Lee, E., An, S., Choi, D., Moon, S., y Chang, I. (2007). Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. *Contact Dermatitis*, 131-136.
- Liria Domínguez, M. (2007). Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos. Obtenido de Semantic scholar: <https://pdfs.semanticscholar.org/faee/c49e086428333bcee23b7900ececa4b16b9a.pdf>
- Lundov, M. D., Johansen, J. D., Zachariae, C., y Moesbyà, L. (2010, Julio 31). Low-level efficacy of cosmetic preservatives. Obtenido de *International Journal of Cosmetic Science*: <https://onlinelibrary-wiley-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/doi/epdf/10.1111/j.1468-2494.2010.00619.x>
- Mahmood, T., y Akhtar, N. (2013). Scielo. Obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1984-82502013000200016
- Marcano, R. (2013, Enero). Word Press. Obtenido de *Viscosidad*: <https://marcanord.files.wordpress.com/2013/01/viscosidad-rdmc.pdf>
- Martins, V. B., Bordim, J., Bom, G. A. P., Carvalho, J. G. D. S., Parabocz, C. R. B., y Mitterer Daltoé, M. L. (2019). Consumer profiling techniques for cosmetic formulation definition. *Journal of Sensory Studies*, (December). <https://doi.org/10.1111/joss.12557>
- McClements, D. J. (2016). *Food emulsions: Principles, practices, and techniques*. Boca Ratón: CRC Press .
- Mediavilla, M. (2018). FBIOyF. Obtenido de https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/153651/mod_resource/content/1/Contaminaciones%20-%20MEDIAVILLA%202018.pdf
- Merieux NutriSciences. (2016). Merieux NutriSciences. Obtenido de <https://www.merieuxnutrisciences.com/es/calidad-seguridad-alimentaria/food-science-center/challenge-tests>

- Ministerio de Salud Perú. (2010). Mediagraphic . Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl109-10e.pdf>
- Ministerio de Salud y Protección . (2018). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GU%C3%8DA%20PARA%20EL%20DESARROLLO%20Y%20PRESENTACI%C3%93N%20DE%20LOS%20ESTUDIOS%20DE%20ESTABILIDAD%20DE%20MEDICAMENTOS%20CONVENCIONALES.pdf>
- Ministerio de Salud. (2016). Código orgánico de la salud. Obtenido de Pro Cosméticos: <https://www.procosmeticos.ec/archivos/COS-Texto-completo-APROBADO-Coidigo-Orgainico-de-Salud-.pdf>
- Montero, M. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. 109.
- Moussour, M., Lavarde, M., Pensé-Lhéritier, A. M., y Bouton, F. (2017). Sensory analysis of cosmetic powders: personal care ingredients and emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/ics.12352>
- Muñoz, J., Alfaro, M., y Zapata, I. (2007). Researchgate. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Jose_Munoz6/publication/26524089_Avances_en_la_formulacion_de_emulsiones/links/552f93f70cf2acd38cbc09ac/Avances-en-la-formulacion-de-emulsiones.pdf
- Nascimento, L. B. D. S., Leal-Costa, M. V., Menezes, E. A., Lopes, V. R., Muzitano, M. F., Costa, S. S., y Tavares, E. S. (2015). Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.011>
- Neogen. (2010). Food Safety Neogen. Obtenido de <https://foodsafety.neogen.com/sp/rose-bengal-chloramphenicol-agar>

- Neza, E., y Centini, M. (2016). Microbiologically contaminated and over-preserved cosmetic products according rapex 2008-2014. *Cosmetics*, 3(1). Obtenido de <https://doi.org/10.3390/cosmetics3010003>
- NF EN ISO 29621. (2017). ISO. Obtenido de <https://www.iso.org/fr/standard/68310.html>
- Notermans, S. (2003). Wiley Library. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00051.x>
- Novasina. (2010). Pedak. Obtenido de www.pedak.nl
- Obregón-Díaz, Y., Pérez-Colmenares, A., Obregón-Alarcón, K., Aparicio-Zambrano, R., Rojas-Fermín, L., Usubillaga, A., y Carmona, J. (2019). Volatile Constituents of the Leaves of *Kalanchoe pinnata* from the Venezuelan Andes. *Natural Product Communications*, 14(5), 1–3. <https://doi.org/10.1177/1934578X19842703>
- Obregón-Díaz, Y., Pérez-Colmenares, A., y Obregón-Alarcón, K. (2018). *SAGE Journals*. Obtenido de <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19842703>
- Okwu, D., y Nnamdi, F. (2011). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Obtenido de <http://www.jocpr.com/articles/two-novel-flavonoids-from-bryophyllum-pinnatum-and-their-antimicrobial-activity.pdf>
- ONU DI. (2018). ONU DI. Obtenido de [https://www.unido.org/sites/default/files/files/2019-02/ONU DI_Gu%C3%ADa%20de%20Estabilidad_FINAL%20\(003\).pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/files/2019-02/ONU DI_Gu%C3%ADa%20de%20Estabilidad_FINAL%20(003).pdf)
- Organización Mundial de la Salud. (2015). WHO. Obtenido de https://www.who.int/global_health_histories/seminars/Dr_Zhangs_Presentation_GHHSeminar_86.pdf
- Ortega Álvarez, D. (2014). Caracterización de la composición fitoquímica del aceite vegetal de la especie maní de árbol (*Caryodendron orinocense* h. karst) e investigar su aplicación en emulsiones cosméticas. 1–86.

- Özçelik, B., Kartal, M., y Orhan, I. (2011). Tanfonline. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2010.519390>
- Papageorgiou, S., Varvaresou, A., y Tsirivas, E. (2010). New alternatives to cosmetics preservation. 123(April), 107–123. Obtenido de <http://www.campo-research.com/wp-content/uploads/2015/04/New-Alternatives-to-Cosmetic-Preservation.pdf>
- Pastor-Nieto, M. A., Alcántara-Nicolás, F., Melgar-Molero, V., Pérez-Mesonero, R., Vergara-Sánchez, A., Martín-Fuentes, A., ... de Eusebio-Murillo, E. (2017a). Conservantes en productos de higiene y cosméticos, medicamentos tópicos y productos de limpieza doméstica en España. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 108(8), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2017.04.003>
- Pattewar, S. V. (2012). KALANCHOE PINNATA: PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROFILE Seema V. Pattewar Sanjivani Institute of Pharmacy and Research, Kopargaon- 423603, Maharashtra, India. 3(04), 993–1000.
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., y Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
- Perim, M., y da Costa Borges, J. (2019). Obtenido de [http://editora.museu-goeldi.br/bn/artigos/cnv14n1_2019/efeito\(perim\).pdf](http://editora.museu-goeldi.br/bn/artigos/cnv14n1_2019/efeito(perim).pdf)
- Picallo, A. (2009, Marzo). Análisis sensorial de los alimentos. Obtenido de Repositorio Universidad de Buenos Aires: http://repositorioubu.sisbi.uba.ar/gsd/collect/encruci/index/assoc/HWA_257.dir/257.PDF
- Pinon, A., Alexandre, V., Cupferman, S., Crozier, A., y Vialette, M. (2007). Growth, survival and inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains of various origin in the presence of ethanol.

International Journal of Cosmetic Science, 29(2), 111–119.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2007.00365.x>

Pérez, M. (2009). Higiene Educación . Obtenido de
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>

Pro Cosméticos. (2018). Estadísticas de importación y exportación del sector cosmético - Año 2018. Obtenido de Pro Cosméticos:
<https://procosmeticos.ec/archivos/ESTADISTICAS-2018.pdf>

Quazi Majaz, A., Tatiya AU, y Khurshid M. (2011). Scholar Google. Obtenido de
[https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Int+J+Res+Ayurveda+P+harmytitle=The+miracle+plant+\(Kalanchoe+pinnata\):+a+phytochemical+and+pharmacological+reviewyauthor=A+Quazi+Majazyauthor=AU+Tatiyayauthor=M+Khurshidyvolume=2ypublication_year=2011ypages](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Int+J+Res+Ayurveda+P+harmytitle=The+miracle+plant+(Kalanchoe+pinnata):+a+phytochemical+and+pharmacological+reviewyauthor=A+Quazi+Majazyauthor=AU+Tatiyayauthor=M+Khurshidyvolume=2ypublication_year=2011ypages)

Quinde Tenecela, M. (2017). Propuesta de una guía práctica para el análisis sensorial de alimentos y bebidas aplicado a quesos frescos. Obtenido de Repositorio Universidad de Cuenca:
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27299/1/PROYECTO%20DE%20INTERVENCION.pdf>

Rajsekhar, P., Arvind Bharani, R., y Ramac, M. (2016). Japsonline. Obtenido de
https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1819_pdf.pdf

Raquel Arbeteta, Alicia López, S. G. (2015). Evaluación de seguridad y test de eficacia de la conservación “Champú Preventivo Junior RF.” Revista de Dianas Terapéuticas, 4(1), 10.

Recalde, T. (2007). Dirección de Innovación y Calidad del Ministerio de Economía. Obtenido de
<http://dica.minec.gob.sv/inventa/attachments/article/7639/Alimentos%20y%20cosm%C3%83%C2%A9tica.pdf>

Reyes, P., y Di Scipio, S. (2012). Scielo. Obtenido de
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0798-40652012000100007

- Richard, C., Tillé-Salmon, B., y Mofid, Y. (2016). Contribution to interplay between a delamination test and a sensory analysis of mid-range lipsticks. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 100–108. <https://doi.org/10.1111/ics.12242>
- Rodrigues, E., Félix-Silva, J., y Xavier-Santos, J. (2019). Science Direct. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218380326>
- Russell, A. D. (2003). Challenge testing : principles and practice. (July), 147–153.
- Sagara, R., Nakada, T., y Iijima, M. (2008). Paraben allergic contact dermatitis in a patient with livedo reticularis. *Contact Dermatitis*, 58(1), 53–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01162.x>
- Sasseville, D. (2004). Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic therapy*, 251-263.
- Schleier, R., Nakamura, M., y Perlatto, R. (2016). Abmanacional. Obtenido de <http://abmanacional.com.br/wp-content/uploads/2017/06/36-3-Dist%C3%BArbios-hist%C3%A9ricos.pdf>
- Scholtyssek, R. (2001). Protection of cosmetics and toiletries.
- SebaMed. (2013). SebaMed. Obtenido de <http://sebamed.com.ec/nosotros/manto-acido/>
- Secretaria de Salud Mexicana. (2015). Diario Oficial de la Federación. Obtenido de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5440183
- Sikora, M., y Kalemba, D. (2009). Antimicrobial activity of lavender , tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. 107, 1903–1911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x>
- Smirnova, G., Samoilova, Z., Muzyka, N., y Oktyabrsky, O. (2012). Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. 192–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05322.x>

- Soto, M. L., Parada, M., Falqué, E., y Domínguez, H. (2018). Personal-care products formulated with natural antioxidant extracts. *Cosmetics*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010013>
- Stevenson, A., y Burkhardt, J. (2015). Wiley Library. Obtenido de <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1462-2920.12598>
- Strauss, G., y Gibson, S. (2004). Science Direct. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X03000456>
- Supratman, U., Fujita, T., y Akiyama, K. (2000). Tandfonline. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.65.947>
- Tarr, P. I., y Neill, M. A. (2001). *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterology Clinics of North America*, 30(3), 735–751. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70208-9](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70208-9)
- Thi, L., Ngan, M., Dung, P. P., Vang, N., y Yen, T. (2017). Antibacterial Activity of Ethanolic Extracts of Some Vietnamese Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. 020030. <https://doi.org/10.1063/1.5000198>
- Thibane, V., Ndhala, A., y Finnie, J. (2018). Science Direct. Obtenido de <https://pdf.sciencedirectassets.com/273500/1-s2.0-S0254629918X00064/1-s2.0-S0254629918309803/main.pdf?X-Amz-Security-Token=AgoJb3JpZ2luX2VjEEMT%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQCe4nP%2FLBlmOwTdmDLzv%2BFJJJHfjszo8tyOBqF1C4lLgIhAKZRUVF4>
- Toler, J. C., Boots, T., Pic, C., y Uk, N. G. (1984). Preservative stability and preservative systems ". (November).
- Treutter, D. (2005). NCBI. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16388461>
- Valente, T., Lima, E., y Henriques, L. (2001). Repositorio UNESP. Obtenido de <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141104/ISSN0102-5716-2011-18-03-347-358.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Varvaresou, A., Papageorgiou, S., Tsirivas, E., Protopapa, E., Kintziou, H., Kefala, V., y Demetzos, C. (2009). Self-preserving cosmetics. 163–175. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00492.x>
- Varvaresou, A., Papageorgiou, S., y Tsirivas, E. (2009). Wiley Library. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1468-2494.2009.00492.x>
- Vega Picon, M. A. (2015). "EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL ACEITE ESENCIAL DE Curcuma longa L. COMO CONSERVANTE EN UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA ORGÁNICA."
- Verhaeghe, I., y Dooms-Goossens, A. (1997). Multiple sources of allergic contact dermatitis from parabens. *Contact Dermatitis*, 36(5), 269–270. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1997.tb00220.x>
- Vieira, M., Bessa, L., Martins, R., y Arantes, S. (2017). Wiley Online Library. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201700006>
- Vivanco Carrillo, G. E. (2016). Investigación y desarrollo gráfico de productos cosméticos. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5784>
- Watts, B., Ylimaki, G., Jeffery, L., y Elías, L. (1992). *Basic Sensory Methods for Food Evaluation*. Ottawa: International Development Research Centre.
- Wilkinson, J. M., y Cavanagh, H. M. A. (2005). Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants. 646(February), 643–646. Obtenido de <https://onlinelibrary-wiley-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/doi/10.1002/ptr.1716>
- Yim, E., Nole, K. L. B., y Tosti, A. (2014). Contact dermatitis caused by preservatives. *Dermatitis*, 25(5), 215–231. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000061>
- Zendejas, G., Avalos, H., y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenecidad, metodos de identificacion. *Revista Biomed*, 25(3), 129–143.

Zhu, F. (2018). Science Direct. Obtenido de <https://pdf.sciencedirectassets.com/271911/1-s2.0-S0924224418X00144/1-s2.0-S0924224418303856/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEFsaCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQCSqO16kw0MNHIZP53kRxMQhd1kt3IAKgRKwoRzliWm0QIhAJ33Xos%2F3IBhokWIOzepThEEEL3%2FLKKO8o%2Fe8u>

ANEXOS

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	9434,13	2	4717,07	5,49	0,0316
Tratamientos	17798,27	4	4449,57	5,18	0,0234
Total	34108,93	14			

Anexo 1: ANOVA para análisis de varianza de *Apergillus niger* en el día cero frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	3,33	2	1,67	1	0,4096
Tratamientos	22426,67	4	5606,67	3364	<0,0001
Total	22443,33	14			

Anexo 2: ANOVA para análisis de varianza de *Apergillus niger* en el día siete frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	3,33	2	1,67	1	0,4096
Tratamientos	17613,07	4	4403,27	2641,96	<0,0001
Total	17629,73	14			

Anexo 3: ANOVA para análisis de varianza de *Apergillus niger* en el día catorce frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	171064,93	2	85532,47	13,98	0,0024
Tratamientos	839970,27	4	209992,57	34,32	<0,0001
Total	1059982,93	14			

Anexo 4: ANOVA para análisis de varianza de *Candida albicans* en el día cero frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	400,93	2	200,47	1,00	0,4096
Tratamientos	1527053,07	4	381763,27	1904,37	<0,0001
Total					

Anexo 5: ANOVA para análisis de varianza de *Candida albicans* en el día siete frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	384,93	2	192,47	1,00	0,4096
Tratamientos	1553972,27	4	388493,07	2018,5	<0,0001
Total	1555896,93	14			

Anexo 6: ANOVA para análisis de varianza de *Candida albicans* en el día catorce frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	132,93	2	66,47	1,00	0,4096
Tratamientos	1608516,27	4	402129,07	6050,09	<0,0001
Total	1609180,93	14			

Anexo 7: ANOVA para análisis de varianza de *Candida albicans* en el día veintiocho frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	194,13	2	97,07	1,00	0,4096
Tratamientos	1583725,07	4	395931,27	4078,96	<0,0001
Total	1584695,75	14			

Anexo 8: ANOVA para análisis de varianza de *Escherichia coli* en el día cero frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	1019,2	2	509,6	2,37	0,1556
Tratamientos	1538150,4	4	384537,6	1787,72	<0,0001
Total	154089,4	14			

Anexo 9: ANOVA para análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* en el día cero frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	1387,6	2	693,8	1,69	0,2441
Tratamientos	1377576,00	4	344394,000	839,37	<0,0001
Total	1382246,00	14			

Anexo 10: ANOVA para análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* en el día siete frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	1390,80	2	695,40	1,00	0,4096
Tratamientos	1282466,4	4	320616,6	461,05	<0,0001
Total	1289420,4	14			

Anexo 11: ANOVA para análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* en el día catorce frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	36550,13	2	18325,07	1	0,4096
Tratamientos	888166,67	4	222041,67	12,12	0,0018
Total	1071417,33	14			

Anexo 12: ANOVA para análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* en el día veintiocho frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	434689,6	2	217344,8	4,57	0,0474
Tratamientos	389976,27	4	97494,07	2,05	0,1798
Total	1205041,6	14			

Anexo 13: ANOVA para análisis de varianza de *Pseudomonas aeruginosa* en el día cero frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	14582,8	2	7291,4	0,87	0,455
Tratamientos	95822,4	4	23955,6	2,86	0,0963
Total	177436,4	14			

Anexo 14: ANOVA para análisis de varianza de *Pseudomonas aeruginosa* en el día siete frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	877,4	2	4386,2	0,67	0,5375
Tratamientos	41622,4	4	10405,6	1,59	0,2662
Total	102644,4	14			

Anexo 15: ANOVA para análisis de varianza de *Pseudomonas aeruginosa* en el día catorce frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Repeticiones	24985,73	2	12492,87	0,31	0,7408
Tratamientos	287609,07	4	71902,27	1,79	0,2234
Total	633371,73	14			

Anexo 16: ANOVA para análisis de varianza de *Pseudomona aeruginosa* en el día veintiocho frente al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* a (1.5,2,2.5 y 3) % y testigo sin extracto acuoso.



Anexo 17. Ejecución de la encuesta de satisfacción

