



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la influencia de aceites esenciales incorporados en una formulación base de jabón líquido para manos sobre la actividad antimicrobiana.

Nathalia Alejandra Moreno López

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2023

2

Evaluación de la influencia de aceites esenciales incorporados en una formulación base de jabón líquido para manos sobre la actividad antimicrobiana.

Evaluación de la influencia de aceites esenciales incorporados en una formulación base de jabón líquido para manos sobre la actividad antimicrobiana.

Nathalia Alejandra Moreno López

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):

Q.F, PhD. German Eduardo Matiz Melo

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

TECNOPRA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

4

Evaluación de la influencia de aceites esenciales incorporados en una formulación base de jabón líquido para manos sobre la actividad antimicrobiana.

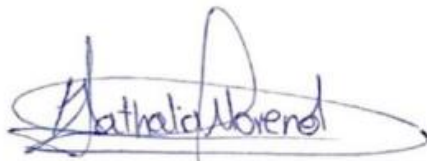
Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).



Nathalia Alejandra Moreno Lopez

Fecha: 10/12/2022

Resumen

Evaluación de la influencia de aceites esenciales incorporados en una formulación base de jabón líquido para manos sobre la actividad antimicrobiana

Se fabricó un producto jabón líquido para manos usando aceites esenciales de canela y naranja, en donde se llegó a un jabón espumoso tipo microemulsión, los aceites escogidos fueron resultado de una evaluación organoléptica realizada, en la cual se encontró que el uso del aceite esencial de callistemon no es el más adecuado debido a su fuerte olor; adicionalmente teniendo en cuenta el costo de los aceites esenciales se decide evaluar canela y naranja para su uso en el jabón final. Se prepararon varias combinaciones de los dos aceites a las cuales se les determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* contra los siguientes microorganismos *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*; dicho ensayo mostró que el aceite esencial de canela presenta una mayor actividad antimicrobiana que el aceite esencial de naranja. Sin embargo, se escogió la fórmula de mejor desempeño teniendo en cuenta aspectos como formación de espuma, características organolépticas, costos y resultados *in vitro* de la evaluación antimicrobiana. La fórmula seleccionada fue una combinación de aceite esencial de naranja 4% y aceite esencial de canela 1%. A la fórmula escogida se le evaluó la capacidad antimicrobiana en humanos, en donde se encontró que existe una mayor reducción de microorganismos con el uso del jabón con respecto al control (jabón sin aceites esenciales), adicionalmente, se evidencia que existe un efecto acumulativo al obtener un menor conteo de microorganismos luego del uso durante 5 días, tres veces al día del jabón.

Palabras clave: Aceites esenciales, Jabón antibacterial, *Cinnamomum verum*, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus sinensis*, *in vivo*, *in vitro*.

Abstract

Evaluation of the influence of essential oils incorporated in a liquid hand soap base formulation on antimicrobial activity.

A micro emulsion type foaming soap was formulated with cinnamon and orange essential oils to manufacture an antimicrobial soap. The selection of essential oils was based on organoleptic characteristics and costs, so cinnamon and orange were selected to be used in the soap formulation, and callistemon essential oil was rejected because of its strong smell. Cinnamon essential oil showed higher antimicrobial activity in vitro antimicrobial assays (*Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) than orange essential oil. Formulation selection is based on organoleptic characteristics, results of antimicrobial activity, and costs. The best-performing formula was the combination of 4% orange essential oil and 1% cinnamon essential oil. In human antimicrobial activity trials, the selected formula showed much greater activity than the control formula (without essential oils). There is a cumulative effect due to the greater reduction of microorganisms after using the soap three times a day for five days.

Keywords: Essential oils, antibacterial soap, *Cinnamomum verum*, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus sinensis*, *in vivo*, *in vitro*.

Contenido

1. Marco Teórico.....	20
1.1 Agentes antimicrobianos	21
1.2 Aceites Esenciales	23
1.3 Microemulsiones	25
1.4 Lavado de manos y microorganismos utilizados	27
2. Materiales y Métodos	31
2.1 Evaluación de características físicas y organolépticas	31
2.2 Evaluación actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	36
2.3 Evaluación actividad antimicrobiana <i>in vivo</i>	41
3. Resultados y Discusión	44
3.1 Evaluación de características físicas y organolépticas	44
3.2 Evaluación antimicrobiana <i>in vitro</i>	66
3.3 Evaluación antimicrobiana <i>in vivo</i>	76
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	96
4.1 Conclusiones.....	96
4.2 Recomendaciones.....	97
5. Bibliografía	99

Lista de figuras

Figura 1: Siembra de agotamiento por estrías	38
Figura 2: Siembra masiva.....	38
Figura 3: Resultados para aspecto en cada una de las formulaciones.	45
Figura 4: Resultados para generación de espuma en cada una de las formulaciones...	46
Figura 5: Resultados para facilidad de lavado en cada una de las formulaciones.....	46
Figura 6: Resultados para suavidad luego del lavado en cada una de las formulaciones.	47
Figura 7: Resultados pH antes de ser ajustado.	48
Figura 8: Resultados pH ajustado.....	49
Figura 9: Resultados viscosidad.....	49
Figura 10: Formulaciones recién preparadas.	53
Figura 11: Formulaciones dos semanas después de preparadas.....	53
Figura 12: Formulaciones dos semanas después de preparadas. (de izquierda a derecha 3% AE naranja, 5% AE naranja, 4% AE naranja combinado con 1% AE canela)	56
Figura 13: Aspecto de los jabones espumosos.....	57
Figura 14: Altura de espuma	58
Figura 15: Altura de espuma F1	59
Figura 16: Altura de espuma F2	59
Figura 17: Altura de espuma F3	60
Figura 18: Altura de espuma F4	60
Figura 19: Altura de espuma F5	61
Figura 20: Aspecto del producto final F5 y su envase.....	61
Figura 21: Tamaño de gota	62
Figura 22: Cromatograma aceite esencial naranja	63
Figura 23: Cromatograma aceite esencial canela.....	64
Figura 24: Siembra de agotamiento por estrías para EH	66
Figura 25: Caja para conteo en la suspensión de trabajo de EH	67
Figura 26: Resultados para CA replica 2 de la fórmula F1	73
Figura 27: Esquema del orden de siembra para las diluciones 1-10, control negativo (CN) y control positivo (CP)	74
Figura 28: Ejemplo de resultados para EH	74
Figura 29: Ejemplo de resultados para SA.....	75
Figura 30: Ejemplo de resultados para PSA.....	75

Figura 31: Ejemplo de resultados para CA	76
Figura 32: Log ₁₀ para recuentos en mano derecha.....	84
Figura 33: Log ₁₀ para recuentos en mano izquierda	85
Figura 34: Reducción de mo en Log ₁₀ para mano derecha.....	86
Figura 35: Reducción de mo en Log ₁₀ para mano izquierda	87
Figura 36: Reducción de microorganismos promedio para 7 sujetos (escala logarítmica)	89
Figura 37: Resultados línea base 3, sujeto 4, mano derecha.	90
Figura 38: Resultados control, sujeto 4, mano derecha.....	91
Figura 39: Resultado F5 1, sujeto 4, mano derecha.	91
Figura 40: Resultados F5 2, sujeto 4, mano derecha.....	92
Figura 41: Siembra 100µL jabón F5 y control.....	92
Figura 42: Siembra 100µL suero de muestreo y agua potable.....	93

Lista de tablas

Tabla 1: Diseño experimental de Taguchi y Shainin	31
Tabla 2: Porcentaje de aceites esenciales en cada ensayo	32
Tabla 3: Fórmula inicial para ensayos organolépticos.....	32
Tabla 4: Proceso de fabricación.....	33
Tabla 5: Fórmula final del producto.....	35
Tabla 6: Proceso de fabricación.....	35
Tabla 7: Composición de cada formulación evaluada <i>in vitro</i>	37
Tabla 8: Cronograma de ensayos <i>in vivo</i>	42
Tabla 9: Composición suero de muestreo.....	43
Tabla 10: Datos para la evaluación organoléptica de las formulaciones E1 a E8. (AS: Aspecto; G: Generación de espuma; F: Facilidad de lavado; S: Suavidad luego del lavado)	44
Tabla 11: Datos para la evaluación física de las formulaciones E1 a E8.....	45
Tabla 12: Sumatorias para pH.	50
Tabla 13: Sumatorias para viscosidad. (cps)	51
Tabla 14: Sumatorias para aspecto.	51
Tabla 15: Sumatorias para generación de espuma.....	51
Tabla 16: Sumatorias para facilidad de lavado.....	51
Tabla 17: Sumatorias para suavidad luego de lavado.....	52
Tabla 18: Resumen de resultados	52
Tabla 19: Costo de los aceites esenciales en el producto.....	55
Tabla 20: Variación de % de AE en cada jabón espumoso evaluado.....	56
Tabla 21: Calificación obtenida para aspecto.....	57
Tabla 22: Conteo de las suspensiones de trabajo para los inóculos	67
Tabla 23: Resultados <i>in vitro</i> de F1, F2, F3, F4, F5, F5SP	69
Tabla 24: Resultados <i>in vitro</i> de F6, F7, F8, B1, B2, B3.....	69
Tabla 25: Resultados de la dilución en donde empieza a haber crecimiento	70
Tabla 26: Tabla de resultados para ensayos <i>in vivo</i> (UFC).....	77
Tabla 27: Numero de microorganismos totales recuperados por mano	80
Tabla 28: Log ₁₀ de los datos mostrados anteriormente	81
Tabla 29: Datos con el promedio de línea base	82
Tabla 30: Reducción con respecto a la línea base.....	83
Tabla 31: componentes de la fórmula final con su respectiva nomenclatura INCI y funcionalidad.	94

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AE</i>	Aceite esencial
<i>mo</i>	Microorganismo
<i>CA</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>EH</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>SA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>PSA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>IN</i>	Incontables
<i>MIC</i>	Concentración mínima inhibitoria
<i>MBC</i>	Concentración mínima bactericida
<i>UFC</i>	Unidades formadoras de colonias
<i>S</i>	Desviación estándar
\bar{X}	Promedio
<i>YM</i>	Yeast y malta.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la incorporación de aceites esenciales como ingredientes cosméticos en la actividad antimicrobiana de una formulación base de jabón líquido para manos.

Objetivos específicos

- Caracterizar y seleccionar la formulación de mejor desempeño de acuerdo con sus propiedades físicas y organolépticas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las formulaciones propuestas.
- Comprobar la actividad antimicrobiana de la formulación seleccionada a través del desafío del producto en voluntarios sanos.

Introducción

Las manos pueden llegar a tener microorganismos (mo) patógenos, ya que están en constante contacto con diferentes objetos e incluso con fluidos corporales. La higiene de manos es una de las formas más efectivas de prevenir enfermedades infecciosas. El lavado de manos reduce a casi la mitad la incidencia de diarrea, disminuye la tasa de infecciones respiratorias, minimiza enfermedades cutáneas, infecciones en los ojos e infecciones intestinales (AEMPPI, 2017). Cada año más de 3,5 millones de niños no llegan a su quinto año debido a infecciones que causan diarrea y neumonía, enfermedades las cuales pueden prevenirse con un adecuado lavado de manos. Adicionalmente, el lavado de manos es la intervención con mejor resultado para prevenir enfermedades infecciosas (*Guía Para Planificadores. Día Mundial Del Lavado de Manos 15 de Octubre.*, 2009).

Debido a que la higiene de manos constituye un factor muy importante en la prevención de enfermedades, se han venido utilizando los jabones antimicrobianos. Sin embargo, los ingredientes activos utilizados comúnmente han presentado algunos casos de resistencia a antimicrobianos y efectos secundarios no deseados (Alyson L & Jack, 2016); además, este tipo de compuestos puede perturbar la microbiota normal del cuerpo humano lo cual se ve reflejado en algunas enfermedades que influyen en la salud y bienestar.

Con respecto a la resistencia antimicrobiana, un informe demuestra que la exposición prolongada al triclosan produjo resistencia, adicionalmente un estudio realizado en el Reino Unido en el 2016 demostró que la exposición a triclosan se asoció con un alto riesgo de desarrollar resistencia antimicrobiana, describe que la resistencia a biguanidinas también está ampliamente reportada y menciona algunos informes donde se reporta resistencia a agentes alquilantes y oxidantes (Wesgate et al., 2016).

Adicionalmente se ha encontrado que algunos de los ingredientes activos actualmente utilizados pasan a circulación sistémica, lo cual no es lo esperado en un producto cosmético. Por ejemplo, en un estudio realizado en el 2008, el triclosan, que se encuentra en aproximadamente el 75% de los jabones antimicrobianos, se encontró en el 75% de muestras de orina, lo anterior genera una preocupación sobre el uso de compuestos como éste en productos cosméticos, ya que la presencia de este tipo de sustancias en orina demuestra que pueden penetrar hasta llegar a vía sistémica. También es importante tener en cuenta el impacto ambiental que se genera por la presencia de estas sustancias en el medio ambiente, como resultado de los desechos producidos luego del uso de productos que contiene estos compuestos (Alyson L & Jack, 2016).

Debido a los diferentes inconvenientes expuestos anteriormente de los ingredientes activos utilizados actualmente en las formulaciones antimicrobianas, se cree que el uso de ingredientes activos naturales como lo son los aceites esenciales pueden ser una alternativa muy interesante para diseñar formulaciones antimicrobianas.

Los aceites esenciales son un sistema multicomponente, el cual está formado por diversos compuestos presentes en diferentes proporciones, que ha demostrado actividad antimicrobiana, estudios *in vitro* han demostrado actividad contra diferentes bacterias. Dicha actividad puede verse asociada a algunos compuestos presentes en los aceites esenciales, un gran número de estos componentes han sido identificados como los responsables de dicha actividad antimicrobiana; igualmente se puede atribuir la actividad a la mezcla particular de cada aceite esencial (Burt, 2004).

Se realiza una consulta sobre trabajos recientes realizados basados en el mismo tópico, jabones antibacteriales con aceites esenciales, lo anterior para hacer una breve revisión del estado del arte, se encuentra un trabajo en donde se evalúa la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* de un jabón líquido antibacterial con extracto de hoja de apio, en dicho trabajo se encuentra que efectivamente el jabón presenta actividad antibacteriana en concentraciones del 5%, 10% y 15%, siendo 10% la concentración más eficaz, las pruebas se realizaron con el método de difusión en agar, evaluando el diámetro de la zona de inhibición. (Idawati, Suhada, Asri, & Arini, 2023). Se encuentra otro trabajo en donde se evalúa la eficacia de un jabón antibacteriano con aceite esencial de naranja dulce y hojas de albahaca, dicho trabajo también evalúa la actividad por medio de difusión en disco, midiendo el diámetro de la zona de inhibición, se determina la actividad frente a

Staphylococcus aureus y se encontró que todas las concentraciones (3%, 6% y 9%) tuvieron fuerte inhibición frente a dicho microorganismo. (Kenanga & Saraswati, 2021). Finalmente se encuentra un trabajo en donde se evalúa la actividad contra *Staphylococcus epidermidis* de un jabón líquido que contiene aceite esencial de citronela, canela y naranja, dicho trabajo también evalúa la actividad por medio del diámetro de la zona de inhibición, en donde se concluye que las formulaciones tienen actividad contra el microorganismo evaluado. (Nafisah, Suhesti, & Albetia, 2022). De acuerdo a lo revisado de trabajos recientes similares al presente trabajo, se concluye que es una buena oportunidad para ampliar el conocimiento en cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana de un jabón líquido para manos utilizando como ingredientes aceites esenciales de naranja y canela, resaltando que se evalúan cuatro microorganismos y se complementa el estudio con la evaluación de la actividad *in vivo*.

Previo a este trabajo, se determinó que los aceites de clavo y canela presentan actividad contra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a una concentración de 2% (p/p); adicionalmente, se evaluaron las propiedades organolépticas de las formulaciones realizadas y el aceite más aceptado por su olor y aspecto fue el de clavo (Osorio Fortich et al., 2017). Se ha demostrado que el aceite esencial de *Callistemon viminalis* tiene propiedades antimicrobianas (Ernawita, 2013) (Pires et al., 2013) (Siddique et al., 2017) (Gomber & Saxena, 2007) (Saxena & Gomber, 2006). Se tiene evidencia de que el aceite esencial de naranja también tiene propiedades antimicrobianas. (Juárez et al., 2010).

Dando continuidad al trabajo mencionado anteriormente, el propósito del presente estudio fue seleccionar la mejor formulación para el desarrollo de un jabón líquido para manos, utilizando como ingrediente activo antimicrobiano aceites esenciales. Se evaluaron los aceites esenciales de las especies *Cinnamomum verum*, *Eugenia caryophyllata*, *Callistemon viminalis* y *Citrus sinensis*.

Debido al auge en estudios sobre compuestos naturales, dichos productos son cada vez más utilizados en cosméticos y han presentado una importante actividad antimicrobiana (Ait-Ouazzou et al., 2011). Adicionalmente con el fin de comprobar los resultados *in vitro* y avanzar en la evaluación de la acción antimicrobiana de la formulación, se realizó ensayo en voluntarios sanos en el cual se evaluó la actividad antimicrobiana del jabón en el lavado de manos cotidiano.

El presente trabajo tuvo como objetivo general “Evaluar el efecto de la incorporación de aceites esenciales como ingredientes cosméticos en la actividad antimicrobiana de una formulación base de jabón líquido para manos”. Para cumplir el objetivo anteriormente expuesto, lo primero que se llevó a cabo fue ejecutar el primer objetivo específico “Caracterizar y seleccionar la formulación de mejor desempeño de acuerdo con sus propiedades físicas y organolépticas”. Para el cumplimiento de dicho objetivo se evaluaron características físicas como como pH y viscosidad; y características organolépticas como aspecto, generación de espuma, facilidad de lavado y suavidad luego del lavado. Lo anterior se realizó por medio de un diseño experimental de Taguchi y Shainin, evaluando el impacto de la presencia o ausencia de los aceites esenciales de clavo, canela y callistemon. Los aspectos organolépticos se evaluaron en un panel de 8 personas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (ver capítulo de resultados) se decide no utilizar callistemon en la fórmula final. Posteriormente se decide realizar el jabón microemulsificando los aceites esenciales, con el fin de presentarlo en un envase con válvula espumadora. Lo anterior para una mejor presentación del producto ya que el uso de este tipo de válvulas genera un mayor agrado para el usuario final. Adicional a que es una forma cosmética más estable para conservar los aceites esenciales en un sistema heterodisperso.

Ya que no se utilizó callistemon para la fórmula final, se toma la decisión de evaluar el aceite esencial de naranja, escogido por su facilidad de adquisición, sus agradables características organolépticas, su producción continua lo que conlleva a que su costo sea totalmente viable para tener acceso a este y finalmente que es un aceite que se obtiene de las cascaras de naranja, aprovechando así los desechos que producen del consumo de esta.

Para cumplir con el segundo objetivo específico “Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las formulaciones propuestas”, se evaluaron formulaciones variando las proporciones de aceites esenciales de canela y naranja, adicional a los correspondientes blancos, cada fórmula se evaluó por triplicado sobre *Enterococcus hirae* ATCC10541, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC1542 y *Candida albicans* ATCC10231. Posteriormente se escogió la formulación de mejor desempeño, la cual fue la utilizada para realizar la evaluación *in vivo*.

Para cumplir con el tercer objetivo específico “Comprobar la actividad antimicrobiana de la formulación seleccionada a través del desafío del producto en voluntarios sanos”, se realizó un ensayo con 7 sujetos seleccionados de acuerdo con el protocolo de consentimiento informado. Se hizo una determinación de línea base (microorganismos presentes en las manos sin lavar), se ejecutó el conteo de microorganismos luego del lavado de manos con una formulación control (sin aceites esenciales) y finalmente se determinaron la cantidad de microorganismos luego del lavado de manos con la fórmula escogida con aceite esencial en el primer y quinto día de su uso continuo (uso de 3 veces por día).

El presente trabajo presenta un avance en el uso de antimicrobianos alternativos para formas cosméticas como lo es un jabón para manos.

1. Marco Teórico

Es importante aclarar los siguientes términos, los cuales se deben tener claros para el presente trabajo:

-Antimicrobiano: “Sustancia química que a bajas concentraciones actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento” (Scientific Committees, 2023). “Molécula natural, sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias virus u hongos” (V. Seija, 2006)

-Antibiótico: “Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo”. (V. Seija, 2006)

-Antiséptico: “Es una sustancia que inhibe el crecimiento o destruye microorganismos sobre tejido vivo.” (BILBAO, 2009). “los antisépticos son sustancias antimicrobianas que se emplean de forma tópica en tejidos vivos para inhibir la reproducción o destruir los microorganismos”, un antimicrobiano ideal debe ser de amplio espectro, de acción rápida, no debe ser absorbido por piel ni mucosas, debe tener características organolépticas agradables (López et al., 2014).

-Desinfectante: “Compuesto que ejerce la misma acción (inhibir el crecimiento o destruir microorganismos) sobre superficies y objetos inanimados.” (BILBAO, 2009)

Para el presente trabajo, es de aclarar que se trata de un producto cosmético, por lo cual no clasificaría como antiséptico, en las normas farmacológicas colombianas se encuentra la categoría 13.1.6.0.N10 Antisépticos y desinfectantes, (MINSALUD, 2023) dichas normas enlistan los principios activos que pueden usarse como medicamentos, por lo cual el presente trabajo desarrolla un producto que NO clasificaría como antiséptico, ya que NO es un medicamento.

El presente trabajo desarrolla un producto cosmético tipo jabón líquido para manos al cual se le evalúa su actividad antimicrobiana, es decir, su capacidad de eliminar o inhibir el

crecimiento de microorganismos tales como bacterias o levaduras (para el presente trabajo), en caso de posteriormente querer llevar el producto a ser comercializado se recomienda tratarlo como cosmético, cuya definición es: “Un producto cosmético es toda sustancia o formulación de aplicación local a ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlos en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales.” (INVIMA, Cosméticos, 2023). De igual forma se recomendaría revisar su etiquetado como jabón antibacterial de uso cosmético, de acuerdo a las indicaciones dadas por la entidad regulatoria (INVIMA, Recomendaciones para el uso de jabones antibacteriales de uso cosmético, 2023).

1.1 Agentes antimicrobianos

Dentro de los compuestos utilizados habitualmente como antimicrobianos se pueden encontrar:

Compuestos alcohólicos: son compuestos de amplio espectro, activos frente a hongos, bacterias y virus, pero no frente a esporas. Se utilizan como solventes para productos antimicrobianos. Su mecanismo de acción se basa en la destrucción de la membrana celular y la desnaturalización de proteínas. Son antimicrobianos de acción inmediata, pero son irritantes. Son compuestos volátiles e inflamables, se utiliza generalmente etanol o alcohol isopropílico (López et al., 2014) (OMS, 2004).

Biguanidinas: el compuesto más usado es la clorhexidina, actúa sobre la membrana plasmática de los microorganismos, alterando la permeabilidad. A concentraciones altas precipita proteínas y ácidos nucleicos (Arévalo et al., n.d.). Tiene actividad frente a bacterias, levaduras, mohos y algunos virus. No se ha evidenciado toxicidad por absorción. Sin embargo, hay evidencia de toxicidad de este compuesto evaluado *in vitro* (Cabral & Hernández, 2016). La clorhexidina tiene un amplio espectro, es eficaz contra bacterias gram positivas y gram negativas, sin embargo, no es activa sobre mico bacterias y esporas bacterianas, en ocasiones puede llegar a ser irritante (OMS, 2004).

Compuestos halogenados: son compuestos no metálicos, que pertenecen al grupo VII de la tabla periódica, el cloro, fue uno de los primeros antimicrobianos utilizados. Sin embargo, hoy en día se utiliza el yodo. Dichos compuestos precipitan proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos alterando las membranas celulares. El yodo tiene actividad frente a bacterias, hongos, esporas y virus (López et al., 2014). La povidona yodada es eficaz sobre los microorganismos mencionados anteriormente, dicha solución en contacto con la piel libera el yodo responsable de su actividad, sin embargo, no es recomendable su uso en pacientes con alteración en la tiroides, neonatos y lactantes. (OMS, 2004).

Oxidantes: dentro de estos compuestos los más utilizados son el peróxido de hidrogeno y permanganato de potasio. Su mecanismo de acción se debe a sus efectos oxidantes, al producir radicales libres, estos atacan compuestos fundamentales de los microorganismos produciendo su actividad antimicrobiana (López et al., 2014).

Otros compuestos también se han utilizado como antimicrobianos, tales como compuestos de amonio cuaternario, algunos ácidos, aldehídos y fenoles. Sin embargo, su uso ya es muy restringido debido a su toxicidad y la irritación que pueden producir (López et al., 2014).

Es importante considerar que algunos de los ingredientes activos utilizados actualmente han sido restringidos debido a los diferentes efectos secundarios que se han reportado, un claro ejemplo es el triclosan, el cual es el ingrediente activo más utilizado en formulaciones antimicrobianas. Según el reglamento 358 de 2014 de la Comisión Europea, se considera que el uso del triclosan debe ser restringido al 0,2% o 0,3% para productos cosméticos dependiendo de su exposición, ya que un uso en mayor concentración puede suponer un riesgo para la salud; además se prohíbe el uso de isopropilparabeno, isobutilparabeno, fenilparabeno, bencilparabeno y pentilparabeno por falta de información sobre la seguridad del uso de estos compuestos (Diario Oficial de la Unión Europea, 2014).

Adicionalmente el 02 de septiembre de 2016 la FDA prohibió la comercialización de productos para el lavado antimicrobiano que contengan triclosan o triclocarban. La agencia sugiere que la exposición a largo plazo a ciertos ingredientes activos como los anteriormente mencionados pueden presentar riesgos para la salud como efectos hormonales o resistencia antimicrobiana. La agencia exige estudios que comprueben la seguridad y eficacia del uso de productos antimicrobianos que demuestren superioridad al uso de jabones convencionales. Adicionalmente se aplazó la reglamentación (hasta el 2019) para cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloroxilenol (FDA, 2016).

Debido a todas las limitaciones expuestas anteriormente, como las restricciones de uso y concentraciones, resistencias presentadas y efectos secundarios no deseados que se han presentado con los antimicrobianos utilizados comúnmente, se propone evaluar los aceites esenciales como una alternativa para combatir microorganismos que puedan afectar la salud, utilizándolos como ingredientes activos antimicrobianos en un jabón líquido para manos, el uso de aceites esenciales se propone como una interesante alternativa al observar que los ingredientes actualmente utilizados están presentando algunas limitantes como impacto ambiental, toxicidad, efectos adversos y en algunos casos resistencias.

1.2 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (AAEE) son una mezcla compleja de sustancias orgánicas, líquidos, de escasa solubilidad en agua, volátiles y complejos; son los responsables de las fragancias de las plantas, se extraen de varias partes de las ellas tales como tallos, flores, raíces, semillas, cortezas, hojas o frutas; poseen diferentes acciones farmacológicas dependiendo de los metabolitos presentes en su composición. Entre las acciones farmacológicas que tienen los diferentes aceites esenciales se encuentra la acción antimicrobiana, diurético, antiespasmódico, sedante, digestivo, antiinflamatorio, entre otros (Transito, 2004).

Bajo condiciones ambientales, son líquidos con mayor densidad que el agua, contienen compuestos que son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en disolventes polares, son aceptados como sustancias seguras (Gras). (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012)

Los aceites esenciales se extraen por medio de diferentes métodos, como prensado, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles o con fluidos supercríticos. (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012). El método más común es la destilación con vapor de agua o destilación por arrastre con vapor, el cual consiste en hacer pasar un flujo de vapor a través de la materia prima, de forma que arrastra consigo los aceites esenciales, los cuales posteriormente se enfrían y se condensan dando como resultado el destilado líquido formado por dos fases inmiscibles entre sí, que luego se separan por decantación debido a la diferencia de densidades entre las dos fases. (Villaverde, 2018)

Los mecanismos de acción por los cuales algunos aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana son variados, debido a que son mezclas complejas de varios componentes, los cuales pueden tener mecanismos diversos para dar lugar a su actividad, por ejemplo, la membrana celular puede verse afectada por terpenos, el carácter hidrofóbico de los aceites puede conducir a incorporarse en membranas y lípidos afectando la permeabilidad o puede interactuar con proteínas que afecten la viabilidad celular (Díaz & Galvis, 2014).

En el presente trabajo se evaluaron los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), clavo (*Eugenia caryophyllata*), callistemon (*Callistemon viminalis*) y naranja (*Citrus sinensis*).

El aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*) se trata de un líquido amarillo poco soluble en agua y soluble en alcohol y ácido acético glacial, es extraído de la corteza y las hojas del árbol de canelo. Esta especie es de la familia Lauraceae, del género *Cinnamomum* proveniente de Sri Lanka, son árboles perennifolios de hasta 10 metros de altura. El aceite esencial contiene en su mayoría aldehído cinámico y eugenol. Se le atribuye su propiedad antimicrobiana y antifúngica, posiblemente por el aumento de permeabilidad de las membranas y la salida de iones de dicha membrana. Esta actividad puede atribuirse a la mezcla de sus componentes posiblemente terpenos, fenólicos y flavonoides (Barrientos & Jorge, 2017).

El aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllata*) pertenece a la familia de las mirtáceas, es un árbol o arbustos de hasta 20 m de altura, la parte utilizada es el botón de la flor. Este contiene un aceite esencial formado por mono terpenos, componentes bencílicos como el acetato de eugenol, entre otros como el limoneno, el *m*-eugenol y el cariofileno. El principal componente de su aceite esencial es el eugenol el cual se ha comprobado que posee propiedades antimicrobianas (Osorio Fortich et al., 2017).

El aceite esencial de callistemon (*Callistemon viminalis*) proviene de arbustos de la familia Myrtaceae nativo de Australia con propiedades antidiabético, antimicrobiano, antiinflamatorio, antitrombótico y larvicida. Dentro de sus principales componentes químicos se ha encontrado presencia de flavonoides, terpenos y derivados del floriglucinol, adicionalmente se logró elucidar un compuesto denominado callistemenonone A al cual se le atribuye parte de la actividad antimicrobiana (Xiang et al., 2017).

El aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) proviene generalmente de las cascarras del fruto del árbol de naranja, dicho aceite se usa como aromatizante en diferentes industrias. Es uno de los ingredientes básicos en las industrias de alimentos, perfumería, entre otros. La naranja pertenece a una familia amplia, Rutáceas, crecen en clima cálido y templado. De la familia las plantas más conocidas son los cítricos, dentro de los cuales se encuentra la naranja común, la toronja, el limón, la mandarina, la lima, el pomelo, entre otros. El aceite esencial de naranja contiene en su mayoría *d*-limoneno y menor proporción una gran variedad de terpenos. Es de resaltar que al utilizar las cascarras del fruto, se está aprovechando en residuo que generalmente queda posterior al uso de la naranja. (Rueda et al., 2007). El aceite esencial de naranja se compone principalmente de terpenos como el limoneno que está en mayor proporción, sin embargo, también puede contener aldehídos como octanal o decanal, también alcoholes como el linalool y ésteres como acetato de nerilo y acetato de octilo. Los terpenos se derivan del ácido mevalónico y se caracterizan por tener sabores y aromas agradables. (Cerna & Rorres, 2020). El aceite esencial de naranja también ha presentado actividad antimicrobiana (Castañeda, et al., 2018) (Juárez et al., 2010).

1.3 Microemulsiones

La forma cosmética escogida para elaborar el jabón para manos fue una microemulsión. Dentro de las ventajas por la cual fue escogida es que son un sistema termodinámicamente

estable compuesto por la fase acuosa, fase oleosa y por lo menos un tensoactivo, dicho sistema se caracteriza por tener un tamaño de gota menor a 100nm, lo cual hace que a la vista sea totalmente transparente, por tanto, es muy agradable su aspecto. Adicionalmente se forma espontáneamente y necesita de una alta concentración de tensoactivo para que pueda ser formada, lo cual no es un inconveniente, ya que al ser un jabón para manos la cantidad de tensoactivo utilizada es alta. Finalmente, su producción no requiere calor ni maquinaria compleja, de manera que hace que la producción a escala industrial no represente mayor inconveniente. (Fernández, 2006)

Las microemulsiones son definidas como una dispersión hecha de agua, aceite y surfactante, las cuales son isotrópicas y termodinámicamente estables, son sistemas con un diámetro de gota entre 1 y 100nm. Cuando la tensión interfacial entre dos fases inmiscibles se reduce a cero, se produce espontáneamente las microemulsiones y la energía libre negativa formada hace que el sistema sea termodinámicamente estable.

Dentro de los métodos de fabricación de microemulsiones se adoptó el método de titulación de fases, en donde la fase oleosa se mezcla con los tensoactivos y posteriormente se adiciona gota a gota el agua con agitación constante. Entre las ventajas de las microemulsiones se encuentra que son fáciles de preparar por su formación espontánea, son sistemas termodinámicamente estables, por lo tanto, su vida útil se puede prolongar, además de su aspecto translucido que es agradable; entre las desventajas se encuentra que se debe usar una cantidad alta de surfactante y cosurfactante lo que aumenta el costo, lo cual no supone un problema, ya que, al ser un jabón estos son de sus componentes principales. (Nemichand & Laxman, 2017)

A pesar de que las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables, hay algunos factores que pueden alterar su estabilidad, como por ejemplo la temperatura, ya que puede cambiar la fuerza intermolecular y hacer que las fases se transformen en agregados y se inestabilice, otro factor es el efecto de adición de sal, debido a que puede cambiar la tensión interfacial debido a que el ion de la sal puede neutralizar parte de la carga del grupo hidrófilo haciendo que se inestabilice el sistema. (Zhang et al, 2023). Lo anterior indica que, a pesar de ser sistemas estables, es interesante mirar su

comportamiento a lo largo del tiempo, observando que no haya separación de fases y evaluando su tamaño de gota y distribución.

1.4 Lavado de manos y microorganismos utilizados

La piel constituye un entorno ácido y limitado de nutrientes para la supervivencia de microorganismos. Sin embargo, allí pueden residir microorganismos que se han adaptado a este microambiente; en las manos se alojan dos tipos de flora, flora residente y flora transitoria. La flora residente son microorganismos que se encuentran permanentemente en la piel, no son eliminados fácilmente, representan 10-20% de la población y no suelen causar enfermedades a menos de que entren en contacto con partes del cuerpo estériles. Dichos microorganismos son beneficiosos para la piel ya que constituyen la flora normal.

La flora transitoria son microorganismos que colonizan las capas superiores de la piel y son adquiridos por contacto directo con objetos, otros pacientes, alimentos, animales, entre otros. Por lo general son patogénicos. Entre esos se encuentra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Rosaura, n.d.).

El lavado de manos es efectivo para remover dicha microbiota transitoria. Sin embargo, algunos microorganismos que residen en capas más profundas de la piel no son removidos con el lavado y es necesario adicionar agentes bacteriostáticos o bactericidas para eliminar o inhibir el crecimiento de dichos microorganismos. El lavado de manos se define como un rápido y vigoroso frotamiento de las manos seguido a la exposición de agua en el cual se emplea un jabón para remover la suciedad. Este permite que los microorganismos sean arrastrados.

Adicionalmente, cuando se emplean sustancias antimicrobianas, tiene la ventaja de que el producto mata o inhibe el crecimiento de dichos microorganismos (Berganza, 2003).

Finalmente, es importante mencionar que la resistencia a los antimicrobianos es un tema que ha tomado importancia durante los últimos años, ya que pone en peligro la eficacia del tratamiento de infecciones, la resistencia es cuando los microorganismos sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos por lo cual los medicamentos se vuelven ineficaces

y las infecciones se propagan. La resistencia genera un alto impacto en el aumento de la morbimortalidad, lo que se refleja en aumento de costos en salud. Los microorganismos resistentes se pueden encontrar en personas, animales, alimentos y medio ambiente, por lo cual se pueden propagar rápidamente si no hay condiciones adecuadas sanitarias. Para poder mitigar este problema se recomienda actuar en prescripción adecuada, no auto medicarse, educación comunitaria y vigilancia de dichos casos de resistencia. Adicional que el lavado de manos puede disminuir considerablemente dicho problema, ya que la higiene contribuye a que no se propaguen dichos microorganismos. (Organización Panamericana de la Salud, 2023)

La resistencia puede ser natural o adquirida, la resistencia natural es constante de las cepas y de mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis. La resistencia adquirida es una característica de una cepa que naturalmente es sensible a un antibiótico, pero ha sido genéticamente por mutación o por adquisición de genes. La resistencia se puede dividir en tres mecanismos, el primero consiste en la inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química, en donde el microorganismo produce enzimas las cuales destruyen la estructura química, como por ejemplo, las betalactamasas; el segundo mecanismo se trata de la alteración del sitio blanco del antibiótico, en el cual los microorganismos modifican algunos sitios específicos de la célula, como por ejemplo la pared celular, la membrana, subunidades 50S o 30S de los ribosomas, entre otros; y el tercer mecanismo se trata de la alteración en las barreras de permeabilidad, en donde los cambios se dan en los receptores bacterianos específicos para antimicrobianos o por alteraciones en la envoltura de la célula bacteriana que influye en la permeabilidad y en la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana o también se puede presentar la expresión de bombas de eflujo las cuales expulsan el antimicrobiano fuera de la célula.

Lo anterior sensibiliza en el hecho de que debe haber más educación con respecto al uso irracional de antibióticos, adicional de la continua investigación para encontrar más sustancias antimicrobianas y su uso racional para tratar de disminuir el riesgo de aparición de más cepas resistentes. (Perez & Robles, 2013).

A continuación, se describen los microorganismos utilizados para evaluar la capacidad antimicrobiana del producto en el presente trabajo:

Enterococcus hirae es una bacteria perteneciente al género *Enterococcus*, los cuales son cocos gram positivos, descrito como patógeno zoonótico (Vallejo; Parada; Marguet, 2019). Hace parte de la flora normal del tracto intestinal del humano. También puede ser encontrado en pequeñas cantidades en la piel, mucosas orales y secreciones vaginales. Es una bacteria que causa múltiples infecciones, como urinaria, endocarditis y septicemias, es un microorganismo oportunista y últimamente ha presentado resistencia a varios antibióticos comunes. (Bilek et al., 2020)

Staphylococcus aureus está formado por cocos gram positivos agrupados como células únicas, en pares, en tétradas, cadenas cortas o en racimos; son bacterias no móviles, no tienen capsula, anaerobias facultativas. El género *Staphylococcus* tiene 32 especies de las cuales la mitad se encuentran en los humanos, haciendo parte de la microflora normal de la piel y mucosas. A veces son patógenos cuando existe un sistema inmune comprometido. (Cervantes et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa, aerobia facultativa, no esporulativa, con motilidad por flagelo. Es un patógeno oportunista, tiene forma de bastón, tiene gran capacidad para permanecer en el ambiente, por lo cual ha sido considerado un importante microorganismo responsable de las infecciones nosocomiales, es responsable de infecciones en vías urinarias, respiratorias y sepsis especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Es importante mencionar que es un microorganismo multiresistente en el entorno intrahospitalario. (Paz et al., 2019)

Candida albicans es una levadura que reside en las membranas mucosas vaginales y orales, adicionalmente en el tracto gastrointestinal humano. Es patógena en pacientes inmunocomprometidos y en personas sanas es responsable de la candidiasis vaginal y la candidiasis oral. Es de resaltar que las tasas de mortalidad y morbilidad de estas infecciones han incrementado durante las dos últimas décadas. (Panizo & Reviákina, 2001)

Un estudio previo fue realizado, en el cual se evaluaron los aceites de clavo y canela y se encontró que la concentración adecuada para una actividad contra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es del 2%, adicionalmente, el aceite más aceptado por su olor y aspecto fue el de clavo (Osorio Fortich et al., 2017). Se ha demostrado que el aceite esencial de *Callistemon viminalis* tiene propiedades antimicrobianas (Ernawita, 2013) (Pires et al., 2013) (Siddique et al., 2017) (Saxena & Gomber, 2006) (Gomber & Saxena, 2007). Adicionalmente, se tiene evidencia de que el aceite esencial de naranja también tiene propiedades antimicrobianas. (Juárez et al., 2010).

2. Materiales y Métodos

2.1 Evaluación de características físicas y organolépticas

Se realizó el diseño experimental para elaborar los ensayos de las formulaciones con la inclusión de cada uno de los aceites esenciales. Se revisaron características organolépticas como aspecto (color-olor), generación de espuma, facilidad de lavado y suavidad luego del lavado y características físicas como pH y viscosidad.

Para poder evaluar el impacto en los aspectos físicos y organolépticos por la inclusión de los aceites esenciales de clavo (A), canela (B) y aceite esencial de callistemon (C), se prepararon 8 formulaciones variando los porcentajes de cada uno de los aceites, según el diseño experimental de Taguchi y Shainin (tabla 1) (Matiz, 2018), por medio del cual se puede evaluar el impacto de la presencia o ausencia de las variables (A,B,C) en los parámetros evaluados (Aspecto, generación de espuma, facilidad de lavado, suavidad luego del lavado, pH y viscosidad). Cada uno de los ensayos tiene la misma formulación a excepción del aceite esencial a utilizar los cuales en total siempre sumarán 3% de la fórmula, tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 1: Diseño experimental de Taguchi y Shainin

		Taguchi y Shainin				
		A-		A+		
		B-	B+	B-	B+	
C-	E1				E5	
			E3			E7
C+			E4			E8
	E2				E6	

Tabla 2: Porcentaje de aceites esenciales en cada ensayo

Ensayo	A (%)	B (%)	C (%)
E1	0	0	0
E2	0	0	3
E3	0	3	0
E4	0	1,5	1,5
E5	3	0	0
E6	1,5	0	1,5
E7	1,5	1,5	0
E8	1	1	1

El proceso de fabricación y fórmula fue establecido previamente por el laboratorio Investigaciones en Tecnología Farmacéutica B, coordinado por el profesor German Eduardo Matiz Melo, dicha investigación se realizó durante la coyuntura de pandemia, en donde se realizó una fórmula base para jabón para manos. A continuación, se muestra la fórmula y proceso de fabricación que se siguieron para los ensayos realizados.

Tabla 3: Fórmula inicial para ensayos organolépticos

Fórmula		
#	MATERIAL	%
1	AGUA PURIFICADA	10,00
2	TEXAPON 40	45,00
3	GLICERINA	3,00
4	ACEITE ESENCIAL	3,00
5	CLORURO DE SODIO	1,90
6	AGUA PURIFICADA	7,15
7	COCOAMIDA DEA	1,00
8	EUPERLAN*	10,00
9	EUXYL K100	0,10
10	AGUA PURIFICADA	18,85

*Dispersión de agentes nacarados y sulfato de éter de alcohol graso, usado para preparaciones cosméticas. Euperlan PK 771 – BASF.

Tabla 4: Proceso de fabricación

Protocolo de elaboración de Jabón líquido para manos.
Dispensar agua (1) y transferir a recipiente principal.
Adicionar Texapon 40 (2) y agitar hasta disolver.
Adicionar glicerina (3) y agitar hasta disolver.
Adicionar el AE (4) y agitar hasta incorporar completamente.
Pre disolver en otro recipiente NaCl (5) en agua (6).
Adicionar solución de NaCl lentamente al recipiente principal con agitación lenta.
Adicionar Cocoamida DEA (7) y agitar lentamente hasta disolver, calentar si es necesario para acelerar la disolución del material.
Adicionar Euperlan (8) y agitar lentamente hasta disolver.
Adicionar Euxyl K100 (9) y agitar hasta disolver.
Llevar a peso con agua (10).

La evaluación de las características organolépticas fue realizada por medio de un panel de 8 personas previamente instruidas, quienes analizaron sensorialmente las formulaciones obtenidas. Antes de realizar la evaluación sensorial, se instruyó a las personas sobre la prueba y los conceptos, adicionalmente se suministró físicamente el consentimiento informado, el cual leyeron y firmaron (ver en anexos el soporte de los formatos). Posterior a esto se realizó la evaluación apreciando el aspecto (color-olor), generación de espuma, facilidad de lavado y suavidad luego del lavado. La forma de evaluar se realiza por medio de una escala lineal de 10cm, en donde la persona traza una línea vertical donde considera que es su apreciación y se cuantifica la respuesta midiendo la distancia desde el punto inicial hasta donde la persona ha colocado el trazo (ejemplo, izquierda difícil de lavar, derecha, fácil de lavar). La presentación de las muestras se realiza de modo monódico secuencial, es decir, cada persona tiene un orden diferente de presentación con el fin de eliminar el sesgo de la impresión de la primera muestra (Question Pro, 2023). Finalmente se hace la evaluación en dos sesiones con el fin de no saturar los sentidos, por lo cual se evalúan 4 formulaciones por persona y luego de dos horas se evalúan las otras 4 formulaciones. La evaluación se realizó con un panel de 8 personas por la disponibilidad de las mismas y según lo propuesto ante el comité de ética.

La determinación de la viscosidad fue realizada utilizando un viscosímetro de Brookfield. Se puso la muestra en un beaker de capacidad adecuada y la viscosidad se determinó manteniendo una temperatura ambiente y seleccionando el spin y la velocidad adecuada para mantener una fuerza de torque de más del 60%. El equipo estaba debidamente calibrado. El pH se determinó empleando un pH-metro previamente calibrado, sin embargo, para algunos casos fue necesario ajustar el pH con ácido cítrico al 10% para obtener jabones de pH adecuados para la piel (entre 5 y 7).

Finalmente, los resultados fueron colocados en la tabla de Taguchi y Shainin, en donde, se suman las respuestas de las formulaciones de acuerdo con los grupos en los que están ubicados los jabones. El primer grupo no contiene A (A-) y el grupo dos contiene A (A+). Para el primer grupo se hace la suma total de las respuestas de los jabones donde A no está presente (A-). Para este ejercicio la suma de los 4 jabones del primer grupo da como resultado el valor de A-. De la misma manera se realiza la suma total de cada respuesta evaluada para cada una de las variables (A-,A+,B-,B+,C-,C+). Una vez realizadas las sumas, se escoge la presencia o ausencia de cada variable (A,B,C) basándose en el puntaje más alto a excepción del pH en donde se debe elegir el más bajo, por el pH de la piel (ácido). Finalmente, se realizó una tabla resumen de la ausencia o presencia de las variables obtenidas en cada parámetro evaluado y con dicha tabla se tomó la decisión de escoger la combinación más viable de aceites esenciales. (Matiz, 2018)

Luego de escoger la combinación más viable enciales, se decide no utilizar callistemon ni clavo en la fórmula final, en el capítulo de resultados y discusión se discutirá las razones de dicha decisión. Como conclusión se evalúan aceites esenciales de canela y naranja para la evaluación de actividad antimicrobiana. Adicionalmente se decide formular el producto microemulsificando los aceites, con el fin de presentarlo en un envase con válvula espumadora. Lo anterior para una mejor presentación del producto ya que el uso de este tipo de válvulas genera un mayor agrado para el usuario final; adicional a que es una forma cosmética más estable para conservar los aceites esenciales en un sistema heterodisperso, ya que es un sistema termodinámicamente estable (Fernández, 2006), agregando el hecho que al ser transparente es muy agradable su aspecto y al formarse espontáneamente no necesita de calor ni maquinaria compleja, lo que hace que la producción a escala industrial no sea difícil. (Nemichand & Laxman, 2017)

La fórmula base mostrada en la tabla 3 se modificó para poder llegar al objetivo de microemulsificar los aceites esenciales, como primera medida se incluyó Tween 20 como cosolvente para emulsificar los aceites esenciales; con respecto a la formulación inicial usada para los ensayos sensoriales se elimina el uso de cloruro de sodio, ya que al ser un producto con válvula espumadora, no se necesita de una viscosidad alta, adicionando que es una ventaja no usar dicho material ya que puede llegar a inestabilizar el sistema (Zhang et al, 2023). Se elimina el uso de cocoamida DEA, con el fin de no tener que calentar durante el proceso de fabricación, lo que es una ventaja enorme al escalar el producto a nivel industrial. Se elimina el uso de Euperlan ya que al ser una microemulsión ya no vale la pena su inclusión. Finalmente, se aumenta el porcentaje de aceites esenciales a su máximo (5%) teniendo en cuenta los resultados de la evaluación antimicrobiana *in vitro*.

A continuación, se muestra la fórmula y proceso de fabricación final:

Tabla 5: Fórmula final del producto

Fórmula		
#	MATERIAL	%
1	ACEITES ESENCIALES	5,0
2	TWEEN 20	10,0
3	TEXAPON 40	30,0
4	AGUA PURIFICADA	52,0
5	EUXYL K100	0,1
6	GLICERINA	2,0
7	AGUA PURIFICADA	0,9

Tabla 6: Proceso de fabricación

Protocolo final de elaboración de Jabón líquido para manos.
Dispensar los aceites esenciales (1)
Adicionar Tween 20 (2) y agitar hasta completa homogenización.
Adicionar Texapon 40 (3) muy lentamente y con agitación constante hasta completa homogenización.
Adicionar Agua purificada (4) muy lentamente y con agitación constante hasta completa homogenización, al final de la adición se debe observar un sistema completamente transparente.
Adicionar Euxyl K100 (5) y agitar hasta completa homogenización.
Adicionar Glicerina (6) y agitar hasta completa homogenización.
Llevar a peso con Agua purificada (7).

Se determinó el tamaño de gota de la formulación final escogida de mejor desempeño empleando un equipo Z-sizer, equipo el cual se utiliza para medir el tamaño de gota por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica, dicha técnica consiste en la determinación del tamaño de partícula por medio del análisis de las fluctuaciones de intensidad de la luz que se obtienen debido al movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión que hacen que la luz se disperse en estas diferentes intensidades. (Malvern, 2023).

Finalmente se realiza un análisis por cromatografía de gases para los aceites esenciales utilizados en la fórmula escogida F5 (naranja y canela). El análisis se realiza en el Laboratorio de Aromas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Se empleó un cromatógrafo de gases 7890B (Agilent Technologies Inc. Wilmington, DE, USA) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5977, utilizando el software ChemStation (Rev. E01) con librería NIST (versión 2.2, NIST/EPA/NIH, 2014), empleando una columna polar DB-FFAP (30 m x 0,25mm d.i., 0,32 μ m), con helio como gas de arrastre (1.0 mL/min), modo splitless, con la temperatura programada así: 45 °C por 5 min, posterior una velocidad de calentamiento de 6 °C/min hasta 180°C y finalmente, se mantuvo la columna a 230 °C durante 20 min. Las muestras se diluyeron en una relación 1:10 con DCM destilado. La identificación de los compuestos se realizó por comparación con lo reportado en las bases de datos (Laboratorio de Aromas, 2022).

2.2 Evaluación actividad antimicrobiana *in vitro*

Para llevar a cabo la evaluación antimicrobiana *in vitro* se evaluaron 8 formulaciones variando las proporciones de aceites esenciales de canela y naranja, adicional a los correspondientes blancos (ver tabla 7), de la fórmula F1 a la F5 corresponde a diferentes variaciones entre los dos aceites con un porcentaje total de 5%, de la fórmula F6 a la F8 corresponde a diferentes variaciones entre los dos aceites con un porcentaje total de 3% (las formulaciones que no contenían canela no fueron evaluadas ya que el sistema microemulsificado solo con aceite de naranja solo no fueron estables, en la sección de discusión se amplía la información), el blanco 1 corresponde a la fórmula sin los aceites esenciales, el blanco 2 corresponde a la fórmula sin aceites esenciales ni preservante (Euxyl K100), el blanco 3 corresponde a la fórmula sin aceites esenciales y con el

preservante al doble de concentración (Euxyl K100 al 0,2%) y finalmente el ensayo F5SP corresponde a la fórmula F5 (escogida para evaluación en ensayos *in vivo*, aspecto discutido en la sección de resultados y discusión) sin preservante. Cada fórmula se evaluó por triplicado sobre *Enterococcus hirae* ATCC10541, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC1542 y *Candida albicans* ATCC10231. Se decide no utilizar callistemon en la fórmula final debido a los resultados obtenidos en los ensayos organolépticos y se descarta también el clavo debido a su alto costo. Lo anterior se detalla en los resultados y discusión de los mismos.

Tabla 7: Composición de cada formulación evaluada *in vitro*

Material	F1(%)	F2(%)	F3(%)	F4(%)	F5(%)	F6(%)	F7(%)	F8(%)	B1(%)	B2(%)	B3(%)	F5SP(%)
AE naranja	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	0,0	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	4,0
AE canela	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	3,0	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0
Tween 20	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Texapon 40	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Agua	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0
Euxyl K100	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0
Glicerina	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Agua	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	2,9	2,9	2,9	5,9	6,0	5,8	6,0

Para poder llevar a cabo la evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* lo primero que se realizó fue activar las cepas de referencia sembrando 50µL en 2mL de caldo YM (caldo de extracto de levadura y malta) dejando crecer durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a sembrar cada microorganismo mediante la técnica de agotamiento por estrías como se observa en la figura 1, dicha siembra se incubó durante 24 horas a 37°C. (Neuquen, 2021)

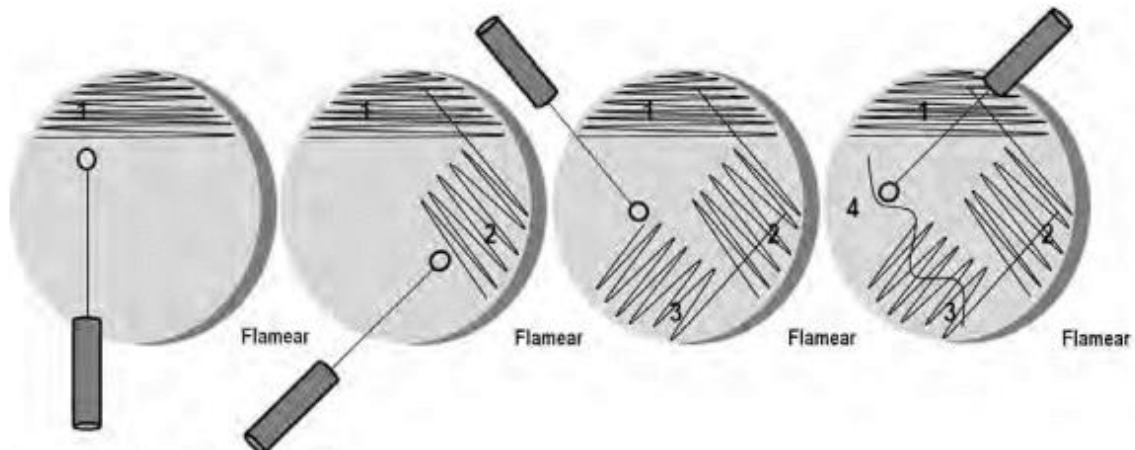


Figura 1: Siembra de agotamiento por estrías

Imagen tomada de Procedimientos de microbiología general de la dirección de bromatología de Neuquen. Junio 2021. Recuperado de <https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf>

Luego se tomó una colonia bien diferenciada del cultivo anterior y se realizó un cultivo masivo en agar YM, como se muestra en la figura 2, dicha siembra se incubó durante 48 horas a 37°C.

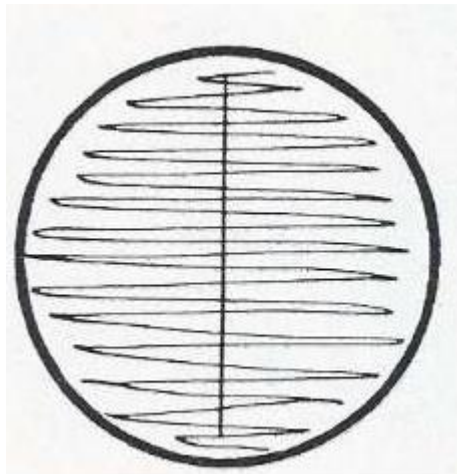


Figura 2: Siembra masiva.

Imagen tomada de página Web "Detrás de la consulta". Noviembre 2013. Recuperado de <http://detrasdelaconsulta.blogspot.com/2013/11/siembra-de-muestras.html>

Luego del cultivo masivo se realizó la cosecha de los microorganismos de la siguiente manera: (García & Uruburu, 2010)

1. Se adicionaron 6mL de caldo YM+glicerol (50:50) a la caja de Petri.
2. Con un asa de vidrio estéril se suspendió todo el contenido de la caja asegurándose de desprender todos los microorganismos y que quede una suspensión lo más homogénea posible.
3. Se adicionó dicha suspensión a un Erlenmeyer estéril con el fin de ajustar la densidad óptica a aproximadamente 25% de transmitancia utilizando un espectrofotómetro a 600nm. Se utilizó como blanco el caldo YM+glicerol (50:50).
4. Una vez ajustada la suspensión, se almacenaron los microorganismos en crioviales en el congelador.

Para poder utilizar las suspensiones preparadas anteriormente como inóculo en los ensayos, se realizó un conteo para cada microorganismo por triplicado en tres diluciones, con el fin de saber en qué concentración están los microorganismos, para dicho objetivo se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. De cada mo se prepararon diluciones.
2. Se sembraron tres muestras por cada dilución ($\times 10^{-6}$, $\times 10^{-7}$ y $\times 10^{-8}$), sembrando 10 μ L o 100 μ L según correspondiera la dilución en cajas Petri por el método de vertido en placa (Universidad Autónoma, 2023).
3. Se incubaron las muestras durante 24 horas a 35°C.
4. Se realizó el conteo de los microorganismos en cada muestra.

Una vez realizado el recuento de las suspensiones de trabajo de cada mo, se procedió a determinar la MIC de cada una de las formulaciones y blancos expuestos anteriormente, por medio de macrodilución en caldo (Malbrán, 2012). Para dicho ejercicio se realizaron 10 diluciones (1 en 2), como se explica a continuación, y finalmente por cada ensayo se hizo un control positivo y un control negativo. El control positivo constó de 1mL de inóculo más 1mL de caldo, incubado junto con los demás tubos a 35°C. El control negativo constó de 1mL de inóculo más 1mL de caldo, preservado en la nevera. Se realizaron tres replicas por cada uno de los microorganismos evaluando las 8 formulaciones, 3 blancos y la formulación escogida sin preservante. Se realizó un control adicional el cual no lleva inóculo, para verificar no crecimiento.

1. Se utilizaron tubos de ensayo (12 tubos por cada ensayo). En cada tubo se adicionó 1mL de caldo.
2. En el primer tubo de cada ensayo se adicionó 1mL de la formulación o blanco a evaluar, se homogenizó muy bien.
3. Se retiró 1mL del contenido del tubo 1 y se adicionó al tubo 2, se homogenizó muy bien. Se repitió este paso, tubo a tubo hasta llegar al tubo 10.
4. Una vez retirado 1mL del tubo 10, se desechó dicho mililitro.
5. En todos los tubos (12 tubos) se adicionó 1mL de inóculo previamente diluido hasta obtener una suspensión del orden de $\times 10^4$ microorganismos por mL. Finalmente, en cada tubo se tienen 2mL.
6. Se incubaron todos los tubos a 35°C por 24 horas, excepto los controles negativos que son almacenados en la nevera.
7. Pasado el tiempo de incubación se siembra de cada tubo 5µL en agar.
8. Se incuban los agares a 35°C por 24 horas, y se leen los resultados con el fin de verificar en cuales tubos hubo crecimiento y en cuales tubos hubo inhibición del crecimiento.

Todos los cultivos para *Candida albicans* se realizaron en caldo o agar extracto de malta, los cultivos para *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se realizaron en caldo o agar Müller Hinton, los cultivos iniciales para crecimiento masivo se realizaron en caldo o agar YM, los microorganismos se conservaron congelados en caldo YM mas glicerol (50:50) y el diluyente corresponde a una solución de NaCl 0,85% y triptona 0,1% en agua. Todo el material utilizado era estéril y se trabajó en cabina de flujo laminar. Finalmente, para completar la evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* y tener más información a la hora de decidir los porcentajes de aceites esenciales a utilizar (en combinación), se hace una pequeña encuesta al mismo panel inicial calificando del 1 al 5 las formulaciones de la primera a la quinta (ver en anexos el soporte de los formatos).

2.3 Evaluación actividad antimicrobiana *in vivo*

Una vez seleccionada la formulación de mejor desempeño (F5), se procedió a realizar el ensayo en voluntarios sanos. Dichos voluntarios se seleccionaron teniendo en cuenta el protocolo de consentimiento informado presentado ante el comité de ética, el cual fue aprobado bajo el acta 10-2021. (ver Anexo 2- Consentimientos informados).

El método propuesto se basó en la guía ASTM E1115-11 (ASTM, 2011) a la cual se le hicieron algunas modificaciones, inicialmente los voluntarios duraron por lo menos una semana sin utilizar jabón antibacterial en sus manos ni desinfectantes, debían tener las uñas cortas y no debían lavarse las manos por lo menos seis horas antes del inicio del ensayo, de preferencia se realizaron los ensayos en horas de la mañana. Inicialmente se determinó la línea base para lo cual se retiraron todas las joyas de manos y brazos, se colocaron guantes para tomar muestras en las manos derecha e izquierda. La muestra de cada mano se tomó agregando asépticamente 50 mL de fluido de muestreo (composición descrita posteriormente), luego de un minuto se masajeo uniformemente las manos durante un minuto adicional incluyendo palma, dorso, todos los dedos y zona interdigital, luego se recuperaron asépticamente 100 μ L del líquido del guante para realizar dos diluciones ($\times 10^{-2}$ y $\times 10^{-3}$), se sembraron por triplicado en agar YM (distribuyendo en toda la superficie del agar la muestra utilizando un asa de vidrio) y se incubaron las muestras a 35°C durante 24 horas con el fin de contar el número de colonias presentes.

Se enjuagaron bien las manos para retirar el fluido de muestreo. El procesamiento de la muestra se realizó inmediatamente después de haber realizado el masaje y la incubación de la muestra se realizó dentro de los posteriores 30 minutos al muestreo. (ASTM, 2011).

Dicho procedimiento se repitió en tres días diferentes en el transcurso de una semana, todos los sujetos los mismos días, para obtener tres estimaciones de la población microbiana inicial.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se hizo primero la evaluación de un control el cual fue la formulación sin aceites esenciales y luego de una semana (tiempo prudencial para volver a realizar el ensayo) se evaluó el jabón formulado con aceites esenciales (F5).

Posterior a la primera evaluación con aceite esencial se entregó a cada participante una muestra del jabón con el fin de que se usará 3 veces al día y luego de 5 días se evaluó de nuevo su actividad, con el objetivo de determinar si existe actividad acumulativa.

En total se necesitó de disponibilidad de 6 días distribuidos en tres semanas de la siguiente manera:

Tabla 8: Cronograma de ensayos *in vivo*

Cronograma de ensayos							
Semana 1	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Evaluación para línea base	X		X		X		
Semana 2	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Evaluación del control (jabón sin aceite esencial)	X						
Semana 3	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Evaluación del jabón con aceite esencial	X				X		
Durante la semana 3 se le suministró una muestra del jabón a cada voluntario con el fin de que lo usara tres veces al día durante 5 días (lunes a viernes)							

Para la evaluación del control y el jabón con aceite esencial se realizó de la siguiente forma: Se hizo el lavado teniendo las manos más altas que los codos, se debían tener las uñas cortas y limpias, se retiraron todas las joyas de manos y brazos, se enjuagaron las manos incluyendo dos tercios del antebrazo con agua durante 30 segundos, se realizó la limpieza con el jabón (control o con aceite esencial según sea el caso) durante 30 segundos siguiendo los pasos recomendados por la OMS (se colocó un afiche con el paso a paso a seguir, que corresponde a: frotarse las palmas de las manos entre sí, frotarse la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos y viceversa, frotarse las palmas de las manos entre sí con los dedos entrelazados, frotarse el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta agarrándose los dedos, frotarse con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa, frotarse la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda haciendo un movimiento de rotación y viceversa), se enjuagaron las manos y antebrazos durante 30 segundos con agua eliminando toda la espuma; posteriormente sin secarse ni tocarse las manos, se colocaron los guantes para tomar las muestras en las manos derecha e izquierda y se repitió el proceso descrito en la determinación de la línea base, con la diferencia de que se realizaron diluciones ($\times 10^{-1}$ y $\times 10^{-2}$).

El agar utilizado para todos los ensayos fue agar YM, el fluido de muestreo se diseñó en el laboratorio de tal forma que fuera isotónico con un pH neutro, a continuación, se muestra su composición. Todos los materiales utilizados fueron estériles y se trabajó en cabina de flujo laminar.

Tabla 9: Composición suero de muestreo

Suero de muestreo	
Componente	Cantidad
NaCl	5,96 g
Na ₂ HPO ₄	3,5 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Tween 20	5 g
Peptona de carne	1 g
Agua	1 L

Fluido isotónico. Si es necesario se ajusta pH con NaOH o HCL 0,1N para obtener una solución pH neutro (7).

3. Resultados y Discusión

3.1 Evaluación de características físicas y organolépticas

A continuación, se presentan los resultados en tabla y en gráfica para de cada uno de los ensayos iniciales (E1 al E8) para la evaluación física (pH y viscosidad) y sensorial de aspecto (color-olor), generación de espuma, facilidad de lavado y suavidad luego del lavado.

Tabla 10: Datos para la evaluación organoléptica de las formulaciones E1 a E8. (AS: Aspecto; G: Generación de espuma; F: Facilidad de lavado; S: Suavidad luego del lavado)

Sujeto	E1				E2				E3				E4				E5				E6				E7				E8						
	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F	S	AS	G	F
S1	6,8	3,8	7,6	7,2	8,7	9,0	9,0	8,9	7,7	8,2	8,7	6,9	9,1	9,2	9,2	8,9	5,8	4,7	6,5	5,2	7,6	8,1	8,4	8,0	4,2	3,8	4,2	4,8	8,7	8,7	8,7	8,8			
S2	9,8	1,7	9,9	9,9	4,9	3,4	9,9	9,8	8,6	6,8	9,9	9,9	6,6	8,9	9,8	10,0	8,7	5,9	9,9	9,5	7,8	2,8	9,8	9,9	9,5	7,8	9,9	9,9	9,3	3,6	9,8	9,9			
S3	2,8	8,3	6,6	5,4	0,8	4,8	8,1	1,1	6,2	6,3	9,2	8,0	0,6	6,7	0,6	0,9	4,8	6,3	1,8	6,3	2,4	1,3	5,8	2,0	3,7	4,7	3,1	2,5	1,0	4,4	4,8	3,9			
S4	8,0	6,3	7,7	6,2	7,7	3,3	7,6	6,7	9,1	3,2	9,1	7,6	4,1	6,6	8,6	5,8	6,8	8,9	8,1	7,4	7,7	9,6	8,5	7,5	8,6	8,9	8,4	8,5	9,8	9,9	9,7	4,0			
S5	8,6	5,4	8,2	9,5	4,9	4,8	4,3	9,0	7,5	5,0	6,2	9,0	2,1	4,9	5,2	8,8	5,5	4,2	5,9	8,7	2,0	8,4	6,4	9,7	7,9	8,3	8,6	8,8	4,5	7,9	8,8	9,2			
S6	3,7	9,4	8,7	4,2	9,8	5,5	9,8	8,5	4,5	5,9	9,6	8,8	2,0	7,9	9,5	7,5	1,4	4,7	9,2	9,2	3,2	9,8	9,9	9,9	3,0	6,0	9,9	9,2	3,9	9,4	8,6	9,3			
S7	9,0	9,4	8,2	4,6	9,1	7,9	7,8	8,7	5,4	4,7	7,9	3,3	6,8	8,6	7,9	7,7	8,6	7,4	7,4	5,1	9,2	9,2	8,7	8,0	8,3	7,1	9,0	7,5	9,3	9,3	8,7	8,1			
S8	8,2	9,2	8,9	8,3	8,8	9,0	7,8	7,5	7,2	6,7	6,7	6,4	9,0	8,9	8,4	8,2	7,7	6,6	6,7	7,6	7,9	6,9	7,2	8,1	8,2	8,0	8,0	8,2	8,8	5,3	8,8	8,5			
Promedio	7,1	6,7	8,2	6,9	6,8	6,0	8,0	7,5	7,0	5,9	8,4	7,5	5,0	7,7	7,4	7,2	6,2	6,1	6,9	7,4	6,0	7,0	8,1	7,9	6,7	6,8	7,6	7,4	6,9	7,3	8,5	7,7			
Desviación	2,5	2,9	1,0	2,2	3,1	2,4	1,8	2,8	1,6	1,5	1,4	2,0	3,3	1,5	3,1	2,8	2,4	1,6	2,5	1,7	2,9	3,2	1,5	2,6	2,6	1,8	2,6	2,5	3,3	2,5	1,6	2,4			
Mínimo	2,8	1,7	6,6	4,2	0,8	3,3	4,3	1,1	4,5	3,2	6,2	3,3	0,6	4,9	0,6	0,9	1,4	4,2	1,8	5,1	2,0	1,3	5,8	2,0	3,0	3,8	3,1	2,5	1,0	3,6	4,8	3,9			
Máximo	9,8	9,4	9,9	9,9	9,8	9,0	9,9	9,8	9,1	8,2	9,9	9,9	9,1	9,2	9,8	10,0	8,7	8,9	9,9	9,5	9,2	9,8	9,9	9,9	9,5	8,9	9,9	9,9	9,8	9,9	9,8	9,9			

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la evaluación que cada persona le asigno a cada una de las formulaciones para cada característica, en una escala del 1 al 10.

Tabla 11: Datos para la evaluación física de las formulaciones E1 a E8

N°	PH	Ph Ajustado	Viscosidad SPR5	%	rpm	°C
E1	6,96	6,45	3645,6	72,9	80	19,7
E2	6,38	6,48	7675,2	76,8	40	19,1
E3	6,75	6,83	3522,7	70,5	80	18,9
E4	7,20	5,57	1499,6	75	200	18,9
E5	6,78	6,43	3668,4	73,4	80	18,9
E6	6,59	5,49	24705	74,1	12	18,9
E7	7,16	6,52	7646	76,5	40	18,8
E8	6,90	6,54	10051	75,4	30	18,6

*Las unidades para viscosidad corresponden a cps

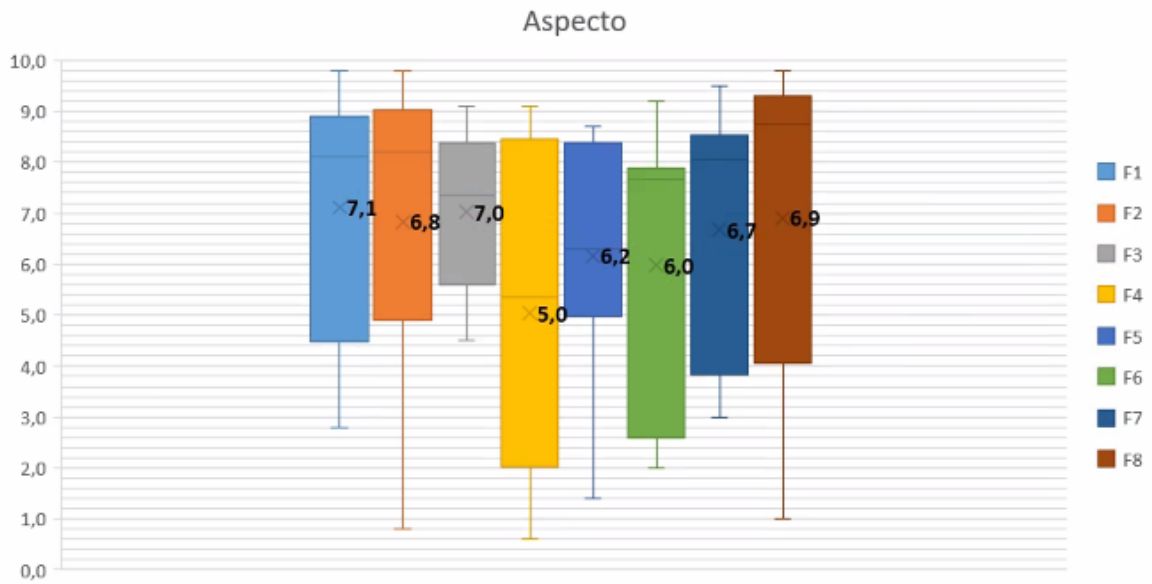


Figura 3: Resultados para aspecto en cada una de las formulaciones.

*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

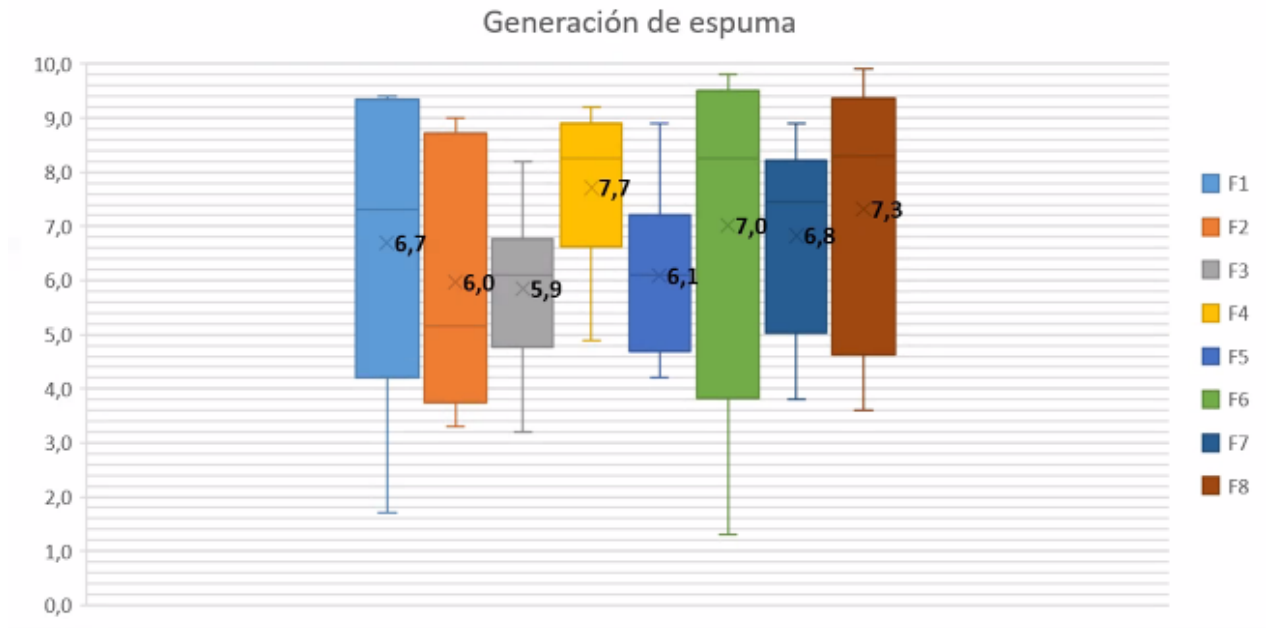


Figura 4: Resultados para generación de espuma en cada una de las formulaciones.
*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

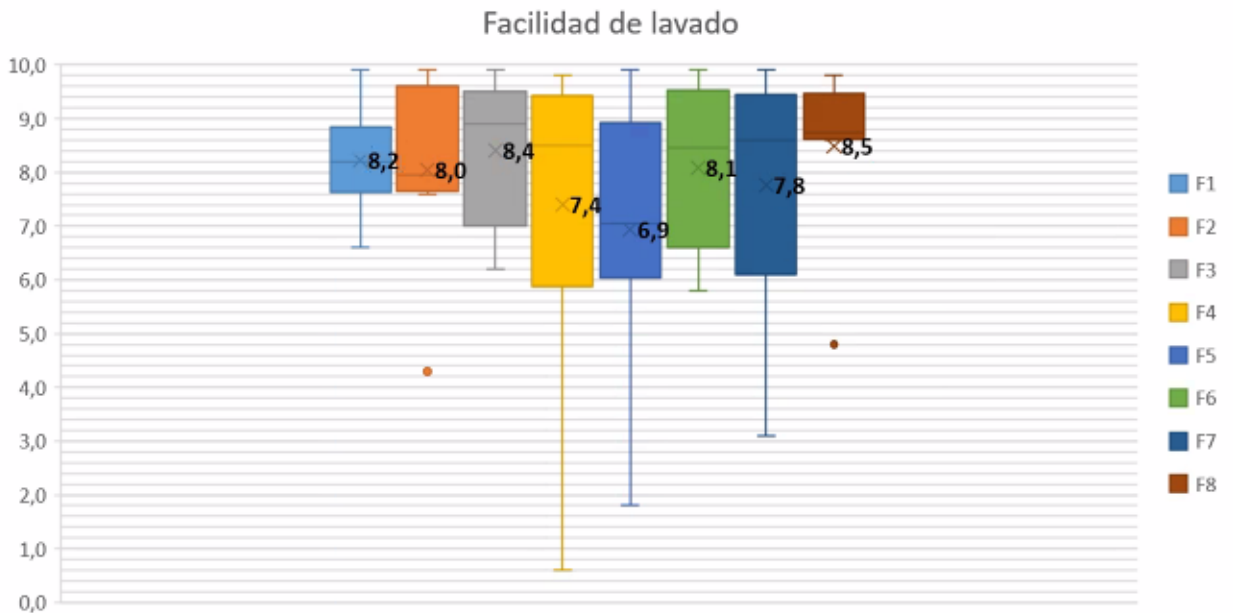


Figura 5: Resultados para facilidad de lavado en cada una de las formulaciones.
*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.



Figura 6: Resultados para suavidad luego del lavado en cada una de las formulaciones. *Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

Como se puede observar en la figura 3 las formulaciones tienen una respuesta similar en cuanto al aspecto, adicionalmente se evidencia que las respuestas de las diferentes personas son variables, es decir, se ven bigotes amplios en cada una de las respuestas, lo anterior puede ser consecuencia de los gustos diferentes de cada persona al evaluar un producto como consumidores. La formulación con mayor promedio fue la primera E1, la cual no contiene ninguno de los aceites evaluados. La formulación con menor promedio fue la cuarta E4, la cual contiene canela y callistemon. Es de resaltar que durante la encuesta todas las personas mostraron un desagrado frente a las formulaciones que contenían callistemon, ya que luego del lavado de las manos el olor permanecía muy fuerte en sus manos, expresaron que era un olor muy fuerte, invasor y penetrante, por lo que se considera que no es adecuado usarlo en una formulación cosmética para uso en manos. Según la figura 4, se evidencia que las formulaciones presentan resultados similares en cuanto a generación de espuma, obteniendo mejor resultado para la formulación E4 y el menor puntaje para la formulación E3, se puede decir que la generación de espuma en este tipo de productos es muy similar para todas las formulaciones, ya que la base es la misma y solo cambia el aceite esencial usado en cada una de ellas, también se observan bigotes amplios, los cuales se deben a la diferente percepción que tiene cada persona del parámetro evaluado.

De acuerdo con la figura 5, todas las formulaciones presentan una buena facilidad de lavado, obteniendo mejor resultado para la formulación E8 y el menor puntaje para la formulación E5, al igual que en el caso anterior las formulaciones presentan puntajes similares, debido a que la formulación base es la misma, se observa un mejor puntaje para la formulación que contiene todos los aceites esenciales, lo cual puede deberse a la sensación final que queda en la piel, haciendo que se sienta con un mejor lavado.

Finalmente, en la figura 6 se evidencia que todas las formulaciones presentan resultados similares para la suavidad luego del lavado, obteniendo mejor resultado para la formulación E6 y el menor puntaje para la formulación E1, debido a que la formulación E1 no contiene ningún aceite esencial, indica que la adición de aceites esenciales en la fórmula aumenta la sensación de suavidad luego del lavado, esto puede deberse a la sensación residual que dejan los aceites esenciales en la piel por sus características oleosas, haciendo que se sienta más suave que con la formulación base sin aceites esenciales. Es de resaltar que todas las figuras evidencian resultados atípicos, debido a que cada persona tiene una percepción diferente como consumidor.

Se presentan los resultados físicos de cada uno de los ensayos iniciales (E1 al E8) para viscosidad, pH antes y después de ajustado.

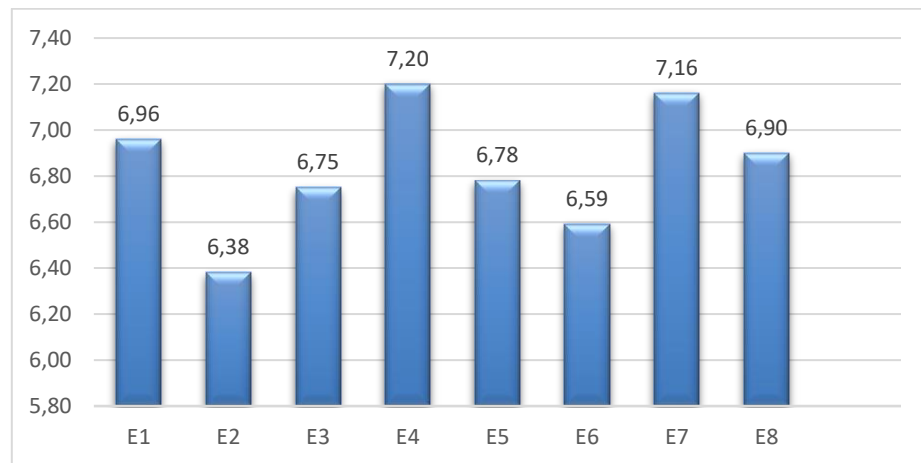


Figura 7: Resultados pH antes de ser ajustado.

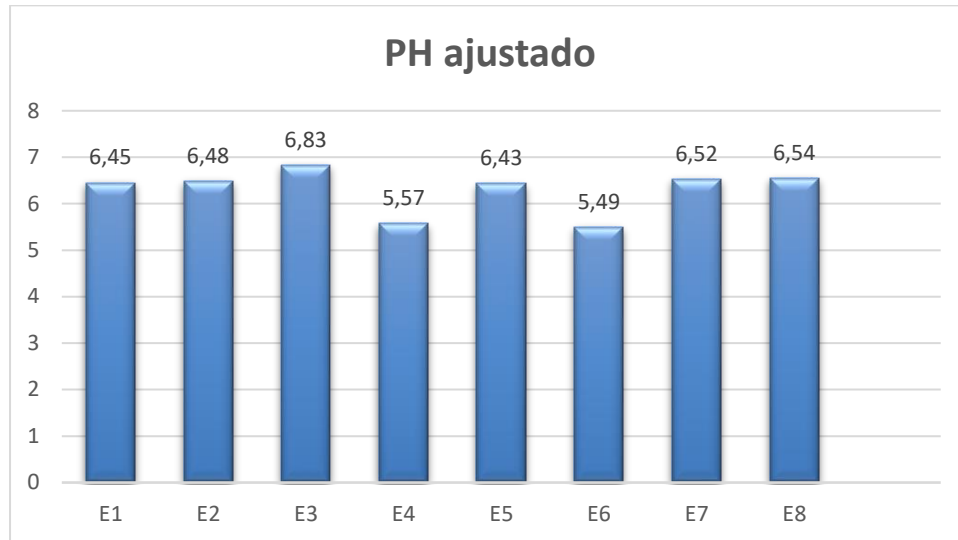


Figura 8: Resultados pH ajustado.

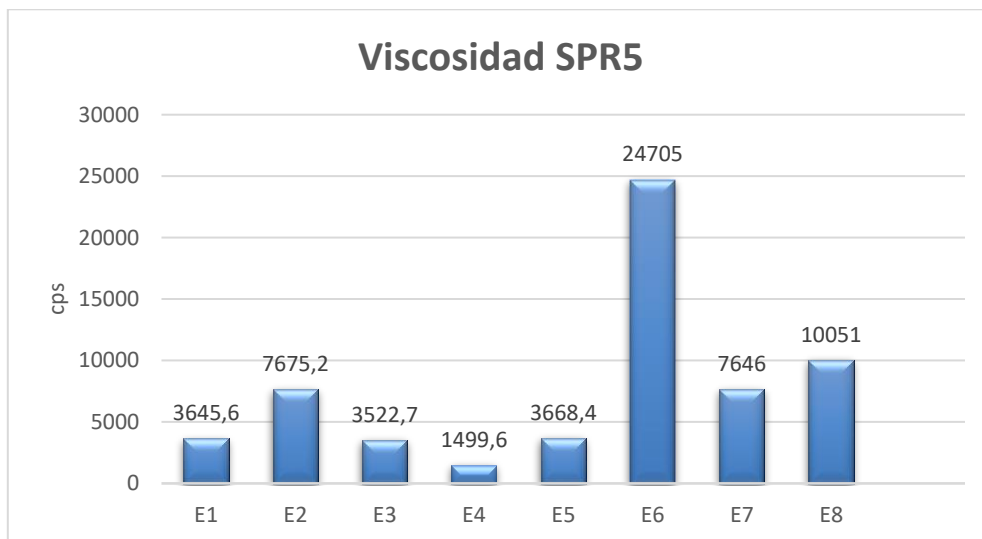


Figura 9: Resultados viscosidad.

En la figura 7 se puede evidenciar los resultados de pH, en donde se observa que el menor pH se obtiene de la formulación E2 cuyo aceite esencial corresponde a callistemon, de igual forma la formulación E6 también arroja un resultado de pH bajo, y es una formulación que contiene clavo y Callistemon, por lo que se puede inferir que el aceite esencial de Callistemon influye en el pH haciendo que el producto final resulte con un pH un poco más bajo que la fórmula sin aceites esenciales, esto se puede deber a los componentes articulares de dicho aceite esencia que aportan protones al medio haciéndolo ligeramente más ácido.

Por otro lado, el mayor pH se obtiene de la formulación E4, la cual contiene canela y Callistemon, de igual forma la formulación E7 que contiene clavo y canela. Dichos resultados dan a inferir que cuando los aceites esenciales son mezclados cada asociación tiene su comportamiento en particular y no se relacionan estrictamente con la ausencia o presencia de los aceites esenciales, los datos presentados son informativos y no son de gran impacto para la toma de decisión ya que el pH puede ser ajustado, en las formulaciones el pH fue ajustado con ácido cítrico al 10%, de tal forma que todos quedarán aptos para un producto de uso tópico, los pH quedaron cercanos como se evidencia en la figura 8.

Finalmente, en la figura 9 se evidencian los resultados obtenidos para viscosidad, la cual fue tomada con un spin R5. Se observa que la formulación más viscosa es la E6 la cual contiene clavo y callistemon; adicionalmente la formulación menos viscosa es la E4, la cual contiene canela y callistemon. Dichos comportamientos pueden deberse a la forma en la que interactúan los componentes principales de cada aceite esencial con el resto de la fórmula, haciendo que características físicas como la viscosidad varíe. Es de resaltar que todas las formulaciones presentaron una viscosidad adecuada para un producto jabón líquido para manos.

En las siguientes tablas, se muestra el diseño experimental de Taguchi y Shainin con los resultados puestos en el lugar indicado y con la sumatoria de cada variable presente o ausente tabla 12 (pH), tabla 13 (viscosidad), tabla 14 (aspecto), tabla 15 (generación de espuma), tabla 16 (facilidad de lavado) y tabla 17 (suavidad luego del lavado), adicionalmente se resalta en amarillo cada uno de los parámetros si es más adecuado la ausencia (-) o presencia (+) de cada una de las variables, lo anterior determinado con la sumatoria de las respuestas. Finalmente, en la tabla 18 se puede observar el resumen de los resultados para cada uno de los parámetros evaluados.

Tabla 12: Sumatorias para pH.

		PH						
		A-		A+				
		B-	B+	B-	B+			
C-		6,96			6,78		A+	27,43
			6,75			7,16	A-	27,29
C+			7,20			6,90	B+	28,01
		6,38			6,59		B-	26,71
							C+	27,07
							C-	27,65

Tabla 13: Sumatorias para viscosidad. (cps)

		Viscosidad					
		A-		A+			
		B-	B+	B-	B+		
C-		3645,6		3668,4		A+	46070,40
			3522,7		7646,0	A-	16343,10
C+			1499,6		10051,0	B+	22719,30
		7675,2		24705,0		B-	39694,20
						C+	43930,80
						C-	18482,70

Tabla 14: Sumatorias para aspecto.

		Aspecto					
		A-		A+			
		B-	B+	B-	B+		
C-		7,1		6,2		A+	25,80
			7,0		6,7	A-	25,90
C+			5,0		6,9	B+	25,60
		6,8		6,0		B-	26,10
						C+	24,70
						C-	27,00

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

Tabla 15: Sumatorias para generación de espuma.

		Generación de espuma					
		A-		A+			
		B-	B+	B-	B+		
C-		6,7		6,1		A+	27,20
			5,9		6,8	A-	26,30
C+			7,7		7,3	B+	27,70
		6,0		7,0		B-	25,80
						C+	28,00
						C-	25,50

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

Tabla 16: Sumatorias para facilidad de lavado.

		Facilidad de lavado					
		A-		A+			
		B-	B+	B-	B+		
C-		8,2		6,9		A+	31,10
			8,4		7,6	A-	32,00
C+			7,4		8,5	B+	31,90
		8,0		8,1		B-	31,20
						C+	32,00
						C-	31,10

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

Tabla 17: Sumatorias para suavidad luego de lavado.

Suavidad luego del lavado							
A-				A+			
B-		B+		B-		B+	
C-	6,9				7,4		
			7,5				7,4
C+			7,2				7,7
	7,5				7,9		

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 10.

Tabla 18: Resumen de resultados

	PH	Viscosidad	Aspecto (A)	Generación de espuma (B)	Facilidad de lavado (C)	Suavidad luego del lavado (D)
Clavo	A-	A+	A-	A+	A-	A+
Canela	B-	B-	B-	B+	B+	B+
Callistemon	C+	C+	C-	C+	C+	C+

Se puede observar que para el pH el mejor resultado se obtiene con presencia de Callistemon, para viscosidad el mejor resultado se obtiene con ausencia de canela, para aspecto el mejor resultado se obtiene con ausencia de todos los aceites esenciales, para generación de espuma y suavidad el mejor resultado se obtiene con la presencia de los tres aceites esenciales y para facilidad de lavado el mejor resultado se obtiene con ausencia de clavo. Esta tabla es de utilidad para ver de forma global los resultados y poder tomar una decisión sobre la ausencia o presencia de cada variable dependiendo de la importancia que se le dé a cada parámetro, es decir, por ejemplo, el pH es un parámetro que no tiene mucho peso en el producto en evaluación, ya que finalmente el pH fue ajustado al requerido para un producto tópico. Es de resaltar la suavidad que los aceites esenciales le proporcionan al producto, lo cual es una ventaja y aporte del presente trabajo.

Adicionalmente las formulaciones se observaron dos semanas después de preparadas y se compararon con el aspecto inicial (figuras 10 y 11).



Figura 10: Formulaciones recién preparadas.

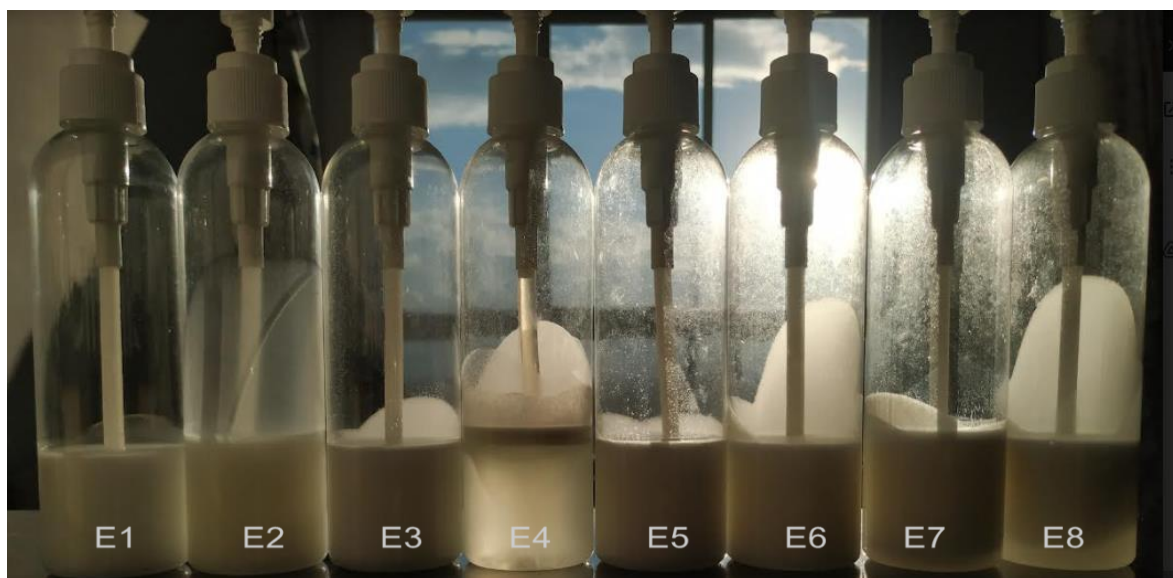


Figura 11: Formulaciones dos semanas después de preparadas.

Como se observa en la figura 10 todos los jabones preparados se encuentran homogéneos y uniformes, sin embargo, como se evidencia en la figura 11 la formulación E4 presenta una inestabilidad reflejada en una separación de fases marcada, adicionalmente la formulación E8 también presenta la misma inestabilidad, pero en menor grado. Lo anterior indica que hay una inestabilidad en las formulaciones que contienen canela y callistemon, lo anterior puede deberse a alguna interacción química de sus componentes, por lo cual, no deben usarse juntos para el producto final.

De acuerdo con todos los resultados recopilados y de acuerdo con la información arrojada por la matriz de Taguchi y Shainin, mas lo evidenciado durante la evaluación sensorial y lo observado en las formulaciones luego de dos semanas de ser preparadas, se toma la decisión de no utilizar callistemon en la fórmula final, ya que presenta un olor muy fuerte y permanente incluso luego del lavado de manos, y dicho olor penetrante no es adecuado para ser usado como cosmético en las manos, adicionalmente porque se encontró una incompatibilidad en las formulaciones que combinan canela y callistemon observándose una separación de fases.

Según los resultados observados anteriormente, los aceites escogidos para continuar con el estudio son clavo y canela, sin embargo, se hace un análisis de costos y de disponibilidad en el mercado de los aceites esenciales, encontrando que la disponibilidad del aceite de clavo es muy escasa y adicionalmente es muy costoso, lo cual se vería reflejado en un producto demasiado costoso para ser un cosmético. A continuación, en la tabla 19, se hace una comparación de los precios disponibles encontrados en el mercado, encontrando que el aceite de naranja es uno de los más económicos, adicionalmente se descarta por completo el proveedor Aromas del sol por su alto costo, se descarta también el uso del aceite esencial de clavo, ya que el producto resultaría demasiado costoso e inasequible para el consumidor. Por lo anterior se decide buscar una alternativa más económica, encontrando que el aceite de naranja es una buena opción debido a su facilidad de adquisición, sus agradables características organolépticas, su costo totalmente viable debido a su producción continua y que es un aceite que se obtiene de las cascavas de naranja, aprovechando los desechos que producen de su consumo. Finalmente se hace un cálculo del costo de los aceites esenciales de la fórmula escogida F5 (se explica posteriormente la selección de dicha fórmula final), dando como resultado un costo aceptable de \$1.258 de aceites esenciales para un producto de 250mL.

Es importante resaltar lo valioso de esta primera sección del estudio, ya que nos lleva a entender que la actividad antimicrobiana no es el único aspecto a tener en cuenta, y que al ser un producto cosmético aspectos como el costo, facilidad de adquisición y características organolépticas son parámetros prioritarios para seleccionar la fórmula de mejor desempeño.

Tabla 19: Costo de los aceites esenciales en el producto

Aceite esencial	Proveedor	Costo	Cantidad	Costo por mL	Costo en producto x250mL (al 5%)	Concentración F5	Costo en producto F5 x250mL
Naranja	Green	\$ 72.600	1 Kg	\$ 73	\$ 908	4%	\$ 726
Canela	Green	\$ 212.772	1 Kg	\$ 213	\$ 2.660	1%	\$ 532
Callistemon	Aromas del sol	\$ 190.000	50 mL	\$ 3.800	\$ 47.500	NA	NA
Clavo	Aromas del sol	\$ 200.000	50 mL	\$ 4.000	\$ 50.000	NA	NA
Hojas canela	Aromas del sol	\$ 200.000	50 mL	\$ 4.000	\$ 50.000	NA	NA
Costo total en producto F5 x250mL							\$ 1.258

Adicionalmente se decide realizar el producto microemulsificando los aceites, con el fin de presentarlo en un envase con válvula espumadora. Lo anterior para una mejor presentación del producto ya que el uso de este tipo de válvulas genera un mayor agrado para el usuario final. Adicional a que es una forma cosmética más estable para conservar los aceites esenciales en un sistema heterodisperso, ya que es termodinámicamente estable, agregando el hecho que al ser transparente es muy agradable su aspecto y al formarse espontáneamente no necesita de calor ni maquinaria compleja, lo que hace que la producción a escala industrial no sea difícil.

La fórmula presentada en el capítulo de materiales y métodos (tabla 5) fue muy estable y dio como resultado microemulsiones que se formaron espontáneamente y se mantuvieron con el tiempo, sin embargo, se observó una inestabilidad en las fórmulas que no contenían aceite esencial de canela, resultado un sistema que no se podía formar, se intentó subir la proporción de tensoactivos en un 20% pero no se logró formar la microemulsión. A continuación, se ve la inestabilidad para dos fórmulas con 3% y 5% de aceite esencial de naranja y 0% de aceite esencial de canela. Es interesante como inmediatamente al adicionar AE de canela en la última imagen de la derecha correspondiente a 4% AE naranja combinado con 1% AE canela, la fórmula ya es estable y se forma la micro emulsión, es posible que lo anterior se deba a que algún componente del aceite esencial de canela ayude como cosolvente a formar la microemulsión, puede ser algún compuesto proveniente de terpeno, que contenga una cadena larga hidrofóbica y una cabeza polar, lo que hace que la formación de las micelas sea más fácil, resultando en un producto más estable.

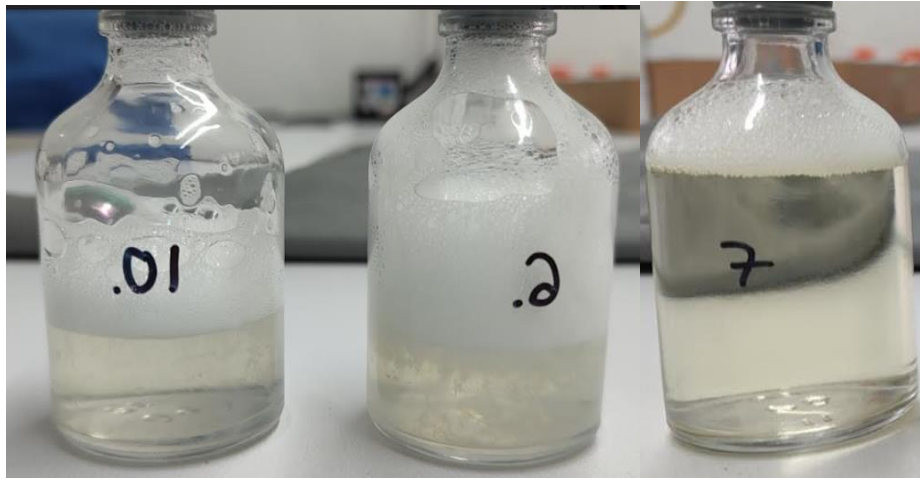


Figura 12: Formulaciones dos semanas después de preparadas. (de izquierda a derecha 3% AE naranja, 5% AE naranja, 4% AE naranja combinado con 1% AE canela)

Con el fin de complementar los resultados *in vitro* que serán presentados en el siguiente capítulo, para la toma de decisión de la fórmula con mejor desempeño se realiza una pequeña encuesta al mismo panel de personas inicial calificando del 1 al 5 las formulaciones para jabón espumoso (mismas evaluadas en los ensayos *in vitro*). A continuación, se presentan las formulas evaluadas con las variaciones de los aceites esenciales escogidos para evaluar (canela y naranja).

Tabla 20: Variación de % de AE en cada jabón espumoso evaluado

Material	F1(%)	F2(%)	F3(%)	F4(%)	F5(%)
AE naranja	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
AE canela	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0

A continuación, se muestran los resultados organolépticos obtenidos para cada una de las formulaciones evaluadas variando el porcentaje de aceites esenciales de canela y naranja.

Tabla 21: Calificación obtenida para aspecto

Material	F1	F2	F3	F4	F5
1	1	2	4	3	4
2	2	3	3	3	5
3	2	3	3	4	5
4	1	3	1	4	5
5	1	3	1	3	4
6	3	2	2	2	5
7	1	2	2	2	5
8	1	2	3	3	5
Promedio	1,5	2,5	2,4	3,0	4,8
Desviación	0,8	0,5	1,1	0,8	0,5

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 5.

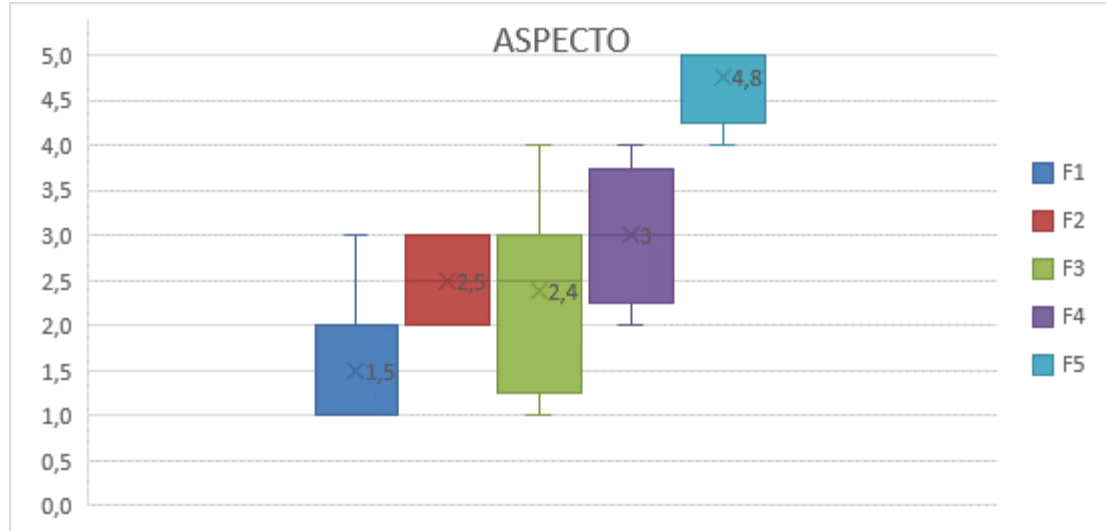


Figura 13: Aspecto de los jabones espumosos

*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden a la evaluación de la característica en una escala del 1 al 5.

Cada persona del panel inicial evaluó las cinco formulaciones del jabón espumoso asignando un puntaje del 1 al 5 de acuerdo con su aspecto incluyendo color, olor y sensación. Las formulaciones son las mismas utilizadas para la evaluación antimicrobiana *in vitro*. Se hicieron variando el porcentaje de aceites esenciales de naranja y canela con un máximo de 5% (ya que fue el porcentaje que mejor resultados arrojó en la evaluación antimicrobiana *in vitro* explicado posteriormente). Se puede observar en la figura 13 que la fórmula que mejor resultados tuvo fue la F5, se observa una tendencia debido a que entre más porcentaje de AE de naranja es más agradable para los usuarios, esto se debe principalmente a que el aceite esencial de naranja suele ser muy agradable en cuanto a olor para los consumidores.

A continuación, se presentan los resultados para espuma formada por cada una de las formulaciones, la espuma fue formada por la válvula espumadora del envase, la medición se realizó colocando la espuma formada en una superficie plana y se midió su altura con una regla arrojando los datos en centímetros:

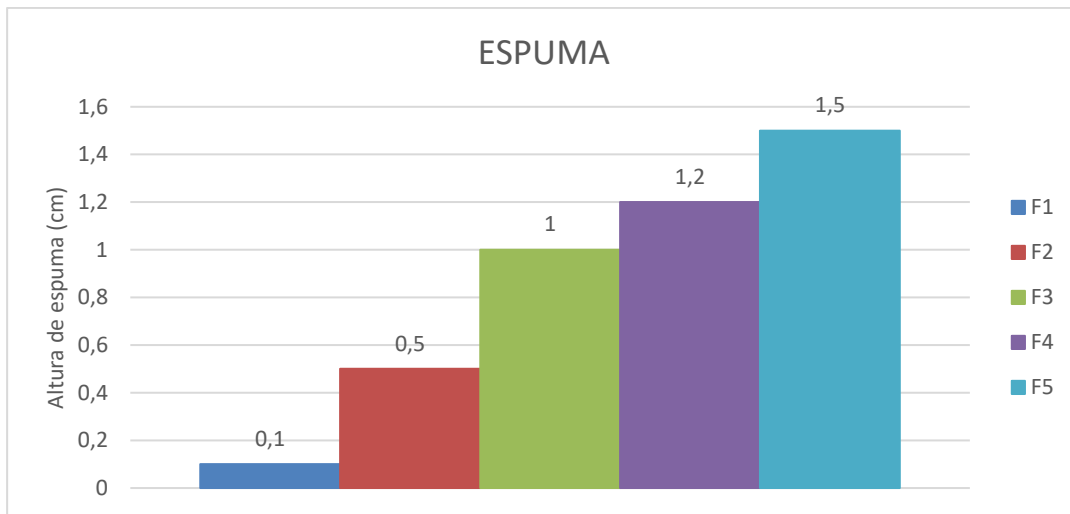


Figura 14: Altura de espuma

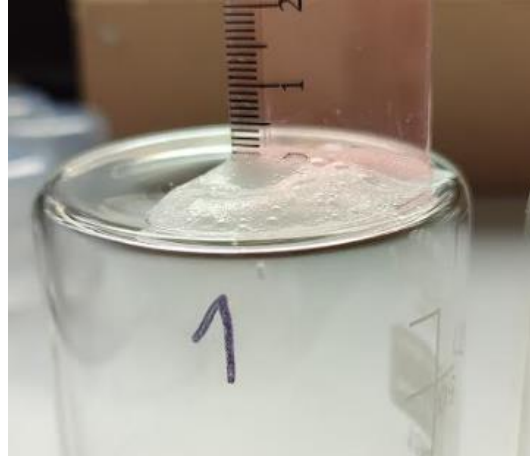


Figura 15: Altura de espuma F1

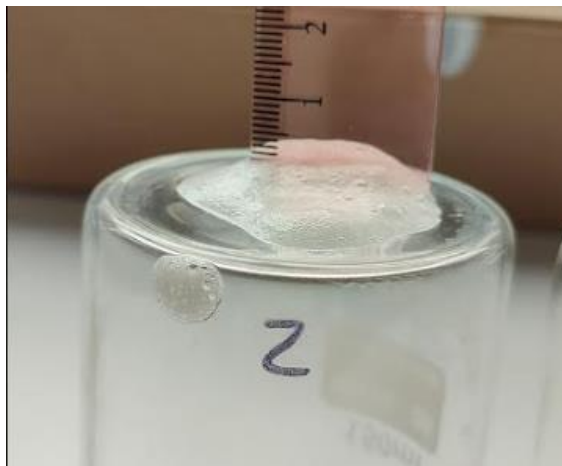


Figura 16: Altura de espuma F2

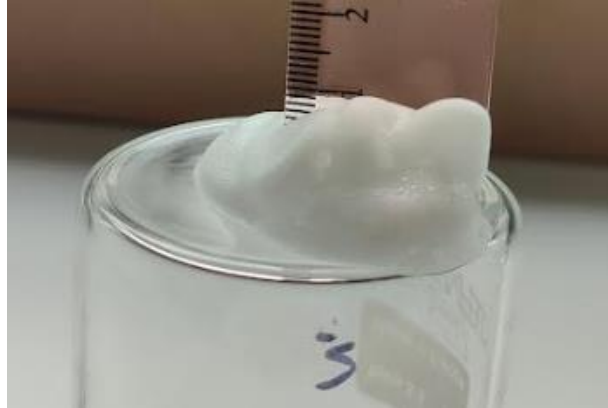


Figura 17: Altura de espuma F3

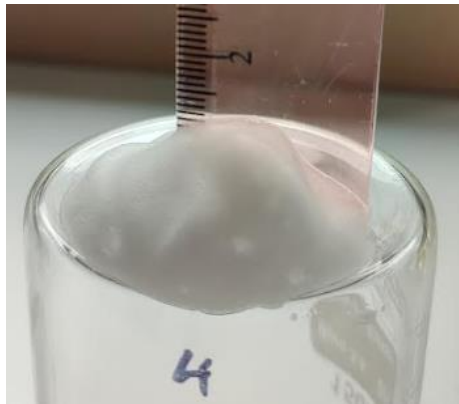


Figura 18: Altura de espuma F4

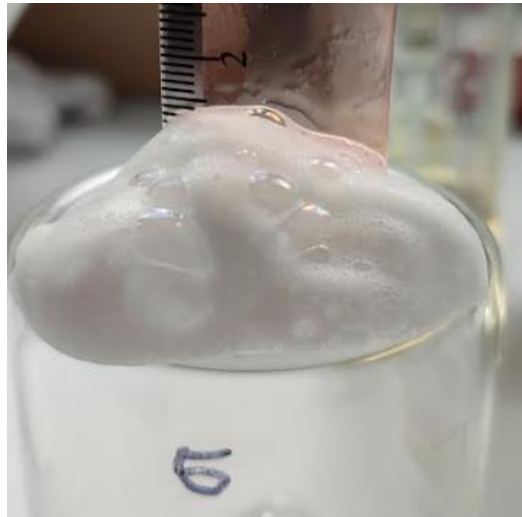


Figura 19: Altura de espuma F5



Figura 20: Aspecto del producto final F5 y su envase

Finalmente se evalúa la espuma de cada una de dichas fórmulas, se realiza midiendo la altura de la espuma realizada por cada una de ellas. En las figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se puede observar también una tendencia: entre mayor porcentaje de aceite esencial de naranja el producto presenta una mejor espumabilidad, lo anterior puede deberse a algún componente presente en el aceite esencial de naranja que actúa como espumante o por el contrario puede existir la posibilidad de que el aceite esencial de canela actúe como antiespumante, haciendo que a mayor porcentaje de dicho aceite menos espuma se forme.

Teniendo en cuenta los resultados de aspecto recopilados por medio del panel y de espuma, la mejor formulación corresponde a la F5, es importante resaltar que al tener mayor porcentaje de AE de naranja resulta más económica que las demás fórmulas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el tamaño de gota de la formulación F5.

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 8,160	Peak 1: 5,632	100,0	2,172
Pdl: 0,263	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,738	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality: Good			

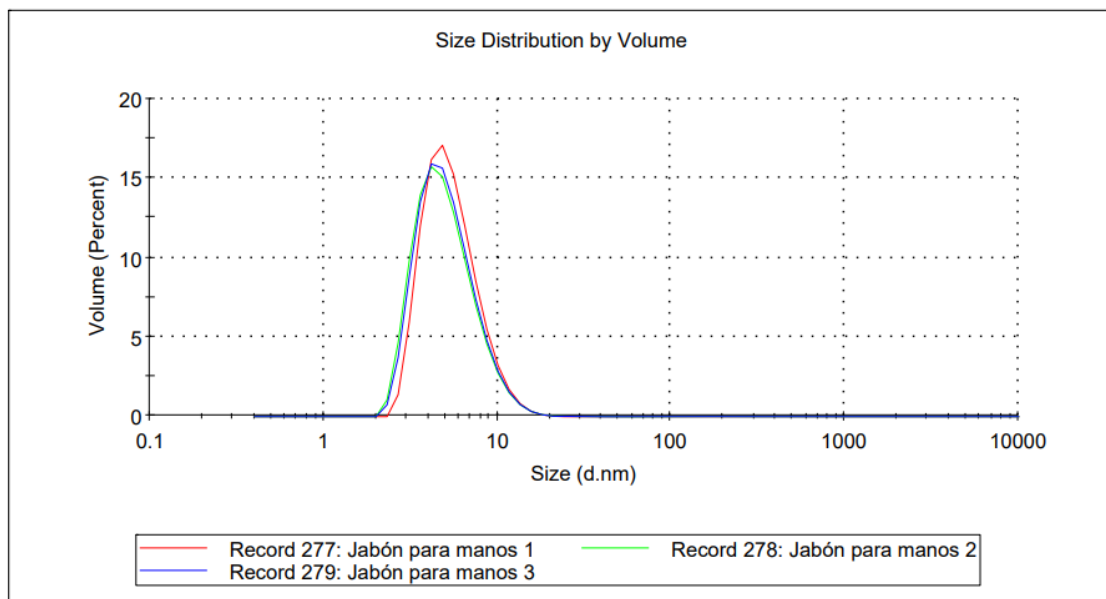


Figura 21: Tamaño de gota

Se realizó la determinación del tamaño de gota por medio del equipo Zetasizer, obteniendo como se ve en la figura 21, un tamaño de gota de alrededor de 5,632nm, lo cual confirma que la formulación trabajada se trata de una microemulsión, debido a que presenta un tamaño menor a 100nm (Fernández, 2006); es de anotar que este análisis se realizó luego de un año de preparado el producto, almacenado a temperatura ambiente, lo cual indica que es un producto que mantiene su estabilidad a lo largo del tiempo con relación al tamaño de gota. En la figura 21 se puede observar que se analizaron tres muestras del producto, el cual presenta un pico al alrededor de 5,632nm lo cual indica que tiene una polidispersidad baja, porque no se ve variación y no existen más picos en la gráfica.

Con el objetivo de caracterizar los aceites esenciales utilizados se analizó por cromatografía de gases los aceites esenciales utilizados en el producto final, los cuales son naranja y canela, a continuación, se muestran los resultados obtenidos. En los anexos se puede encontrar el informe de los análisis realizados.

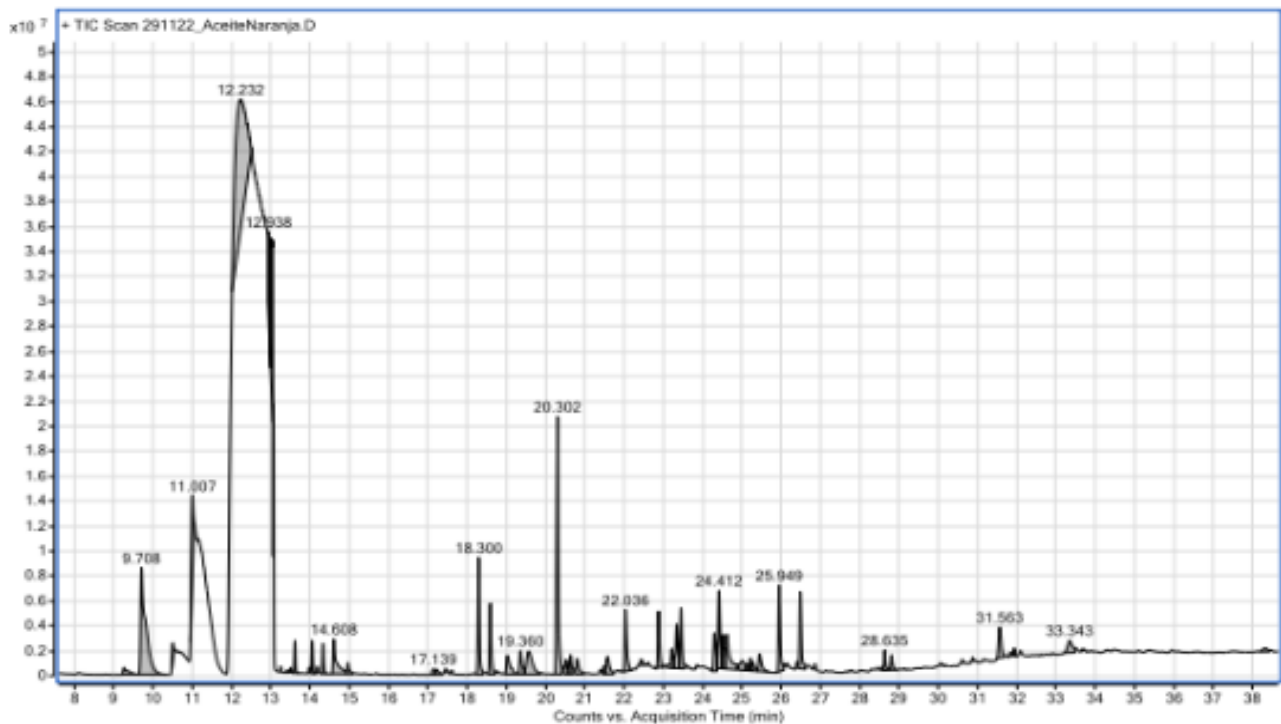


Figura 22: Cromatograma aceite esencial naranja

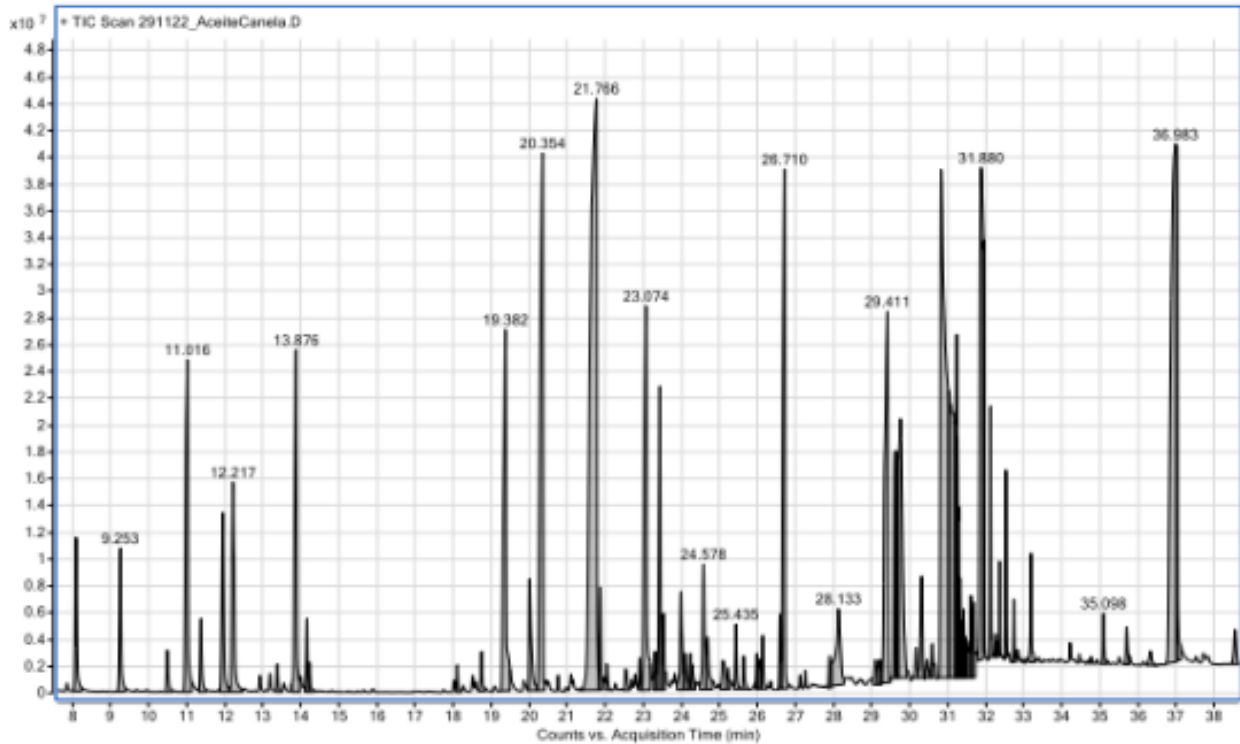


Figura 23: Cromatograma aceite esencial canela

En el anexo 3 se puede encontrar el informe en el cual se evidencia las tablas de resultados para cada uno de los aceites esenciales. Para el caso de la naranja se puede evidenciar que el compuesto presente en mayor proporción (25,07939%) corresponde a 2-Azabicyclo[4.2.0]oct-4-ene-8-carboxylic acid, 2-methyl-, methyl ester, el cual posiblemente no corresponde a la composición original del aceite esencial. Se evidencia la presencia de compuestos relacionados de limoneno, el cual es el principal componente de los aceites esenciales de plantas cítricas. Sin embargo, es de aclarar que se encuentran en una proporción mucho menor a lo esperado, 3,151139% para Limonene oxide, cis- y 2,058736% para Limonene oxide, trans-. El limoneno es un compuesto importante en el aceite esencial, presente en gran proporción y con actividad antimicrobiana (Qingyun et al., 2018). También se encuentran compuestos como pineno y decanal, los cuales tienen actividad antimicrobiana (Qingyun et al., 2018). Dentro de los otros compuestos se encuentran el 4(10)-Thujene responsable del sabor picante de las plantas: al pineno se le atribuye actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, fragancia, entre otros; el limoneno además se le atribuye el olor a limón, es usado como fragancia en las industrias, como repelente de insectos y se usa como desengrasante doméstico biodegradable; el copaene se usa como atrayente de insectos en la agricultura; (Rai & Bhushan, 2020).

Para el caso del aceite esencial de canela se puede evidenciar que el compuesto presente en mayor proporción (9,104646%) es 1,1,4,7-Tetramethyldecahydro-1H-Cyclopropa[E]azulen-4-ol, se puede observar que dicho aceite contiene una gran variedad de compuestos y no se ve que haya un compuesto con marcada proporción, es decir, todos se encuentran en porcentajes similares. Dentro de los compuestos identificados se muestra el pineno al cual como se explicó anteriormente se le atribuyen varias actividades dentro de las cuales está la antimicrobiana; el copaene se usa como atrayente de insectos en la agricultura; el benzaldehído usado como saborizante; el humulele usado como agente anticancerígeno, antiinflamatorio y anestésico (Rai & Bhushan, 2020) ; el cadinene el cual ha demostrado actividad antimicrobiana (Mizushina & Kuriyama, 2016); el safrole que ha demostrado actividad antimicrobiana (Almeida et al., 2020).

Es de resaltar que los compuestos con mayor proporción presentes en los aceites esenciales, posiblemente no son propios de la planta, esto es una desventaja, ya que el comprar el aceite esencial, no se puede asegurar que otros compuestos puedan estar presentes en el aceite esencial. Debido a que los aceites esenciales son una mezcla de compuestos de los cuales su composición y porcentajes dependen de la planta de la cual fue extraído dicho aceite y de muchos otros factores como sitio de cultivo, época del año de recolección, método de extracción, entre otros. Se infiere que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se da gracias a la combinación de sus componentes.

Uno de los beneficios de realizar este tipo de análisis es encontrar un marcador para trazar la concentración de aceite esencial en el producto final, por ejemplo, para el caso del aceite esencial de naranja se puede identificar el compuesto oxido de limoneno cis, uno de los que se encuentran comúnmente en este tipo de aceites, el cual se encuentra al 3,15% en el aceite esencial por lo cual se puede deducir que en el producto final F5 está al 0,126% (aceite esencial de naranja al 4%), lo anterior puede usarse como marcador en el producto. Para el caso del aceite esencial de canela se podría tomar por ejemplo el safrole el cual se encuentra al 3,77% en el aceite esencial por lo cual se puede deducir que en el producto final F5 está al 0,0377% (aceite esencial de canela al 1%). Dicha información sirve para posteriormente estandarizar la concentración a la cual debe estar el aceite esencial en el producto para que tenga la actividad antimicrobiana esperada. También podría escogerse un trazador en mayor concentración, esto ya depende del trabajo posterior que se quiera realizar.

3.2 Evaluación antimicrobiana *in vitro*

En la figura 24, se presenta un ejemplo de cómo se realizó la siembra de agotamiento por estrías.

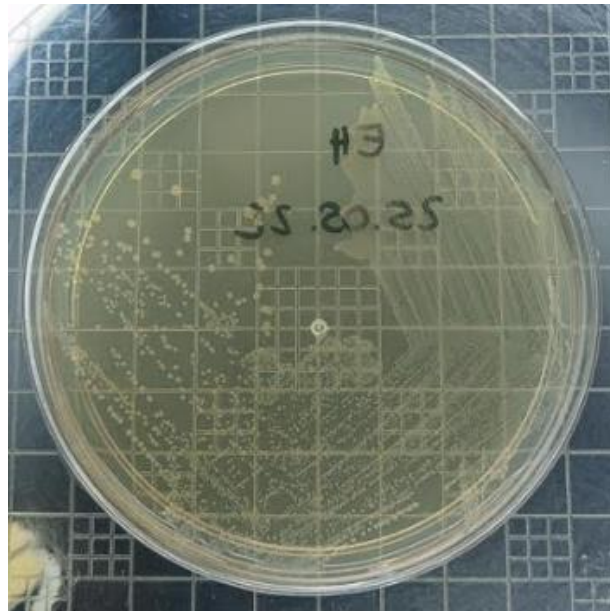


Figura 24: Siembra de agotamiento por estrías para EH

A continuación, en la figura 25 se presenta una imagen ejemplo de cómo se observa la siembra por difusión en agar para realizar el conteo de microorganismos presentes en la suspensión.

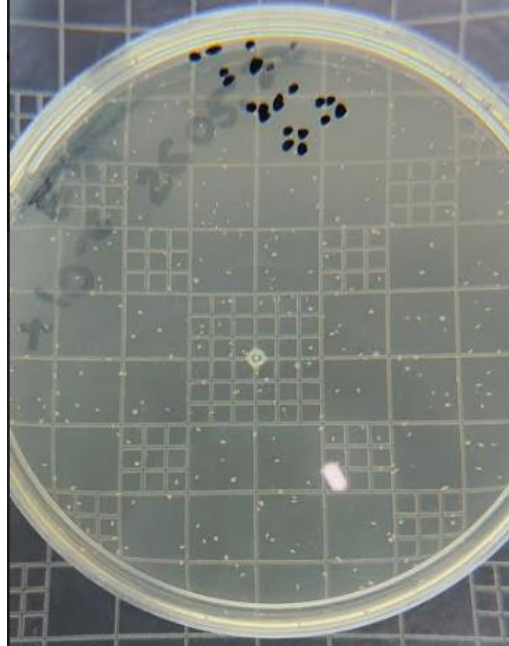


Figura 25: Caja para conteo en la suspensión de trabajo de EH

En la tabla 22 se muestran los resultados correspondientes al conteo de las suspensiones con las que se trabajó cada uno de los microorganismos. En verde se resalta el resultado final con el cual se trabajan las suspensiones (inóculo) para cada microorganismo.

Tabla 22: Conteo de las suspensiones de trabajo para los inóculos

Microorganismo	Dilución	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	mo/mL
EH	X10 ⁻⁶	IN	IN	IN	NA	NA
	X10 ⁻⁷	120	115	119	118	1,2E+09
	X10 ⁻⁸	9	11	12	11	1,1E+09
SA	X10 ⁻⁶	IN	IN	IN	NA	NA
	X10 ⁻⁷	97	105	98	100	1,0E+09
	X10 ⁻⁸	8	8	9	8	8,3E+08
PSA	X10 ⁻⁶	IN	IN	IN	NA	NA
	X10 ⁻⁷	165	170	162	166	1,7E+09
	X10 ⁻⁸	16	17	18	17	1,7E+09
CA	X10 ⁻⁶	15	17	20	17	1,7E+07
	X10 ⁻⁷	4	2	2	3	2,7E+07
	X10 ⁻⁸	0	0	0	0	0,0E+00

IN: Incontables

NA: No aplica

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden UFC (Unidades formadoras de colonia)

Posterior a establecer la cantidad de microorganismos presentes en las suspensiones de trabajo, se procedió a realizar las evaluaciones de MIC para cada una de las fórmulas F1 a la F8, 3 blancos y la F5 sin preservante. Es de aclarar que inicialmente se realizaron los ensayos de las fórmulas y 2 blancos, y de acuerdo con sus resultados se decidió hacer un tercer blanco (Euxyl al 0,2%) con el fin de evidenciar que el Euxyl K100 a una concentración de 0,1% si cumplía con su función de preservante, ya que al diluir en el primer tubo 1mL de producto en 1mL de caldo ya se está haciendo la dilución a la mitad del agente Euxyl K100. Adicionalmente luego de analizar los resultados se escoge la fórmula F5 y por esa razón se evalúa su comportamiento sin la presencia de preservante F5SP.

Los resultados obtenidos para el ensayo *in vitro* en donde se evaluaron cada una de las formulaciones se evidencian en las tablas 23, 24 y 25. Las siglas R1, R2 y R3 representan las tres réplicas realizadas para cada microorganismo. Los números del 1 al 10 representan los 10 tubos en los cuales se hicieron las diluciones (en orden).

En verde se resaltan los tubos en los cuales al hacer la siembra no hubo crecimiento, en amarillo se resaltan los tubos en los cuales al hacer la siembra hubo un crecimiento mínimo (presencia de algunas colonias) y en rojo se resaltan los tubos en los cuales al hacer la siembra hubo crecimiento (siembra totalmente poblada). Finalmente, las casillas en gris son aquellas en donde no se sembró muestra, bien sea porque no era necesario como el blanco 3 que solamente se evaluó en CA o porque el crecimiento era evidente y en los tubos anteriores se presentó crecimiento (diluciones menores). A continuación, las tablas 23, 24 y 25 para una fácil identificación visual de los resultados. Es de aclarar que en todos los controles positivos hubo crecimiento y en todos los controles negativos no hubo crecimiento.

Tabla 25: Resultados de la dilución en donde empieza a haber crecimiento

Mo		F1	F2	F3	F4	F5	F5SP	F6	F7	F8	B1	B2	B3
EH	R1	6	5	4	7	5	4	2	4	5	2	1	NA
	R2	6	7	6	5	5	1	1	4	4	2	1	NA
	R3	4	6	5	6	4	4	1	3	4	1	1	NA
	\bar{X}	5,33	6,00	5,00	6,00	4,67	3,00	1,33	3,67	4,33	1,67	1,00	NA
	S	1,15	1,00	1,00	1,00	0,58	1,73	0,58	0,58	0,58	0,58	0,00	NA
SA	R1	5	5	5	4	3	1	4	1	3	1	1	NA
	R2	5	5	4	4	3	1	3	2	1	1	1	NA
	R3	5	5	4	3	3	1	3	3	2	1	1	NA
	\bar{X}	5,00	5,00	4,33	3,67	3,00	1,00	3,33	2,00	2,00	1,00	1,00	NA
	S	0,00	0,00	0,58	0,58	0,00	0,00	0,58	1,00	1,00	0,00	0,00	NA
PSA	R1	5	5	5	4	5	1	5	4	3	3	1	NA
	R2	6	6	5	5	5	1	5	5	4	3	1	NA
	R3	5	5	5	4	5	1	5	4	4	3	1	NA
	\bar{X}	5,33	5,33	5,00	4,33	5,00	1,00	5,00	4,33	3,67	3,00	1,00	NA
	S	0,58	0,58	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,58	0,58	0,00	0,00	NA
CA	R1	7	7	7	6	5	4	6	5	5	1	1	2
	R2	6	7	7	6	4	4	5	5	3	1	1	1
	R3	6	7	7	5	4	5	5	5	4	1	1	2
	\bar{X}	6,33	7,00	7,00	5,67	4,33	4,33	5,33	5,00	4,00	1,00	1,00	1,67
	S	0,58	0,00	0,00	0,58	0,58	0,58	0,58	0,00	1,00	0,00	0,00	0,58

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden a la dilución en la cual empieza a haber crecimiento.

Se puede decir que la primera dilución en la cual hubo un crecimiento mínimo (primera casilla amarillas), es la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la última dilución en la cual ya no hay crecimiento (ultima casilla verde), corresponde a la concentración mínima bactericida (MBC).

Como se puede observar en los resultados, todas las formulaciones que contienen aceites esenciales presentan una actividad antimicrobiana frente a los cuatro microorganismos evaluados, esto corrobora la teoría que indica que los aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana (Transito, 2004). Visualmente se puede identificar que las fórmulas presentan una actividad mucho mayor que los blancos; el blanco 2, el cual no contenía aceites esenciales ni preservante no presentó actividad antimicrobiana contra ningún microorganismo; el blanco 1 el cual no contenía aceites esenciales, pero contenía preservante al 0,1% presentó una actividad antimicrobiana reducida al inhibir el crecimiento de EH y SA en las primeras diluciones, para PSA presentó una actividad bactericida en las dos primeras diluciones y para CA no presentó ninguna actividad antimicrobiana.

Lo anterior se debe a la función preservante del Euxyl K100, sin embargo, al no observar actividad para CA, se decide evaluar un blanco 3 para dicho mo el cual contenía el preservante al 0,2%, se duplica el porcentaje de la fórmula, ya que en la primera dilución al colocar 1mL de producto en 1mL de caldo, ya se está diluyendo a la mitad, por lo cual realmente en la primera dilución el preservante estaría al 0,1% (concentración a la cual estaría en el producto final), se puede evidenciar que sí hay actividad antimicrobiana contra CA en la primera dilución. Tomando los resultados de B1 y B3 se puede garantizar que el preservante en el producto sí cumple con su función, lo cual corrobora lo indicado por el fabricante (Ashland, 2023).

Al comparar la actividad de los blancos frente a las formulaciones, se observa que la adición de los aceites esenciales resulta en un evidente aumento de la actividad antimicrobiana, lo cual conduce al presente trabajo por buen camino, ya que se demuestra que las fórmulas con aceites esenciales de canela y naranja si presentan actividad antimicrobiana, lo cual corrobora lo consultado en la bibliografía, indicando que dichos aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana (Barrientos & Jorge, 2017), (Diaz & Galvis, 2014), (Castañeda, et al, 2018).

En la tabla 25 se presenta la dilución en la cual empieza a haber crecimiento para cada uno de los ensayos, se observa que en general las fórmulas F6, F7 y F8 presentan una actividad antimicrobiana más baja que las fórmulas F1, F2, F3, F4 y F5, esto se debe a que las fórmulas F6, F7 y F8 corresponden a combinaciones con un total de 3% de aceites esenciales, en cambio las fórmulas F1, F2, F3, F4 y F5 corresponden a combinaciones con un total de 5% de aceites esenciales; tomando estos resultados se decide usar el 5% de aceites esenciales en el producto final.

En la tabla 25 se resalta en azul la formulación en la cual mantuvo su actividad antimicrobiana por mas diluciones (mayor actividad antimicrobiana) para cada microorganismo y se resalta en rosa la formulación con segunda mayor actividad antimicrobiana.

Observando los resultados se puede concluir que la formulación con mejor actividad antimicrobiana es la F2, correspondiente a una mezcla de aceite esencial de canela (4%) y aceite esencial de naranja al (1%), es evidente que las mejores actividades se dan en las formulaciones que mayor porcentaje de canela contienen, esto demuestra que el aceite esencial de canela tiene una actividad antimicrobiana más alta que el aceite esencial de naranja, lo cual se debe a sus componentes a los que se les atribuye actividad, dentro de los cuales está el aldehído cinámico, eugenol, taninos, compuestos fenólicos y flavonoides (Barrientos & Jorge, 2017). Es de destacar los buenos resultados que se obtuvieron para CA, puede ser un buen inicio de un estudio para productos que sean destinados a atacar dicho mo.

Teniendo en cuenta los resultados de evaluación antimicrobiana, la F2 es la fórmula con mejor actividad antimicrobiana frente a todos los organismos evaluados, sin embargo, teniendo en cuenta los resultados organolépticos analizados en el capítulo 3.1 se evidencia que no es la fórmula más agradable organolépticamente. Teniendo en cuenta que el producto se trata de un cosmético, el peso que se le da a sus características organolépticas debe ser importante, ya que debe ser un producto que resulte agradable para el consumidor. Según lo analizado en el capítulo 3.1 la fórmula más agradable y con mejor espuma fue la F5 y evaluando los resultados antimicrobianos *in vitro* de dicha fórmula, no resulta ser la mejor, pero sí tiene una importante actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos evaluados. Por lo anterior se decide escoger la fórmula F5 como la formulación con mejor desempeño para continuar con los ensayos *in vivo*.

Con el fin de evaluar el comportamiento de la fórmula F5 sin preservante y conocer si es necesario o no la adición de Euxyl K100, se valora la F5SP (fórmula 5 sin preservante), encontrando que efectivamente la actividad antimicrobiana baja para todos los microorganismos, por lo cual se concluye que sí se justifica el uso del preservante y más teniendo en cuenta que es un producto en envase "multidosis". Es de resaltar que existe algún tipo de sinergia entre los aceites esenciales y el preservante en cuanto a la actividad contra PSA, haciendo un producto con una muy buena respuesta antimicrobiana contra dicho microorganismo (F5). Lo anterior debido a que la fórmula F5SP (fórmula 5 sin preservante) no tuvo actividad contra PSA, pero al adicionar a la fórmula el preservante (F5) si presenta una buena actividad contra este microorganismo.

Se muestra un ejemplo de cómo se observaron los tubos en los cuales se realizaron los ensayos de cada fórmula y blancos con sus diluciones. Para la figura 26 se muestran los tubos del 1 al 10 correspondientes a las diluciones, en donde se puede observar que a partir del tubo 7 hay turbidez, lo cual representa crecimiento, sin embargo, todos los ensayos fueron sembrados en agar para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos; los dos últimos tubos es el control negativo y el control positivo. El control positivo constó de 1mL de inóculo más 1mL de caldo, incubado junto con los demás tubos a 35°C. El control negativo constó de 1mL de inóculo mas 1mL de caldo, preservado en la nevera. Al tener los dos controles inóculo, deben crecer cuando se siembre la muestra en el agar.

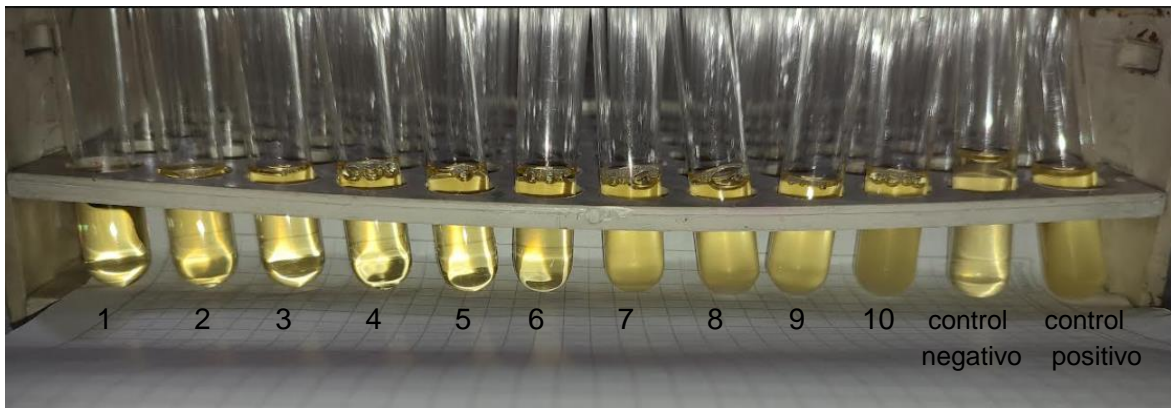
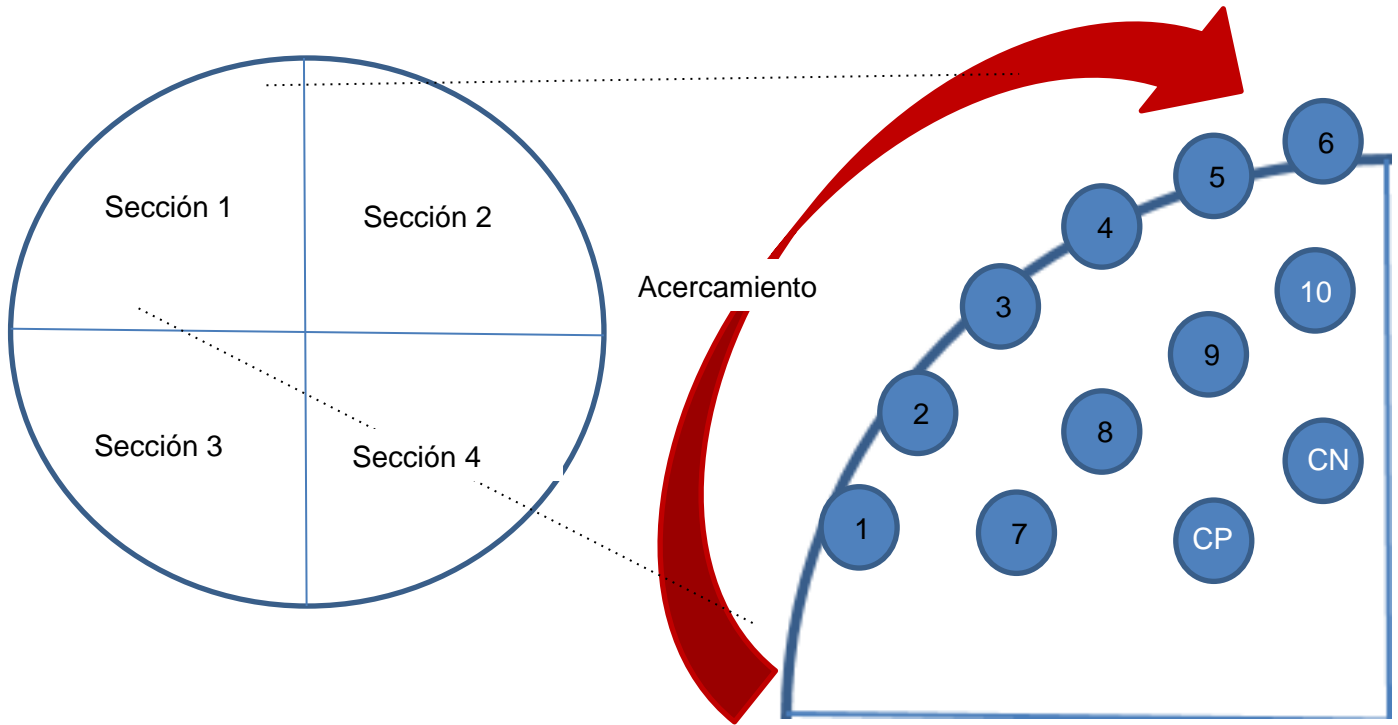


Figura 26: Resultados para CA replica 2 de la fórmula F1

En el siguiente gráfico, se muestra un ejemplo de cómo se sembraron cada una de las muestras en agar. Este se dividió en 4 secciones y cada sección sirvió para sembrar una réplica de un mo de una fórmula o blanco. En la imagen se marca cada cuadrante del agar con la fórmula evaluada y la réplica correspondiente. El orden en el cual se encuentran las diluciones y controles se muestra en el siguiente esquema. El sentido de siembra fue en sentido de las manecillas del reloj para todas las secciones del agar.



A continuación se muestra un ejemplo para cada microorganismo de cómo se observaron los resultados de la siembra en agar.

Figura 27: Esquema del orden de siembra para las diluciones 1-10, control negativo (CN) y control positivo (CP)

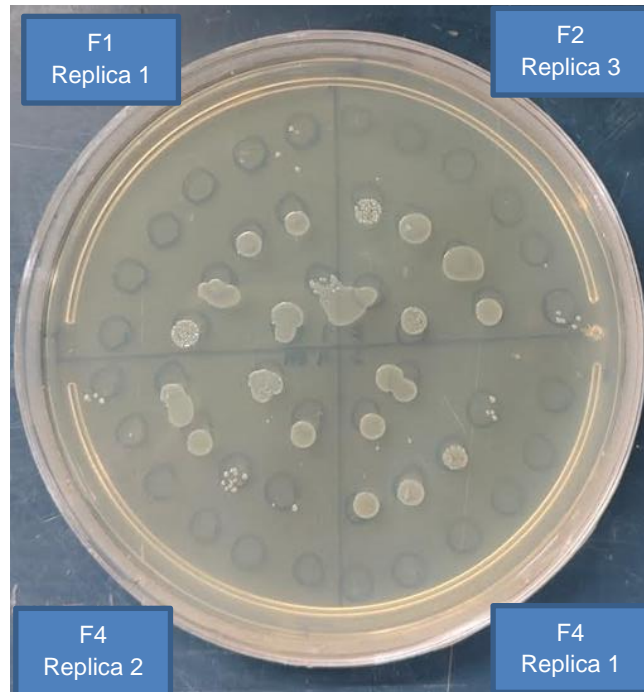


Figura 28: Ejemplo de resultados para EH

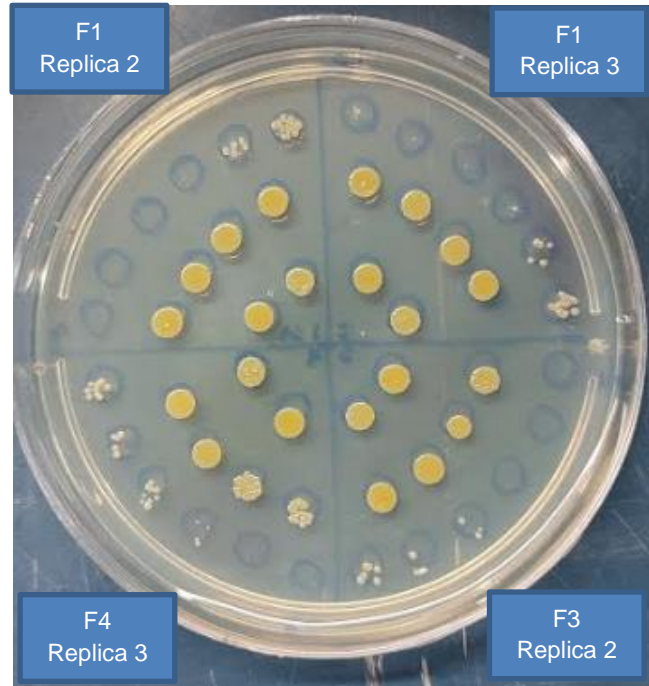


Figura 29: Ejemplo de resultados para SA

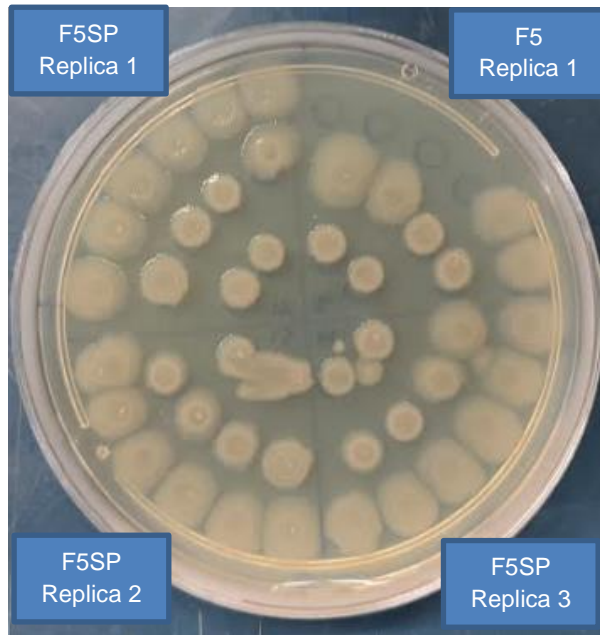


Figura 30: Ejemplo de resultados para PSA

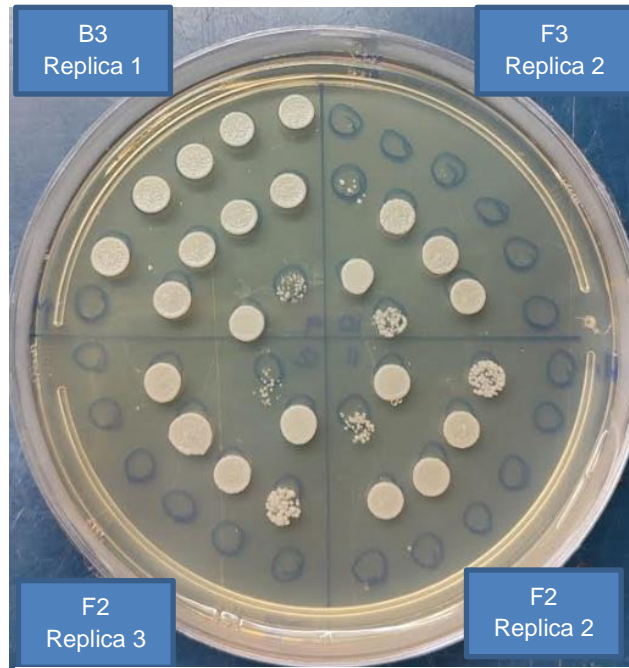


Figura 31: Ejemplo de resultados para CA

3.3 Evaluación antimicrobiana *in vivo*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la evaluación antimicrobiana en 7 voluntarios. La tabla 26 muestra con los conteos realizados en cada uno de los ensayos, los cuales fueron realizados por cada mano. Se hicieron tres líneas base, un control y dos evaluaciones para la fórmula F5, así como se describió en el capítulo 2.3. Adicionalmente, es de aclarar que cada muestra se sembró por triplicado en dos diluciones. La línea base en diluciones $\times 10^{-2}$ y $\times 10^{-3}$, el control en diluciones $\times 10^{-1}$ y $\times 10^{-2}$ y la fórmula F5 en diluciones $\times 10^{-1}$ y $\times 10^{-2}$. Se debe tener en cuenta que el conteo mostrado es la cantidad de colonias presentes en la muestra sembrada en los agares. Para la línea base y control se sembraron $50\mu\text{L}$ y para las dos evaluaciones de la fórmula F5 se sembraron $100\mu\text{L}$, lo anterior debido a que se esperaba un conteo más bajo y se decide sembrar el doble de volumen para tener un número adecuado para contar las colonias. Finalmente se resalta que las cajas que contenían más de 500 colonias no fueron contadas (incontables), para poder realizar un análisis de resultados, poder graficar y tener en cuenta dichos ensayos, fueron calificadas como incontables y se les asignó un número de colonias de 500, debido a que mínimo tenían dicho conteo.

Tabla 26: Tabla de resultados para ensayos *in vivo* (UFC)

Dilución		x10-1						x10-2						x10-3						
Mano		Derecha			Izquierda			Derecha			Izquierda			Derecha			Izquierda			
Replica		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
S1	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	280	335	331	500	500	500	27	26	11	35	19	10
		2	-	-	-	-	-	-	190	211	194	37	24	36	22	19	16	2	3	2
		3	-	-	-	-	-	-	249	238	216	500	500	500	18	14	7	35	23	31
	Control	1	500	500	500	500	500	500	75	82	80	123	156	115	-	-	-	-	-	-
	F5	1	219	233	250	164	145	137	21	19	18	17	15	13	-	-	-	-	-	-
		2	500	500	500	500	500	500	177	116	145	212	63	98	-	-	-	-	-	-
S2	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	62	52	76	17	21	29	4	2	2	0	4	3
		2	-	-	-	-	-	-	38	38	39	23	27	16	3	2	3	0	0	1
		3	-	-	-	-	-	-	5	2	7	11	9	9	0	2	0	0	1	1
	Control	1	500	500	500	67	35	100	19	20	8	5	5	7	-	-	-	-	-	-
	F5	1	150	100	190	500	500	500	19	19	17	38	4	37	-	-	-	-	-	-
		2	241	250	230	149	140	135	16	20	15	10	14	14	-	-	-	-	-	-
S3	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	9	47	130	160	150	53	10	21	1	5	25	13
		2	-	-	-	-	-	-	7	12	9	44	41	44	0	0	2	2	4	1
		3	-	-	-	-	-	-	47	53	46	20	18	26	4	5	9	0	0	2
	Control	1	95	137	500	500	500	500	10	2	4	59	70	60	-	-	-	-	-	-
	F5	1	230	260	230	95	130	150	13	27	28	5	11	12	-	-	-	-	-	-
		2	63	49	48	170	120	165	2	3	2	12	14	24	-	-	-	-	-	-
S4	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	500	500	500	500	500	500	5	4	1	0	0	1
		2	-	-	-	-	-	-	94	97	97	4	12	11	9	2	0	0	1	0
		3	-	-	-	-	-	-	61	58	60	85	85	73	5	5	5	7	7	8
	Control	1	145	140	174	200	200	200	16	9	13	9	9	24	-	-	-	-	-	-
	F5	1	101	76	71	50	68	60	7	5	7	8	6	7	-	-	-	-	-	-
		2	26	25	21	28	27	36	3	1	2	1	2	3	-	-	-	-	-	-
S5	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	29	7	30	25	43	34	4	2	6	6	2	4
		2	-	-	-	-	-	-	9	6	26	59	14	19	1	0	3	7	8	7
		3	-	-	-	-	-	-	15	20	39	11	10	5	1	2	3	2	1	0
	Control	1	56	40	58	49	35	43	3	4	3	2	2	2	-	-	-	-	-	-
	F5	1	54	51	76	37	55	36	6	3	3	2	4	1	-	-	-	-	-	-
		2	149	134	173	76	78	54	21	17	14	3	2	3	-	-	-	-	-	-
S6	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	64	100	69	500	27	24	4	5	1	0	0	1
		2	-	-	-	-	-	-	43	44	42	42	40	41	6	8	9	3	1	4
		3	-	-	-	-	-	-	26	31	24	10	11	19	1	0	2	1	1	6
	Control	1	500	500	500	138	120	200	26	30	29	16	21	20	-	-	-	-	-	-
	F5	1	80	90	82	42	43	41	5	11	11	5	5	5	-	-	-	-	-	-
		2	13	10	27	24	20	34	1	0	3	4	3	4	-	-	-	-	-	-
S7	Line Base	1	-	-	-	-	-	-	39	70	92	134	60	160	10	7	8	4	10	8
		2	-	-	-	-	-	-	27	41	42	28	30	19	2	1	3	0	1	0
		3	-	-	-	-	-	-	40	55	65	55	64	80	1	7	4	2	5	4
	Control	1	500	500	500	500	500	500	117	50	129	38	33	29	-	-	-	-	-	-
	F5	1	241	191	227	500	500	500	13	17	11	32	48	35	-	-	-	-	-	-
		2	145	122	100	70	63	88	8	11	11	7	7	6	-	-	-	-	-	-

*Las unidades presentadas en la tabla anterior corresponden UFC (Unidades formadoras de colonias).

Se muestran los resultados realizando el cálculo para obtener el número de microorganismos que se encontraban en la muestra total (50mL de fluido de muestreo en el guante), la cual representa el contenido total de microorganismos recuperados de cada mano. Es de anotar que en la dilución $\times 10^3$, correspondiente a las líneas base se obtuvo conteos muy bajos de UFC presentando muchos resultados como cero UFC, lo anterior son datos que afectan mucho el promedio, al ser tan pocas colonias son datos que pueden llevar a errores y a un erróneo resultado, por lo cual se decide tomar solamente los datos de la dilución $\times 10^2$ para las líneas base.

Las fórmulas de cálculo para construir la tabla son las siguientes.

- Control dilución $\times 10^{-1}$: fórmula de cálculo para S1, R1, control, mano derecha:

$$\frac{UFC}{\mu L \text{ sembrados}} * \text{volumen en el guante} \quad (3.1)$$

$$\frac{500 \text{ UFC}}{50 \mu L} * 50 \text{ mL} * \frac{1000 \mu L}{1 \text{ mL}} = 5,00 \times 10^5$$

- Línea base y control dilución $\times 10^{-2}$: fórmula de cálculo para S1, R1, línea base 1, mano derecha:

$$\frac{UFC}{\mu L \text{ sembrados}} * \text{volumen total de dilución 1} * \frac{1}{\text{volumen tomado de dilución 1}} * \text{volumen en el guante} \quad (3.2)$$

$$\frac{280 \text{ UFC}}{50 \mu L} * 1000 \mu L * \frac{1}{100 \mu L} * 50 \text{ mL} * \frac{1000 \mu L}{1 \text{ mL}} = 2,80 \times 10^6$$

- F5 dilución $\times 10^{-1}$: fórmula de cálculo para S1, R1, F5 1, mano derecha:

$$\frac{UFC}{\mu L \text{ sembrados}} * \text{volumen en el guante} \quad (3.3)$$

$$\frac{219 UFC}{100\mu L} * 50mL * \frac{1000\mu L}{1mL} = 1,10 \times 10^5$$

- F5 dilución $\times 10^{-2}$: fórmula de cálculo para S1, R1, F5 1, mano derecha:

$$\frac{UFC}{\mu L \text{ sembrados}} * \text{volumen total de dilución 1} * \frac{1}{\text{volumen tomado de dilución 1}} * \text{volumen en el guante} \quad (3.4)$$

$$\frac{21 UFC}{100\mu L} * 1000\mu L * \frac{1}{100\mu L} * 50mL * \frac{1000\mu L}{1mL} = 1,05 \times 10^5$$

Para un mejor análisis y presentación de los resultados, a los promedios se les calcula el logaritmo 10, se muestran a continuación los resultados.

Tabla 28: Log₁₀ de los datos mostrados anteriormente

Dilución		Gran promedio			
Mano		Derecha	Izquierda		
Log 10					
S1	Line Base	1	6,50	6,70	
		2	6,30	5,51	
		3	6,37	6,70	
	Control	1	5,81	5,96	
		F5	1	5,03	4,87
			2	5,80	5,64
S2	Line Base	1	5,80	5,35	
		2	5,58	5,34	
		3	4,67	4,99	
	Control	1	5,52	4,79	
		F5	1	4,92	5,28
			2	5,06	4,83
S3	Line Base	1	5,79	6,08	
		2	4,97	5,63	
		3	5,69	5,33	
	Control	1	5,17	5,75	
		F5	1	5,07	4,74
			2	4,32	4,90
S4	Line Base	1	6,70	6,70	
		2	5,98	4,95	
		3	5,78	5,91	
	Control	1	5,15	5,23	
		F5	1	4,56	4,51
			2	4,13	4,10
S5	Line Base	1	5,34	5,53	
		2	5,14	5,49	
		3	5,39	4,94	
	Control	1	4,63	4,49	
		F5	1	4,40	4,22
			2	4,99	4,38
S6	Line Base	1	5,89	6,26	
		2	5,63	5,61	
		3	5,43	5,12	
	Control	1	5,59	5,23	
		F5	1	4,64	4,36
			2	3,92	4,19
S7	Line Base	1	5,83	6,07	
		2	5,56	5,41	
		3	5,73	5,82	
	Control	1	5,87	5,62	
		F5	1	4,95	5,34
			2	4,79	4,55

*Las unidades presentadas en la tabla anterior están dadas en unidades logarítmicas

Se muestran los resultados sacándole el promedio a las tres líneas base analizadas.

Tabla 29: Datos con el promedio de línea base

Sujeto	Ensayo	Derecha	Izquierda
S1	Linea base \bar{x}	6,39	6,30
	Control	5,81	5,96
	F5 1	5,03	4,87
	F5 2	5,80	5,64
S2	Linea base \bar{x}	5,35	5,23
	Control	5,52	4,79
	F5 1	4,92	5,28
	F5 2	5,06	4,83
S3	Linea base \bar{x}	5,48	5,68
	Control	5,17	5,75
	F5 1	5,07	4,74
	F5 2	4,32	4,90
S4	Linea base \bar{x}	6,15	5,85
	Control	5,15	5,23
	F5 1	4,56	4,51
	F5 2	4,13	4,10
S5	Linea base \bar{x}	5,29	5,32
	Control	4,63	4,49
	F5 1	4,40	4,22
	F5 2	4,99	4,38
S6	Linea base \bar{x}	5,65	5,67
	Control	5,59	5,23
	F5 1	4,64	4,36
	F5 2	3,92	4,19
S7	Linea base \bar{x}	5,71	5,77
	Control	5,87	5,62
	F5 1	4,95	5,34
	F5 2	4,79	4,55

*Las unidades presentadas en la tabla anterior están dadas en unidades logarítmicas

Adicionalmente se calcula la reducción del control y análisis para F5 con respecto a los mo iniciales (línea base).

Tabla 30: Reducción con respecto a la línea base

Sujeto	Ensayo	Derecha	Izquierda
S1	Control	-0,58	-0,35
	F5 1	-1,36	-1,43
	F5 2	-0,58	-0,66
S2	Control	0,16	-0,43
	F5 1	-0,43	0,06
	F5 2	-0,29	-0,40
S3	Control	-0,31	0,07
	F5 1	-0,42	-0,94
	F5 2	-1,16	-0,78
S4	Control	-1,01	-0,62
	F5 1	-1,59	-1,34
	F5 2	-2,02	-1,75
S5	Control	-0,66	-0,82
	F5 1	-0,89	-1,10
	F5 2	-0,30	-0,94
S6	Control	-0,06	-0,43
	AE1	-1,01	-1,31
	AE2	-1,73	-1,47
S7	Control	0,17	-0,15
	F5 1	-0,76	-0,42
	F5 2	-0,91	-1,22

*Las unidades presentadas en la tabla anterior están dadas en unidades logarítmicas

Con el fin de poder analizar mejor los resultados, se muestran en graficas los datos de la tabla 29 por cada mano.

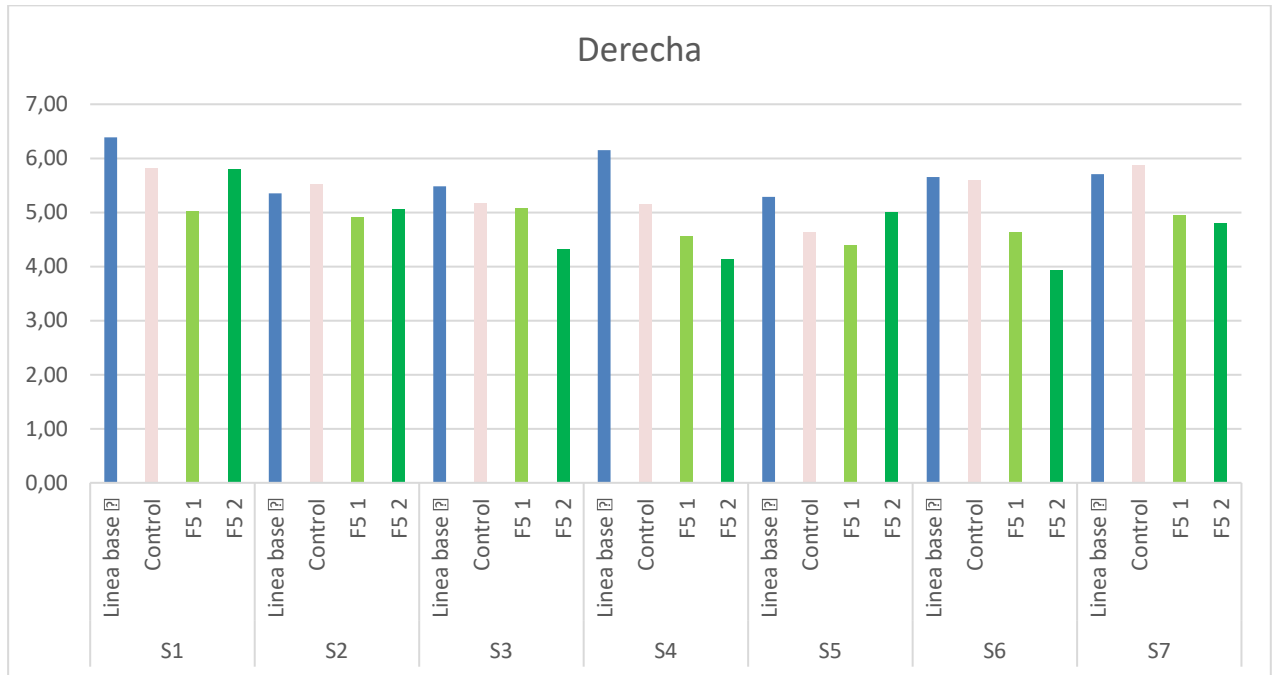


Figura 32: Log₁₀ para recuentos en mano derecha

*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden la escala logarítmica del conteo microbiológico para la mano derecha, para cada sujeto (S1-S7)

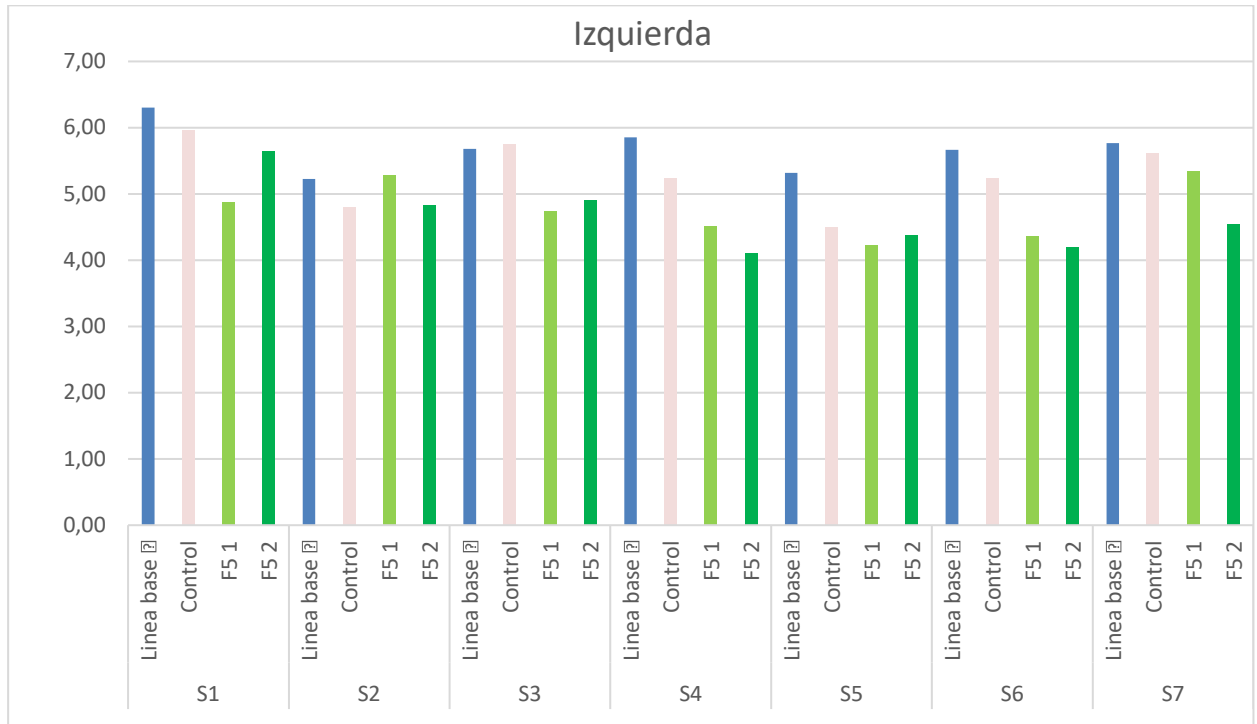


Figura 33: Log₁₀ para recuentos en mano izquierda

*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden la escala logarítmica del conteo microbiológico para la mano izquierda, para cada sujeto (S1-S7)



Figura 34: Reducción de mo en Log_{10} para mano derecha

*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden la reducción en escala logarítmica del conteo microbiológico para la mano derecha, para cada sujeto (S1-S7) con respecto a la línea base.

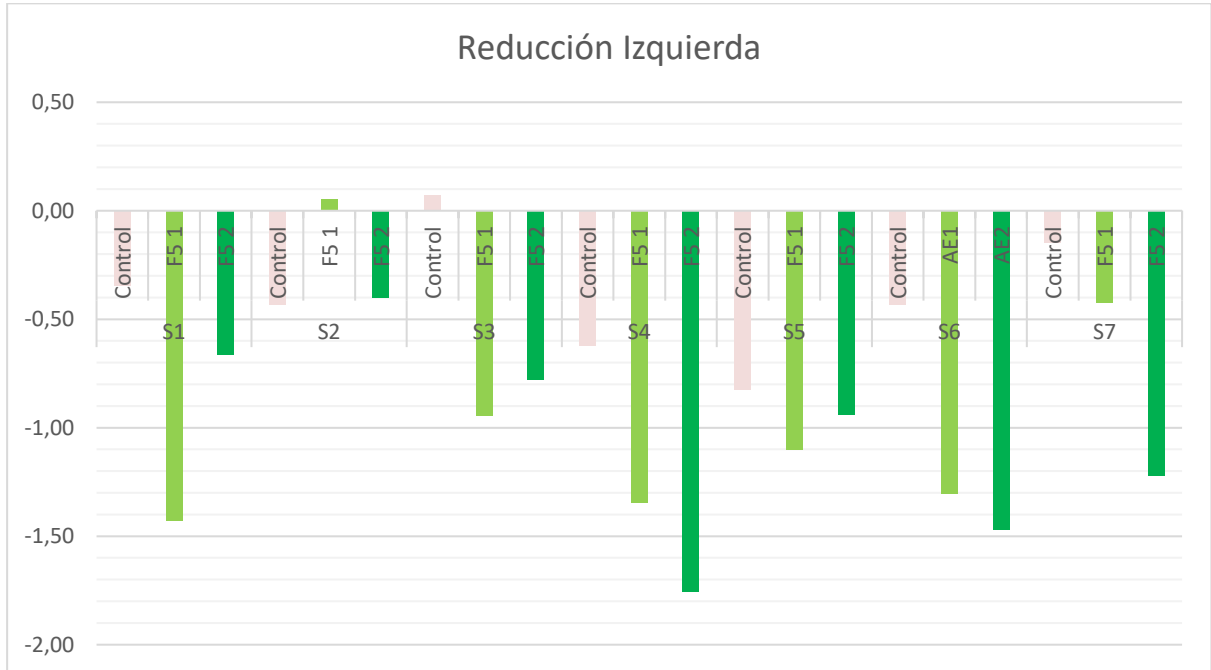


Figura 35: Reducción de mo en Log_{10} para mano izquierda

*Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden la reducción en escala logarítmica del conteo microbiológico para la mano izquierda, para cada sujeto (S1-S7) con respecto a la línea base.

Las gráficas y el análisis de los datos se realizan por cada sujeto y por cada mano, lo anterior debido a que a pesar de controlar muchas variables (todas las recomendaciones dadas a los participantes en el consentimiento informado), se observa que los datos son variables consecuencia de los diferentes hábitos que tienen las personas y por tal motivo la variabilidad en floras microbianas de la piel. Adicionalmente, la microbiota de la mano derecha puede ser diferente a la de la mano izquierda, dependiendo si la persona es diestra o no, debido a las diferentes actividades que pueden llegar a realizar con cada mano, es por estas razones que no se combinan los datos.

En general en las figuras 32, 33, 34 y 35 se observan los datos de recuentos en Log_{10} para cada una de las manos con respecto al promedio de las tres líneas bases tomadas, el control (fórmula sin aceites esenciales), F5 1 correspondiente al conteo realizado en el primer uso de la fórmula en evaluación F5 y F5 2 correspondiente al conteo realizado a los 5 días de haber utilizado el jabón tres veces por día; esta última determinación se realiza con el fin de evaluar si existe algún tipo de efecto acumulativo resultante de usar el producto por algunos días. Es importante resaltar que en la figura 34 y 35 se observa la reducción en unidades logarítmicas que hubo, en donde se destacan reducciones de hasta dos unidades para el jabón con aceite esencial, lo cual es una reducción importante.

En la figura 32 se puede observar el \log_{10} del conteo de la mano derecha para cada uno de los sujetos, la barra de color azul representa el promedio de los tres conteos para la línea base, la barra “rosa pálido” representa el conteo para el control, la barra verde claro representa el conteo inicial con el primer uso del jabón F5 y la barra verde oscuro representa el conteo final luego de 5 días de uso del jabón F5. Para poder evaluar mejor los resultados, se remite a la figura 34, en donde se muestran los resultados ya como reducciones con respecto a la línea base, es decir, el conteo del ensayo (ejemplo control) menos el conteo del promedio de la línea base por sujeto para la mano derecha. En dicha figura se puede observar que, en la mayoría de los análisis, con excepción de dos controles (sujeto 2 y sujeto 7), hubo una reducción microbiana con respecto a la línea base. Si se compara la reducción obtenida usando el jabón F5 con respecto al control se evidencia que el jabón sí tiene una mayor actividad antimicrobiana, ya que en general reduce más la población que con el control.

Finalmente, si se compara la reducción de microorganismos del primer uso del jabón F5 con la medida tomada luego de 5 días de su uso, no se encuentran datos muy congruentes, ya que en cuatro sujetos (S3, S4, S6 y S7) se presenta una reducción de microorganismos, es decir, se ve un efecto acumulativo por el uso continuo del jabón. Por otra parte, para los sujetos S1, S2 y S5 se observa un comportamiento diferente, es decir, el conteo luego de los 5 días de uso fue más alto que el conteo con el primer día de uso del jabón F5.

En la figura 33 se puede observar el \log_{10} del conteo de la mano izquierda para cada uno de los sujetos, la barra de color azul representa el promedio de los tres conteos para la línea base, la barra “rosa pálido” representa el conteo para el control, la barra verde claro representa el conteo inicial con el primer uso del jabón F5 y la barra verde oscuro representa el conteo final luego de 5 días de uso del jabón F5. Para poder evaluar mejor los resultados, se remite a la figura 35, en donde se muestran los resultados ya como reducciones con respecto a la línea base, es decir, el conteo del ensayo (ejemplo control) menos el conteo del promedio de la línea base por sujeto para la mano izquierda. En dicha figura se puede observar que, en todos los análisis, con excepción de un sujeto para el conteo del primer uso del jabón (sujeto 2) y un sujeto para el control (sujeto 3), hubo una reducción microbiana con respecto a la línea base. Si se compara la reducción obtenida usando el jabón F5 con respecto al control se evidencia que el jabón sí tiene una mayor actividad antimicrobiana, ya que en general reduce más la población que con el control.

Finalmente, si se compara la reducción de microorganismos del primer uso del jabón F5 con la medida tomada luego de 5 días de su uso, no se encuentran datos muy congruentes, ya que en cuatro sujetos (S2, S4, S6 y S7) se presenta una reducción de microorganismos, es decir, se ve un efecto acumulativo por el uso continuo del jabón. Por otra parte, para los sujetos S1, S3 y S5 se observa un comportamiento diferente, es decir, el conteo luego de los 5 días de uso fue más alto que el conteo con el primer día de uso del jabón F5.

Debido a que la reducción se calcula con respecto a la línea base de cada mano de cada persona, se hace un gran promedio, es decir, se promedian los resultados para todos los sujetos. Se muestra la figura 36 los datos obtenidos, con el fin de tener una mejor visual y poder dar una conclusión más general.

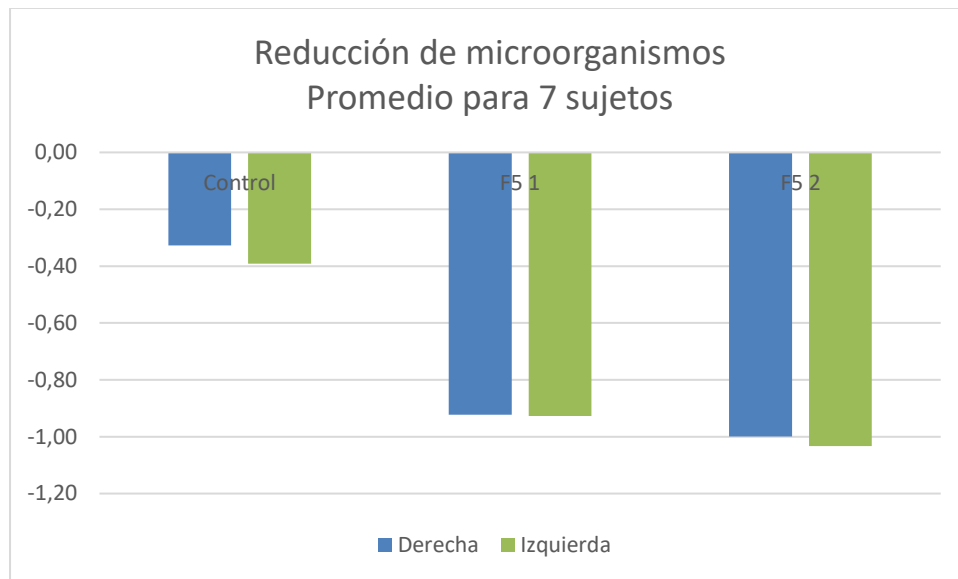


Figura 36: Reducción de microorganismos promedio para 7 sujetos (escala logarítmica)
 *Las unidades presentadas en la figura anterior corresponden la reducción en escala logarítmica del conteo microbiológico promedio con respecto a la línea base.

La figura 36 permite observar que efectivamente sí existe una mayor reducción de microorganismos con el uso del jabón (F5) formulado con 4% de aceite esencial de naranja y 1% de aceite esencial de canela, adicionalmente, permite evidenciar que en promedio sí existe un efecto acumulativo al obtener un menor conteo de microorganismos luego del uso durante 5 días, tres veces al día del jabón (F5). Lo anterior permite concluir que sí existe una diferencia entre el uso del control y un jabón formulado usando aceites esenciales. Las reducciones están alrededor de 1 unidad logarítmica, lo cual es un resultado significativo para el producto.

Finalmente, se muestra un ejemplo de cómo se observaron los conteos para los ensayos en los voluntarios, se visualiza una imagen del conteo de línea base, una imagen del conteo para control, una imagen del conteo para F5 1 (primer uso del jabón) y una imagen del conteo para F5 2 (conteo luego del uso por 6 días del jabón). También se muestra una imagen en la cual se hicieron siembras del jabón F5, del control, del suero de muestreo y del agua con la cual se lavaron las manos (agua potable). Dichos controles se sembraron con el fin de verificar que los materiales usados no estuvieran aportando microorganismos en la ejecución del ensayo, para todos los casos se observa no crecimiento.

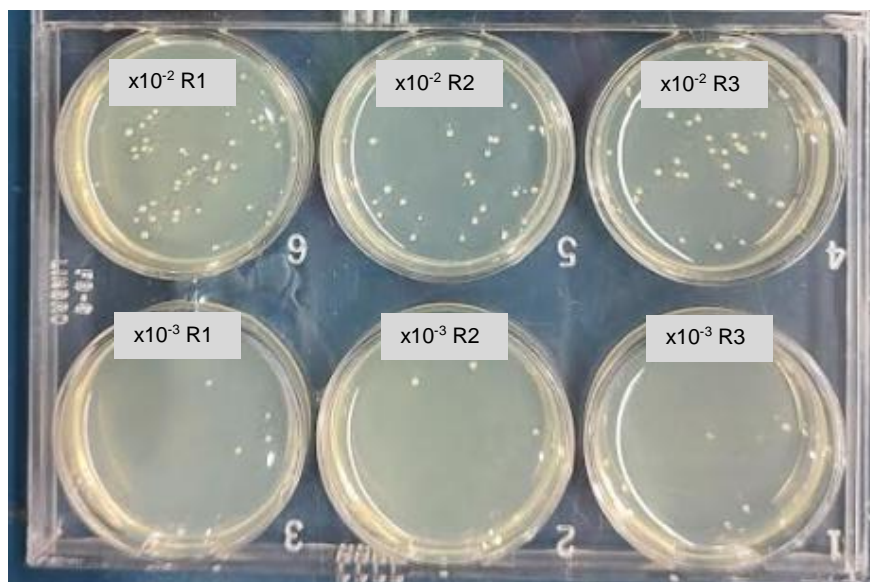


Figura 37: Resultados línea base 3, sujeto 4, mano derecha.

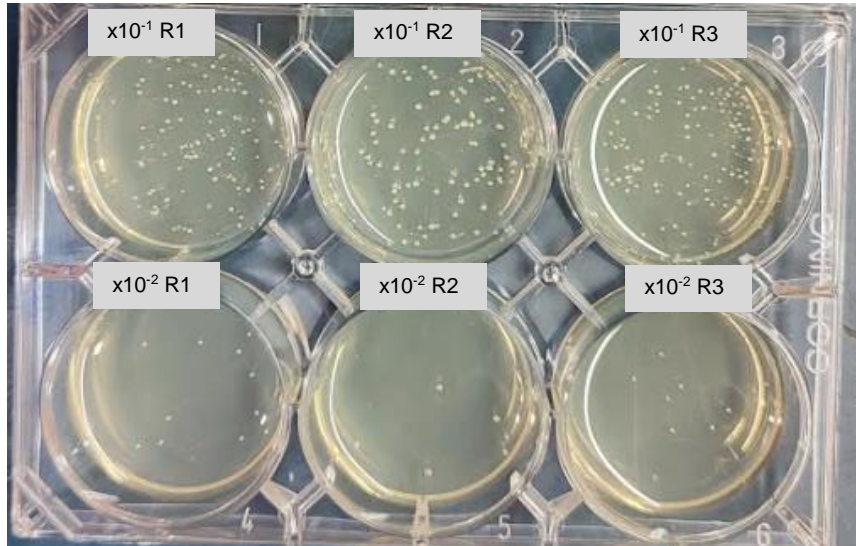


Figura 38: Resultados control, sujeto 4, mano derecha.

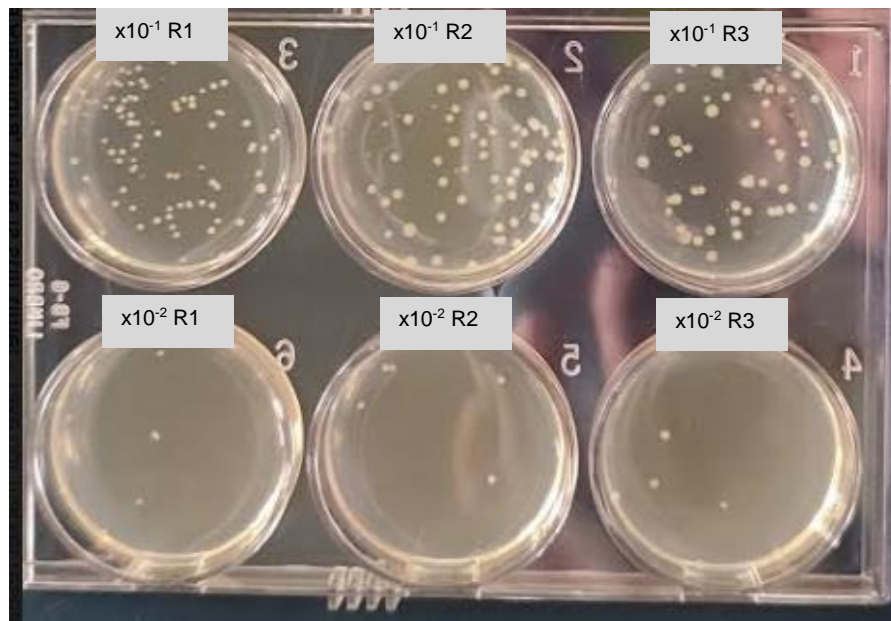


Figura 39: Resultado F5 1, sujeto 4, mano derecha.

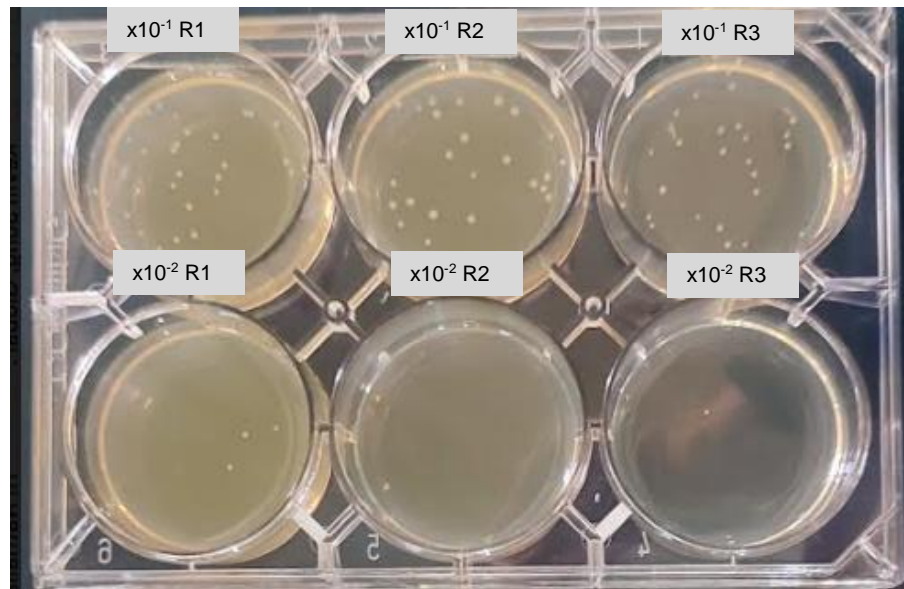


Figura 40: Resultados F5 2, sujeto 4, mano derecha.

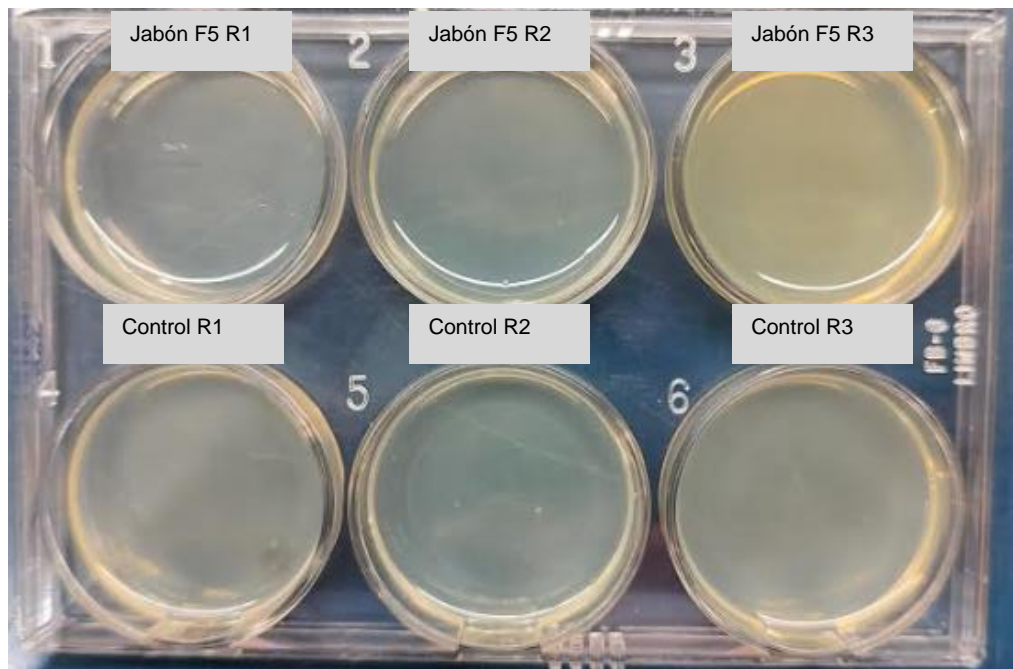


Figura 41: Siembra 100µL jabón F5 y control

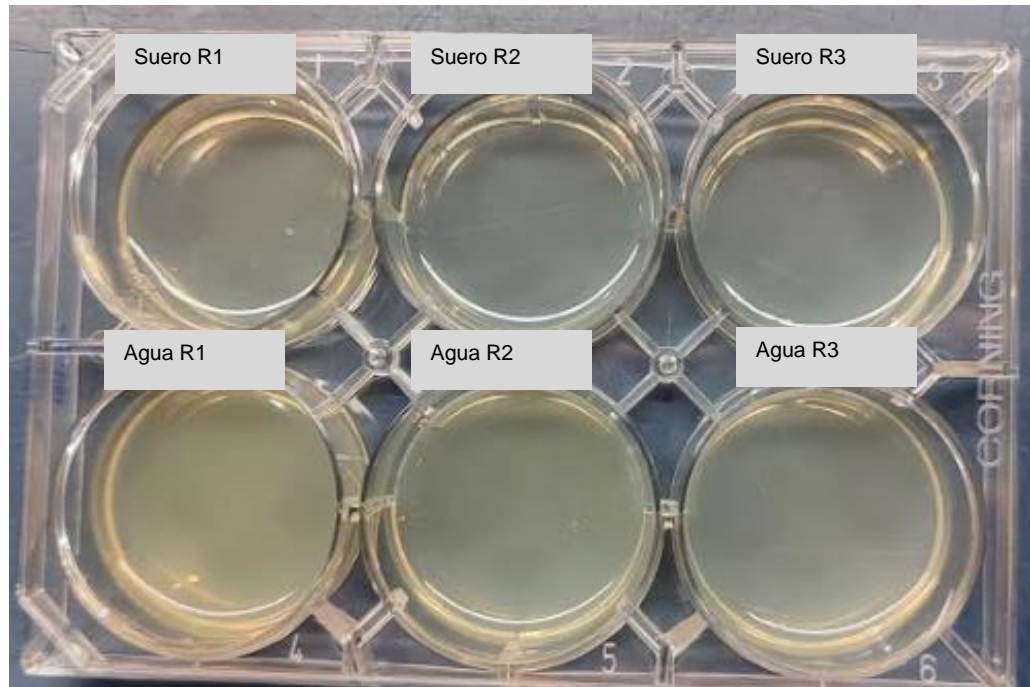


Figura 42: Siembra 100 μ L suero de muestreo y agua potable

Es importante revisar el concepto de seguridad para el producto final obtenido, por lo cual como primera medida se realizó la consulta de los ingredientes utilizados en la base de datos europea CosIng, la cual contiene información sobre cada ingrediente como la funcionalidad y el nombre INCI (International Nomenclature Cosmetic Ingredient), que corresponde a la forma en la cual se debe reportar el ingrediente para un producto cosmético. En la tabla 31 se muestra un resumen de cada componente de la fórmula final con su respectiva nomenclatura INCI y funcionalidad.

Tabla 31: componentes de la fórmula final con su respectiva nomenclatura INCI y funcionalidad.

Ingrediente	INCI Name	Funcionalidad
Agua	Water	Solvent
Texapon 40	Sodium Laureth Sulfate	Cleansing Surfactant - Emulsifying Foaming Surfactant - Cleansing
Tween 20	Polysorbate 20	Surfactant - Emulsifying Surfactant - Cleansing
Aceite Esencial De Naranja	Citrus Sinensis Valencia Peel Oil Expressed	Perfuming
Glicerina	Glycerin	Humectant Skin Conditioning Skin Protecting
Aceite Esencial De Canela	No se encuentra en la base de datos	No se encuentra en la base de datos
Euxyl™ K 100	Benzyl Alcohol Methylchloroisothiazolinone Methylisothiazolinone	Preservative

(Commission, 2023)

Con respecto a los aceites esenciales, se encontró en la base de datos (CosIng) el aceite esencial de naranja con funcionalidad de fragancia y el aceite esencial de canela no se encontró; lo anterior indica que dichos aceites esenciales no han sido incluidos con funcionalidad de antimicrobiano, lo cual es una oportunidad para que en un trabajo posterior se evalúe el trámite para incluir dichos materiales con esta funcionalidad, la cual está demostrada por la literatura y por ensayos como los del presente trabajo.

Adicionalmente se buscó certificados IFRA para los aceites esenciales utilizados, sin embargo, el fabricante no cuenta con dicho certificado, ya que no es una exigencia regulatoria en el país. No obstante, se consulta un certificado disponible para cada aceite esencial de un fabricante diferente al utilizado en el presente trabajo, con el fin de tener una referencia. IFRA es la sigla de "The International Fragrance Association", la cual es una asociación que se crea para garantizar la seguridad de estos compuestos hacia los consumidores. IFRA divide los productos en diferentes categorías según su tipo, la formulación en cuestión del presente trabajo clasificaría en la categoría 9, en la cual se incluyen productos de exposición corporal y de manos, principalmente de enjuague como jabones en barra, jabones líquidos, champús, acondicionador, Jabones corporales, geles de ducha, productos para bebés, baños, champús, espumas, mousses, sales, aceites y otros productos añadidos al agua del baño, limpiador para la cara, afeitado cremas, barras, geles, todos los depilatorios (incluidos los faciales) y ceras, productos para el cuidado de los pies (baño) y champús para mascotas.

Se encuentran los certificados para las dos especies de aceites esenciales de marca Ancient Wisdom, para el aceite esencial de naranja el porcentaje máximo de uso en la categoría 9 es de 40,0% (Wisdom, Dadyva, 2022) y para el aceite de canela el máximo nivel de uso es de 0,76% (Wisdom, Dadyva, 2022). También se encuentran certificados para la marca NHR, para los cuales para el aceite esencial de naranja el porcentaje máximo de uso en la categoría 9 es de 100,0% (NHR, 2023) y para el aceite de canela el máximo nivel de uso es de 0,2% (NHR, 2023).

De acuerdo con lo anterior el porcentaje de uso del aceite esencial de naranja no representa un problema para el producto final, sin embargo, si se debe revisar el porcentaje de uso del aceite esencial de canela, ya que algunos componentes de dicho aceite como el alcohol cinámico, aldehído cinámico y eugenol pueden ser alergénicos o presentar sensibilidad (Arribas, Soro, & Silvestre, 2012). De acuerdo a lo anterior vale la pena profundizar en trabajos posteriores si efectivamente el producto final puede ser sensibilizante o si es posible disminuir el porcentaje de uso del aceite esencial de canela conservando sus propiedades antimicrobianas, adicional también sería ideal buscar diferentes proveedores de dicho aceite que tengan el certificado IFRA en donde se pueda saber el porcentaje máximo de su uso. Es de aclarar que para el presente trabajo lo que se realizó para verificar que las personas no fueran sensibles al producto fue aplicar una porción de producto en el antebrazo durante 1 minuto, lo anterior con el fin de poder apreciar reacciones desfavorables, en caso de que llegase a existir alguna reacción como picor, enrojecimiento, ardor o irritación, se procedía a enjuagar el antebrazo con abundante agua y hacer seguimiento a la reacción, adicional el voluntario quedaría totalmente excluido del estudio. Adicional en caso de presentar alguna reacción la información debía ser evaluada y de ser necesario notificada al comité de ética dentro de un plazo de 15 días hábiles. Todo este proceder quedo registrado en el protocolo de consentimiento informado avalado por el comité de ética bajo el acta 10-2021. Durante la ejecución de los ensayos ninguno de los voluntarios presento ninguna reacción desfavorable. Adicionalmente, es de tener en cuenta que se trata de un producto de enjuague, lo cual disminuye el tiempo de contacto con la piel. Finalmente, los aceites esenciales utilizados se encuentran enlistados en los ingredientes GRAS "Generally recognized as safe" (Regulations, 2023).

Es de resaltar que, con respecto al trabajo previo realizado, el presente trabajo brinda un enfoque a la obtención de un producto final funcional, cuya actividad fue demostrada por medio de un panel de voluntarios. Adicional brinda más información con respecto a la actividad antimicrobiana frente a 4 cepas específicas *in vitro*.

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

1. Se evaluó el efecto sobre la actividad antimicrobiana por la incorporación de aceites esenciales en una formulación base de jabón líquido para manos por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo*, encontrando que los aceites esenciales aumentan la actividad antimicrobiana del jabón líquido para manos.
2. Se caracterizaron las formulaciones elaboradas y con base en sus propiedades organolépticas, físicas, relación de costos y actividad antimicrobiana, se define que la fórmula de mejor desempeño corresponde a la combinación de 4% aceite esencial de naranja y 1% aceite esencial de canela.
3. Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de las formulaciones propuestas, encontrando que los aceites de canela y naranja presentan actividad siendo mayor la actividad del aceite esencial de canela.
4. Se comprueba la actividad antimicrobiana de la formulación seleccionada por medio de un ensayo en voluntarios sanos, con el cual se concluye que existe una mayor reducción de microorganismos con el uso del jabón con respecto al control (jabón sin aceites esenciales), adicionalmente, se evidencia que existe un efecto acumulativo al obtener un menor conteo de microorganismos luego del uso durante 5 días, tres veces al día del jabón.

4.2 Recomendaciones

Con el fin de fortalecer la investigación resultante de este trabajo, se recomienda profundizar en la seguridad del producto final, evaluando si es sensibilizante o no, evaluando si es posible disminuir el porcentaje de uso del aceite esencial de canela conservando sus propiedades antimicrobianas. Se recomienda también continuar con el escalamiento del proceso, ya que es un producto que puede resultar interesante en el mercado. Se recomienda profundizar en la actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, ya que se mostraron resultados muy interesantes frente a dicho microorganismo.

A. Anexo 1: Resultados organolépticos

Se anexan los formatos firmados por los participantes y los formularios de evaluación diligenciados.

B. Anexo 2: Consentimientos informados

Se anexan los formatos de consentimiento informado firmados por los participantes del estudio *in vivo*.

C. Anexo 3: Cromatografía gases

Se anexa informe de cromatografía de gases.

D. Anexo 4: Resultados tamaño de gota

Se anexa informe de determinación de tamaño de gota.

5. Bibliografía

Vallejo Marisol, Parada Romina, Marguet Emilio. (2019). Aislamiento de cepas de *Enterococcus hirae* productoras de enterocinas a partir del contenido intestinal de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*). *Revista Argentina de Microbiología*. Asociación Argentina de microbiología.

AEMPPI. (2017). Los pasos para una técnica correcta de lavado de manos según la OMS. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/actualidad-sanitaria/los-pasos-para-una-tecnica-correcta-de-lavado-de-manos-segun-la-oms>

Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., & Pagán, R. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.04.004>

Almeida, R. S., Freitas, P. R., Araújo, A. C. J., Menezes, I. R. A., Santos, E. L., Tintino, S. R., Moura, T. F., Filho, J. R., Ferreira, V. A., Silva, A. C. A., Silva, L. E., Amaral, W. do, Deschamps, C., Iriti, M., & Coutinho, H. D. M. (2020). GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorífera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050247>

Alyson L, Y., & Jack, G. (2016). Is triclosan harming your microbiome? *Science*, 353(6297), 348–349. <https://doi.org/10.1038/nature.2015.19078>

Arévalo, J. M., Arribas, J. L., Hernández, J., & Herruzo, R. (n.d.). *Guía de utilización de antisépticos*. Retrieved May 23, 2019, from <https://www.sefh.es/fichadjuntos/Antisepticos.pdf>

Arribas, M., Soro, P., & Silvestre, J. (2012). *Dermatitis de contacto alérgica por fragancias. Parte II*. Elsevier, 29-37.

Ashland. (2023, 10 22). Retrieved from <https://www.ashland.com/industries/personal-and-home-care/hair-care/euxyl-k-100-preservative>

ASTM. (2011). *E1115 – 11: Standard Test Method for Evaluation of Surgical Hand Scrub Formulations*.

Barrientos, L., & Jorge, A. (2017). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de canela (Cinnamomum zeylanicum) en comparación a la clorhexidina al 0.12% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175* [Universidad Norbert Wiener]. [http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1492/titulo - Luis Barrientos%2C Angel Jorge.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1492/titulo_Luis_Barrientos%2C_Angel_Jorge.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Berganza, I. (2003). *Microbiota predominante en manos y uñas de cirujanos y personal paramédico de las áreas de cirugía, recién nacidos y post parto en un hospital nacional de Guatemala* [Universidad de San Carlos de Guatemala]. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2199.pdf

Bilbao, N. (2009). Antisépticos y desinfectante. *Farmacia comunitaria*, Vol 23, Numero 4.

Bilek, H., Deveci, A., Ünal, S., Tanrıverdi, Y., & Tanyel, E. (2020). *Enterococcus hirae* as a cause of bacteremic urinary tract infection: first case report from Turkey. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 14(12), 1480–1482.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Cabral, C., & Hernández, R. (2016). Efectos citotóxicos de gluconato de clorhexidina en células epiteliales. *Revista Mexicana de Estomatología*, 3(1), 20–28. <https://www.remexesto.com/index.php/remexesto/article/view/55/86>

Castañeda, D., Rivera, A., Choy, E., Munguía, R., Portillo, R., & Muñoz, J. (2018). Actividad antimicrobiana del aceite de naranja residual. *UNED Research Journal*, 469-474.

Cerna, L., & Rorres, J. (2020). Obtención de aceite esencial a partir de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* Var. Valencia) utilizando un sistema de hidrodestilación convencional acoplado a un equipo de microondas para su extracción óptima. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 61(1), 28–40.

Chimborazo, E. s. (2021). práctica no.6 aislamiento por agotamiento por siembra en estrías.

Commission, E. (2023, 10 04). CosIng - Cosmetics Ingredients. Retrieved from <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>

Commission, E. (2023, 10 09). Scientific Committees. Retrieved from https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/triclosan/es/glosario/a-bc/antimicrobiano.htm

Díaz, F., & Galvis, M. (2014). *Diseño y evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando como principio activo aceites esenciales de Eugenia caryophyllata T., Cinnamomum verum y Thymus vulgaris L.* Universidad de Cartagena.

Ernawita. (2013). composition and antimicrobial activity of crude extracts and essential oil of callistemon viminalis leaves. *Jurnal Biologi Edukasi*, 2, 47–50.

FDA. (2016). *FDA issues final rule on safety and effectiveness of antibacterial soaps.* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-issues-final-rule-safety-and-effectiveness-antibacterial-soaps>

Fernández, A. (2006). *Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W.* Universidad de Granada.

García, M., & Uruburu, F. (2010). Preservación de microorganismos por congelación. In Y. Ocares, & J. Castro. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA.

Gomber, C., & Saxena, S. (2007). Anti-staphylococcal potential of Callistemon rigidus. *Central European Journal of Medicine*, 2(1), 79–88. <https://doi.org/10.2478/s11536-007-0004-8>

Guía para Planificadores. Día mundial del lavado de manos 15 de octubre. (2009). http://www.bvs.hn/local/File/Global_Handwashing_Day_2nd_Edition_espa.pdf

Idawati, S., Suhada, A., Asri, R., & Arini, S. (2023). Antibacterial activity test of celery leaf (apium graveolens) extract liquid hand soap against staphylococcus aureus. *j. pijar mipa*, 98-104.

INVIMA. (2023, 10 09). Cosméticos. Retrieved from <https://www.invima.gov.co/en/cosmeticos>

INVIMA. (2023, 10 09). Recomendaciones para el uso de jabones antibacteriales de uso cosmético. Retrieved from <https://www.invima.gov.co/en/recomendaciones-para-el-uso-de-jabones-antibacteriales-de-uso-cosmetico>

Juárez, J., Castro, A., Jaúregui, J., Lizano, J., Carhuapoma, M., Choquesillo, F., Félix, L., Cotillo, Pedro, López, J., Jaramillo, M., Córdova, A., Ruíz, J., & Ramos, N. (2010). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *ciencia e investigación*, 13(1), 9–13.

Kenanga, G., & Saraswati, M. (2021). effectiveness of antibacterial soap combination of sweet orange peel essential oil and basil leaves. *citra*, 2776-3250.

Laboratorio de Aromas. (2022). *Informe de resultados IESQ-034-22*.

López, L., Gutiérrez, I., Menéndez, E., Aresté, N., Morató, L., & Pérez, S. (2014). Introducción a los antisépticos. *Atención Primaria*, 46, 1–9. <https://pdf.sciencedirectassets.com/277730/1-s2.0-S0212656714X70071/1-s2.0-S0212656714700551/main.pdf?x-amz-security-token=AgoJb3JpZ2luX2VjECAaCXVzLWVhc3QtMSJGMEQCIEqz8bh%2Fcq3ExeX%2BunNBjK%2BeDg30%2FxFMpjwjJi4SIVSNAiBHaPWJ16AXxrLVrViFB5XTGTQgMbQE0sht3N89>

Malbrán, C. (2012). Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Clinical and Laboratory Standars Institute*, Vol 32 No 2.

Malvern. (2023, 09 28). Marvern Analytical. Retrieved from <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range#:~:text=Los%20instrumentos%20de%20la%20familia,del%20ingl%C3%A9s%20Dyname%20Light%20Scattering>.

Mizushina, Y., & Kuriyama, I. (2016). Suppressive Effects of Sesquiterpenes from EO–USB on *Escherichia coli* Growth. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 317–324.

Matiz, G. (2018). *Formulación de Productos Comesticos - Clase diseño de formas cosméticas*. Bogotá.

MINSALUD, I. y. (2023, 10 09). Normas farmacológicas. Ministerio de salud y protección. Retrieved from <https://www.invima.gov.co/documents/20143/1382801/Normas+farmacologicas+MARZO+2023.pdf>

Nafisah, U., Suhesti, I., & Albetia, P. (2022). Formulation and anti-bacterial of liquid soap combination of Citronella (*Cymbopogon nardus* L. Rendle), Cinnamon (*Cinnamomum burmanni* Ness Ex Bi.), and Orange Lemon (*Citrus lemon* L.) Essential Oils on *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Ilmu Farmasi*, 63-70.

Nemichand, S., & Laxman, S. (2017). Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1):39-47.

Neuquen, D. d. (2021). *Procedimientos de Microbiologia General*. Neuquen.

NHR. (2023, 10 08). IFRA Conformity Certificate Organic Cinnamon Leaf Essential Oil (*Cinnamomum zeylanicum*). Retrieved from https://www.nhrorganicoils.com/uploads/20181005135227e_Cinnamon_Leaf_IFRA_48.pdf

NHR. (2023, 10 08). IFRA Conformity Certificate Organic Sweet Orange Essential Oil (*Citrus sinensis*). Retrieved from

https://www.nhrorganicoils.com/uploads/20220414142109e_Orange_IFRA_50.pdfOMS. (2004). *Formulario Modelo de la OMS*. <http://mednet3.who.int/eml>

Organización Panamericana de la Salud. (2023, 10 20). Organización Panamericana de la Salud. Retrieved from <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos#collapse5>

Osorio Fortich, M. D. R., Matiz Melo, G. E., León Méndez, G., López Olivares, D., & Pájaro, N. P. (2017). Evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando algunos aceites esenciales como agente activo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67954>

Panizo, M., & Reviákina, V. (2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2), 38–45.

Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2).

Perez, H., & Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Medica*, 186-191.

Pires, C. H., Paula, J. A. M. de, Tresvenzol, L. M. F., Ferri, P. H., Fiuza, T. de S., & Bara, M. T. F. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of leaves and flowers of *Callistemon viminalis* (sol ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(4), 597–601.

Qingyun, G., Ke, L., Weihui, D., Balian, Z., Wenxia, Y., & Jiong, C. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel essential oils. *Wiley Food Science & Nutrition*, 6, 1431–1437.

Question Pro. (2023, 10 21). Retrieved from <https://www.questionpro.com/blog/es/pruebas-monadicas/>

Rai, K., & Bhushan, S. (2020). Effect on essential oil components and wedelolactone content of a medicinal plant *Eclipta alba* due to modifications in the growth and morphology under different exposures of ultraviolet-B. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(4), 773–792.

Reglamento (UE) No 1004/2014 de la comisión de 18 de septiembre de 2014, (2014). <https://www.boe.es/doue/2014/282/L00005-00008.pdf>

Regulations, C. o. (2023, 10 08). Substances Generally Recognized as Safe. Retrieved from <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-E/part-582>

Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, s. (2012). Procedimientos para extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.

- Rosaura, T. (n.d.). *Higiene de manos en los centros sanitarios*. https://www.seguridadelpaciente.es/resources/documentos/HigieneManos/Extremadura/hm_centrossanitarios_doc_directivos.pdf
- Rueda, Y., Mancilla, L., & Parada, P. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). *BISTUA (Revista de La Facultad de Ciencias Básicas)*, 5(1), 3–8.
- Saxena, S., & Gomber, C. (2006). Antimicrobial Potential of *Callistemon rigidus*. *Pharmaceutical Biology*, 44(3), 194–201. <https://doi.org/10.1080/13880200600685899>
- Siddique, S., Parveen, Z., Firdaus-e-Bareen, Mazhar, S., Chaudhary, M. N., & Saeed, K. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential oil from *Callistemon viminalis* (Gaertn.) G. Don Leaves. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(2), 524–534. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1289126>
- Tránsito, L. (2004). Los aceites esenciales. *Ambito Farmacéutico, Fitoterapia*, 23(7), 88–91. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13064296>
- Universidad Autonoma, d. M. (2023, 10 21). Media Campus. Retrieved from <https://mediacampus.cuaieed.unam.mx/node/4254>
- Villaverde, I. (2018). Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- V. Seija, R. V. (2006). Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica.
- Wesgate, R., Grasha, P., & Maillard, J.-Y. (2016). Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage. *American Journal of Infection Control*, 44(4), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.009>
- Wisdom, C. I. (2022, 09 26). Dadyva. Retrieved from <https://dadyva.com/wp-content/uploads/2019/10/EOB-21-IFRA-Certificate-showing-IFRA-Components.pdf>
- Wisdom, C. I. (2022, 09 26). Dadyva. Retrieved from <https://www.aw-dropship.com/attachment.php?id=11123>
- Xiang, Y.-Q., Liu, H.-X., Zhao, L.-Y., Xu, Z.-F., Tan, H.-B., & Qiu, S.-X. (2017). Callistemonone A, a novel dearomatic dibenzofuran-type acylphloroglucinol with antimicrobial activity from *Callistemon viminalis*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02441-5>
- Zhang, H., Zhu, Z., Wu, Z., Wang, F., Xu, B., Wang, S., & Zhang, L. (2023). Investigation on the formation and stability of microemulsions with Gemini surfactants: DPD simulation. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 44:4, 698-707.