



FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES

Universidad Nacional de La Pampa

# **Emulsión de aplicación cosmética con aceites esenciales de dos especies aromáticas**

MANZO, Victoria

**TESINA PARA OBTENER EL GRADO  
ACADÉMICO DE LICENCIADO EN QUÍMICA**

SANTA ROSA, (LA PAMPA)

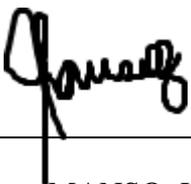
ARGENTINA

Abril, 2020

## PRÓLOGO

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para alcanzar el grado académico de Licenciado en Química de la Universidad Nacional de La Pampa. Este es un trabajo original, no ha sido presentado previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química-FCEyN-UNLPam, durante el período comprendido entre Marzo 2019 y Marzo 2020, bajo la Dirección de la Dra. Marisol Minig y la Co-Dirección de la Dra. Mónica Bellozas Reinhard.

30 de abril, 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Victoria Manso', written over a horizontal line.

Firma MANSO, Victoria

## AGRADECIMIENTOS

Solo diré:

Gracias a la Universidad Pública.

Gracias a mi Directora Marisol Minig, Co-Directora Mónica Bellozas y al Dr. Carlos Moldes por poner al servicio toda su formación académica y personal.

Gracias a Natalia Lazzarini y Andrea Costantino de la Universidad Nacional del Sur.

Gracias a Nahuel Scarone del área de Bacteriología del Hospital “Dr. Lucio Molas” quien se puso a disposición de lo que necesitara y me proveyó de insumos indispensables para este trabajo.

Gracias al tribunal evaluador por sus aportes.

Gracias a mi familia y amigas por bancarme siempre.

Gracias a mi compañero de vida por redescubrirse conmigo.

Di todo. E hice lo mejor que pude.

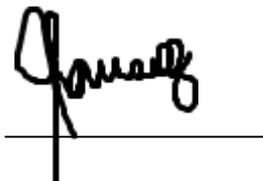
Por eso:

Infinitas GRACIAS a todos los que hicieron posible que llegue hasta acá.

Se abre el telón y estoy lista.

Ojalá disfruten tanto como yo lo que sigue a continuación.

¡GRACIAS!



Firma MANSO, Victoria

30 de abril, 2020

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	3
SUMMARY	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
Reino vegetal y cosmética	6
Composición de las plantas: principios activos y su potencialidad química	6
Aceites esenciales. Aplicación en cosmética	7
Aceites esenciales de especies vegetales en la región semiárida pampeana con potencial uso cosmético	8
Emulsiones cosméticas	8
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Obtención de aceites esenciales de <i>Baccharis spartioides</i> y <i>Poncirus</i>	12
Caracterización química de los aceites esenciales	14
Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	14
Elaboración de emulsiones cosméticas	15
Determinación de parámetros físico-químicos las emulsiones cosméticas	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Rendimientos porcentuales de aceites esenciales	19
Caracterización química de aceites esenciales	19
Actividad antimicrobiana de aceites esenciales	20
Elaboración de emulsiones cosméticas	24
Determinación de parámetros físico-químicos las emulsiones cosméticas	25
Incorporación de aceite esencial a la emulsión cosmética desarrollada	27
CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS	29

## **INDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1A. Especie vegetal <i>Baccharis spartioides</i>	13
FIGURA 1B. Especie vegetal <i>Poncirus trifoliata</i>	13
FIGURA 2. Extractor de aceites esenciales a escala de laboratorio FIGMAY S.R.L	13
FIGURA 3. Escala de Balance Hidrofilico-Lipofilico (HBL)	18
FIGURA 4A. Ensayo de difusión en disco. Aceite esencial de <i>Baccharis spartioides</i> frente a <i>Staphilococcus aureus</i>	21
FIGURA 4B. Ensayo de difusión en disco. Aceite esencial de <i>Poncirus trifoliata</i> frente a <i>Staphilococcus aureus</i>	21
FIGURA 5. Análisis de regresión del índice de porcentaje de inhibición de crecimiento de limoneno y <i>Baccharis spartioides</i>	24
FIGURA 6. Emulsión número 2	27

## **INDICE DE TABLAS**

TABLA 1. Composición química de la emulsión número 1	16
TABLA 2. Composición química de la emulsión número 2	17
TABLA 3. Componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de <i>Baccharis spartioides</i>	19
TABLA 4. Componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de <i>Poncirus trifoliata</i>	20
TABLA 5. Cuantificación de limoneno en los aceites esenciales de <i>Baccharis spartioides</i> y <i>Poncirus trifoliata</i>	20
TABLA 6. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de limoneno y <i>Baccharis spartioides</i> frente a <i>Staphilococcus aureus</i>	22
TABLA 7. Parámetros físico-químicos de las emulsiones 1 y 2	25

## RESUMEN

El Reino vegetal ofrece innumerables beneficios que el hombre ha sabido aprovechar. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue formular una emulsión estable del tipo W/O con el agregado de AEs de dos plantas aromáticas provenientes de la región semiárida pampeana, *Baccharis spartioides* y *Poncirus trifoliata*.

Los AEs de las especies vegetales se obtuvieron por arrastre de vapor y caracterizados por CG-MS. Los componentes mayoritarios en *B. spartioides* fueron limoneno (44%) y espatulenol (12%) y en *P. trifoliata*: limoneno (62%) y beta-pineno (24%).

Se ensayó la actividad antimicrobiana de los AEs frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los resultados de *B. spartioides* fueron de 10.5 mm que se corresponde con un 35.6% de inhibición para volúmenes de 5 y 6  $\mu\text{L}$  de AEs. *P. trifoliata* mostro diámetros menores, 7.5 mm y un 24.2% para volúmenes de 6 y 7  $\mu\text{L}$  de AEs. Los diámetros de halo fueron inferiores a 20 mm, esto indica una sensibilidad intermedia que se clasifica como bacteriostática para ambos AEs frente a *S. aureus*.

Se logró la estabilidad de la emulsión cosmética con una agitación de 300 rpm durante 1 hora y la acidificación a pH 5.5. El agregado de 0.5% de AEs a la formula total de la emulsión permitió obtener un aroma agradable.

## SUMMARY

The vegetable kingdom offers innumerable benefits that man have known how to take advantage of. In this sense, the objective of the present work was to formulate a stable emulsion of the W / O type with the addition of AEs from two aromatic plants from the Pampa semiarid region, *Baccharis spartioides* and *Poncirus trifoliata*.

The AEs of the plant species were obtained by steam entrainment and characterized by CG-MS. The main components in *B. spartioides* were limonene (44%) and spatulenol (12%) and in *P. trifoliata*: limonene (62%) and beta-pinene (24%).

The antimicrobial activity of the AEs was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The results of *B. spartioides* were 10.5 mm, which corresponds to a 35.6% inhibition for volumes of 5 and 6  $\mu\text{L}$  of AEs. *P. trifoliata* showed smaller diameters, 7.5 mm and 24.2% for volumes of 6 and 7  $\mu\text{L}$  of AEs. The halo diameters were less than 20 mm, this indicates an intermediate sensitivity that is classified as bacteriostatic for both AEs against *S. aureus*.

Stability of the cosmetic emulsion was achieved with stirring at 300 rpm for 1 hour and acidification to pH 5.5. The addition of 0.5% AEs to the total emulsion formula allowed obtaining a pleasant aroma.

## LISTA DE ABREVIATURAS

g	Gramo
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
mg	Microgramo
μL	Microlitro
m	Metro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
min	Minuto
eV	Electronvolt
V	Volt
Vol	Volumen
°C	Grados centígrados
%	Porcentaje
p/p	Peso en peso
v/v	Volumen en volumen
h	Hora
rpm	Revoluciones por minuto
AEs	Aceite esencial
AM	Amikacina
AMH	Agar Muller-Hinton
UFC	Unidades formadoras de colonias
BsAE	Aceite esencial de <i>Baccharis spartioides</i>
CMH	Caldo Muller-Hinton
HBL	Balance Hidrofilico-Lipofilico
Lim	Limoneno
PtAE	Aceite esencial de <i>Poncirus trifoliata</i>
CG/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a detector masa
W/O	Agua en aceite

## 1. INTRODUCCIÓN

### **Reino vegetal y cosmética.**

A medida que avanzan las investigaciones científicas actuales, se ratifica la sabiduría de las civilizaciones antiguas que utilizaron las plantas para mantener la salud y la belleza de la población (Ferraro *et al.*, 2012). El término “cosmético” data del siglo XVII, en donde la primera prueba arqueológica del uso de cosméticos se encontró en el Antiguo Egipto. Dicho mercado comenzó con un nicho de consumidores de un *status* social elevado centrándose en los aromas y propiedades curativas de las plantas, hierbas y flores (Chaudhri *et al.*, 2009).

Debido a las numerosas propiedades que encontramos en las distintas especies vegetales (Shankar Raut, 2014), es que cada día se intenta regresar a su uso y a revalorizar conocimientos ancestrales al utilizar aceites vegetales, frutas, hierbas, leche de miel entre otros dentro de formulaciones para lograr que la evolución de la nueva cosmética esté dirigida hacia lo natural. De acuerdo con una investigación realizada por la Universidad Internacional de Mónaco, durante 2011, y luego de muchos años en los que la medicina/farmacia convencional y la perfumería se han valido de productos sintéticos para sus fines, se evidencia en todo el mundo un renovado interés por los productos naturales. La tendencia hacia la cosmetología natural es parte de la economía del mundo, ya que proporciona ventajas relacionadas con la salud, el medio ambiente, el consumo responsable y el costo económico (Ferraro *et al.*, 2012).

### **Composición de las plantas: principios activos y su potencialidad química.**

Las plantas son organismos que tienen una gran adaptación a las condiciones ambientales en que se desarrollan. Se defienden y responden de manera precisa al estrés biótico o abiótico al que se encuentran expuestas (Kaufmann *et al.*, 1999; Dewick, 2009). Esto se relaciona con su capacidad de sintetizar un rango muy amplio de metabolitos. En fisiología vegetal es común distinguir entre dos tipos de metabolismo: primario y secundario, en esta oportunidad pondremos especial enfoque en el metabolismo secundario. Inicialmente fueron considerados no esenciales, pero se ha constatado que su producción se modifica rápidamente de acuerdo a las condiciones ambientales en las que se desarrollan y prosperan las plantas. Por lo que son de importancia para las especies vegetales (Torsell, 1997; Gobbo Neto y Lopes, 2007; Dewick 2009).

Desde el punto de vista químico estos compuestos biosintéticos pertenecen a las familias de los terpenos, fenilpropanoides, norisoprenoides y de los compuestos derivados de ácidos grasos. Los terpenos volátiles son la clase más estudiada, debido al gran número de componentes identificados,

así como a la amplia variedad de roles ecológicos y biológicos que se les ha atribuido (feromonas, atractivos, defensas químicas, antimicrobianos, antioxidantes, alelopáticos, etc.) (Baldwin *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Loreto *et al.*, 2014).

Entonces, podemos valernos de una gran variedad de principios activos que brindan las especies vegetales para utilizarlas como componentes activos dentro de las formulaciones cosméticas. Jugos de plantas y semillas, extractos de hierbas e hidrolatos y aceites esenciales (AEs). Especialmente éstos últimos, presentan un interés particular por sus múltiples aplicaciones en farmacia, gastronomía o cosmética.

### **Aceites esenciales. Aplicación en cosmética.**

Los AEs son incorporados a una formulación cosmética como componente activo por su biodiversidad y riqueza en componentes volátiles (en mayor proporción terpenos) de composición compleja y volátil. Los terpenos en general se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que forman su estructura en: hemiterpenos (5 carbonos, 1 unidad), monoterpenos (10 carbonos, 2 unidades), sesquiterpenos (15 carbonos, 3 unidades), diterpenos (20 carbonos, 4 unidades), sesterpenos (25 carbonos, 5 unidades), triterpenos (30 carbonos, 6 unidades) y tetraterpenos (40 carbonos, 8 unidades). Obtenidos en su mayoría por arrastre de vapor de agua (Bohlmann y Keeling, 2008; Dewick, 2009).

En la actualidad, los AEs son una fuente alternativa de agentes de control microbianos, ricos en compuestos con actividad biológica, son biodegradables y se transforman en productos no tóxicos al ser adecuados para su uso en los programas de control integral de plagas (Ochoa *et al.*, 2017). La actividad antimicrobiana como por ejemplo la de limoneno, esta explicada por varios mecanismos de acción; estos incluyen, daño en la estructura y función de la membrana, inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, interferencia de procesos metabólicos esenciales, inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos y la interrupción en la comunicación celular normal, entre otros. Estos mecanismos de acción pueden verse influenciados por varios factores, como las características de las células bacterianas (bacterias Gram positivas y negativas), condiciones ambientales y fisicoquímicas (hidrofobicidad, concentración del compuesto, temperatura y pH) (Radulovic *et al.*, 2013). De éste modo inhiben el crecimiento de bacterias transitorias comúnmente encontradas en piel como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*. Por ejemplo *S. aureus* es capaz de producir infecciones bacterianas como el síndrome de piel escaldada (Flores *et al.*, 2014). Así los AEs incorporados en formulaciones cosméticas han ganado la aceptación en la industria química y farmacéutica como alternativa a los compuestos

sintéticos existentes como los agentes químicos capaces de retardar el crecimiento de microorganismos (Shankar Raut et al., 2014). Un ejemplo de ello es el uso de AEs de marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) y paico (*Chenopodium ambrosioides* L.) en la formulación de un jabón líquido antibacteriano (Martínez et al., 2013).

## **Aceites esenciales de especies vegetales en la región semiárida pampeana con potencial uso cosmético.**

Una de las especies en creciente estudio, es *Baccharis spartioides*. Es una especie del género Asteraceae, cuyo nombre vulgar es pichana. Se extiende en Argentina desde Jujuy a Santa Cruz, y se encuentra presente en campos bajos salinos de la llanura pampeana. Es estudiada por su composición química y actividad biológica, para generar nuevos fármacos (Oliva et al., 2007). Los distintos municipios las han sabido utilizar para generar escobas, pichana proviene del quechua que significa “con lo que se limpia”. La fricción con el suelo al barrer desprendía el aroma y podía ser utilizada como ahuyentador de plagas (Dalmaso et al., 2016).

Otra de las especies estudiadas en esta investigación es *Poncirus trifoliata* (Rutaceae), también conocida como naranja trifoliada, estrechamente emparentada a los cítricos. Es un arbusto caducifolio o semicaducifolio, originario de China y Corea, que también se encuentra introducida y naturalizada en la llanura pampeana. Tradicionalmente, en su lugar de origen, estos frutos se han utilizado ampliamente en medicamentos populares para patologías como gastritis, disentería, inflamaciones, úlceras digestivas, entre otras (Tundis et al., 2016). Rahman y colaboradores (2008), han revelado sus actividades antiinflamatorias y antibacterianas entre otras.

Ambas especies vegetales contienen AEs ricos en compuestos químicos con potencial uso cosmético. La bibliografía reporta que éstos, contienen elevadas concentraciones de limoneno dentro de su composición como componente mayoritario. Esto da indicio de sus múltiples aplicaciones, pero dentro de las cuales se destaca la actividad antimicrobiana (Oliva et al., 2007; Tundis et al., 2016).

## **Emulsiones cosméticas.**

La industria química-farmacéutica se ha valido del conocimiento de las propiedades de las plantas a lo largo de la historia y a redirigido sus investigaciones con el fin de lograr formulaciones amigables con el medio ambiente. Acrecentar la producción de cosméticos naturales a partir de la formulación de emulsiones, dada su aceptabilidad y fácil aplicación (Minero y Díaz, 2017).

Las emulsiones se definen como mezclas termodinámicamente inestables de dos líquidos esencialmente inmiscibles de naturaleza polar (acuosa) y apolar (oleosa) en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño que se denomina fase dispersa o interna y el otro, fase continua o externa. Se caracterizan, además, por la presencia de un tercer componente que es el agente emulsionante, una sustancia anfifílica que facilita la formación de la emulsión y disminuye la tensión interfacial entre la fase polar y apolar. Esta sustancia, es la que le otorga estabilidad a la formulación, cuya estabilidad, será mayor o menor en función de la composición química y su manipulación durante el proceso de elaboración del formulado (Muñoz *et al.*, 2015).

Generalmente una de las problemáticas más comunes es determinar cuál es el agente emulsionante adecuado. Para resolver esta situación, Griffin y colaboradores (1949), notaron que existía una relación entre la naturaleza físico-química de un surfactante y sus propiedades como agente tensioactivo y emulsionante. Así se introdujo el concepto de HBL (Balance Hidrofílico-Lipofílico), que explica la afinidad del emulsionante a la fase polar y apolar dentro de una formulación. Consiste en otorgar un valor numérico a los agentes emulsionantes a partir de la/las cadenas hidrocarbonadas que presenten. Esto nos permite obtener diferentes emulsiones como por ejemplo, dispersantes transparentes, dispersantes lechosas, detergentes, dispersantes estables, dispersantes estables y humectantes etc. Cada emulsión se corresponderá entonces con un valor de HBL característico.

Es una medida relativa de la contribución de cada región de la molécula del surfactante que se mide en una escala arbitraria de 1 a 20 (a valores más altos de la escala, el compuesto es hidrofílico y a valores más bajos de la escala el compuesto es lipofílico). Ejemplos como el monolaurato de sorbitano (Span 20) y polisorbato (Span 80), con sus respectivas moléculas químicas  $C_{18}H_{34}O_6$  y  $C_{24}H_{44}O_6$ , dan cuenta de esto ya que cuanto más hidrofóbica es la molécula, presentara valores de HBL menores.

La correcta selección de los componentes de la formula teniendo en cuenta el HBL nos permitirá lograr infinidad de diferentes tipos de emulsiones (Ferraro *et al.*, 2012).

Dentro de los componentes principales de una emulsión encontramos aquellos que son necesarios para la formulación pero que no tienen un rol principal. Como ejemplo de esto último, se encuentran los agentes conservantes, antioxidantes, agentes estructurales que influyen en la viscosidad, solventes que permiten la disolución de activos y emulsionantes que contribuyen a mantener la estabilidad (Ferraro *et al.*, 2012). Y los que son cosméticamente activos (brindan la función deseada a la formulación) como por ejemplo los AEs. La legislación Europea (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) recomienda incorporarlos en proporciones que pueden variar de 1 a 5% de la formula total del producto cosmético, esto dependerá de su pureza al utilizarse, su composición química, frecuencia de uso del producto y zonas de aplicación. Se deberá considerar el

contenido de agua de la piel, que es importante para proteger la misma de daños climáticos, medioambientales o mecánicos, así como también preservar su pH normal. En el manto ácido de la piel, el pH varía entre 4.5 y 5.9 en la superficie, y depende en gran parte del contenido de ácido láctico y ácido urocánico provenientes del sudor, aminoácidos dicarboxílicos (glutámico-aspártico) y ácidos grasos libres de bajo peso molecular (propiónico, butírico y pentanoico) (Mendoza *et al.*, 2018). Las emulsiones espesas o mantecosas, son estudiadas por aportar humectación intensa y prolongada, dando el agua justa que precisa la piel al conservar la humedad, propiedad que le otorgan los aceites, ceras y sus derivados (Allen, 2010).

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### **Objetivo general.**

Formular una emulsión estable del tipo W/O con el agregado de aceites esenciales provenientes de dos especies vegetales, *B. spartioides* y *P. trifoliata*.

### **Objetivos específicos.**

- Obtener aceites esenciales de *B. spartioides* y *P. trifoliata*.
- Determinar la composición química de los AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata*.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata*.
- Determinar las propiedades físico-químicas de los formulados.

### **Hipótesis.**

La selección del sistema emulsionante dará como resultado una manteca corporal humectante del tipo W/O y estable con la incorporación de aceites esenciales de *B. spartioides* y *P. trifoliata*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Reactivos.**

##### ***Inhibición del crecimiento microbiano.***

Amikacina, discos de 30 µg; agar Müller-Hinton (AMH); caldo Müller-Hinton (CMH); sangre ovina estéril desfibrinada Britasheep; AEs de limoneno comercial provisto por la empresa FIGMAY S.R.L, *B. spartioides* y *P. trifoliata*.

##### ***Emulsiones cosméticas.***

Cera de abeja; aceite de coco; aceite de almendras; vaselina sólida; agua destilada, bórax; ácido esteárico; ácido láctico. Insumos de calidad farmacéutica.

#### **Cepa bacteriana.**

*S. aureus* ATCC 25923. Provista por el área de bacteriología del Hospital “Dr. Lucio Molas” de la Provincia de La Pampa.

#### **Métodos.**

##### **Obtención de AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata*:**

##### ***Colecta de material vegetal.***

Se llevó a cabo la selección de parte aérea de especies vegetales nativas e introducidas en la región semiárida pampeana, bajo un muestreo simple.

- *B. spartioides*: la recolección se hizo durante el mes de noviembre de 2017 en la ruta 35 sobre el bajo salino (37° 36' 05" (S) y 65° 12' 55,6" (W)). En la figura 1A se observan las varas formando la típica forma de “escoba” de la especie.
- *P. trifoliata*: frutos maduros se recolectaron durante el mes de junio de 2017 del Botánico de la Facultad de Agronomía, Ruta Nacional 35, Km 334. En la figura 1B se muestran los frutos característicos de la especie.



**A**



**B**

**Figura 1 A:** *B. spartioides*, conocida como pichana, **B:** *P. trifoliata*, conocida como naranja amarga.

***Destilación de los aceites esenciales.***

El material vegetal colectado se secó al aire con rotación cada 48 h durante una semana para la posterior extracción de los aceites esenciales por arrastre de vapor de agua utilizando un extractor a escala de laboratorio FIGMAY S.R.L.



**Figura 2.** Extractor de aceites esenciales a escala de laboratorio. Fuente: FIGMAY S.R.L.

### ***Rendimiento de AEs.***

El cálculo del rendimiento porcentual de los dos aceites esenciales se realizó con la siguiente fórmula (Navarrete *et al.*, 2009):

$$\text{Rendimiento (\%)}: (\text{Kg aceite obtenido/Kg carga vegetal seca}) \times 100.$$

### ***Caracterización química de AEs.***

Se realizó en el Instituto de Química del Sur de la Universidad Nacional del Sur, (Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires).

### ***Acondicionamiento de muestras de AEs.***

Se realizaron diluciones de los AEs en una proporción de 20  $\mu\text{L}$  en 20 mL de éter etílico, para ser inyectados en el cromatógrafo.

### ***Cromatografía gaseosa acoplada a detector masa.***

Se determinó en un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890B con detector selectivo de masa (MSD) 5977 que se caracteriza por disponer de un detector de masas con analizador por cuadrupolo hiperbólico simple. La columna utilizada es: HP5-MS 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ . La confirmación de las estructuras fue realizada por comparación con los datos de la biblioteca NIST del CG/EM, con las siguientes condiciones de trabajo: flujo: 1 mL/min, entrada: 280°C, división (20:1) 70 eV, solvente: 3 min m/z: 35-500 Aux: 280°C, horno: 50°C por 2 min, 5°C/min, 200°C por 5 min, 40°C/min, 280°C por 2 min. MS fuente: 230, MS cuadrante: 150.

### ***Cuantificación de limoneno.***

Se realizaron diluciones de 20  $\mu\text{L}$  de AEs de *B. spartioides* en 10  $\mu\text{L}$  de éter etílico y 10  $\mu\text{L}$  de AEs de *P. trifoliata* en 10  $\mu\text{L}$  del mismo solvente. Se preparó la curva de calibrado con volúmenes del patrón de limoneno rectificado (FIGMAY S.R.L) en proporciones crecientes de solvente SLN Stock. Se inyecta al cromatograma un volumen final de 5 mL.

### ***Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.***

**Inóculo:** La cepa *S. aureus* ATCC 25923 se incubó en CMH durante 24 h a 35°C.

### **Inhibición del crecimiento microbiano. Difusión en disco, método de Kirby-Bauer:**

Para el método de difusión en disco se extendieron 1000  $\mu\text{L}$  de cada inóculo con  $1.5 \times 10^8$  UFC sobre placas que contenían AMH; Se colocaron discos de filtro de papel Whatman N°1 (6 mm de

diámetro), impregnados con 2, 3, 4, 5, 7 y 8  $\mu\text{L}$  de cada AEs, sobre la superficie del medio. Las placas se dejaron 5 min a temperatura ambiente para permitir la difusión del aceite, luego se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Se utilizaron discos con amikacina (30  $\mu\text{g}$ ) como control positivo.

#### ***Determinación del halo de inhibición (mm).***

Las placas se fotografiaron con el analizador de imágenes Syngene GBOX y luego se analizaron con el programa digital “ImageJ” para obtener las medidas en milímetros correspondientes a los halos de inhibición.

#### **Emulsiones cosméticas.**

La obtención se realizó por medio del desarrollo de dos emulsiones semi-sólidas conteniendo en su fórmula más del 60% de productos naturales. Variables físicas como el tiempo y la velocidad de agitación en el proceso de elaboración se vieron optimizadas. Además, se tuvo en consideración el agregado de ácido láctico como regulador de pH. El agregado de los AEs se realizó una vez elegida la formulación más estable.

#### ***Formulación sólida 1.***

Se pesaron los componentes que se muestran en la tabla 1 en balanza analítica Mettler PE 3600. Los componentes de la fase oleosa se mezclaron y precalentaron a  $67^{\circ}\text{C}$ . Luego se añadió los componentes de la fase acuosa que fueron mezclados previamente. La Integración de ambas fases se realizó bajo agitación vertical Traspower rotativo a paleta 200-240 V a 150 rpm durante un tiempo de 15 min. Se vertieron en envases de 100 g de capacidad para su almacenamiento.

\*  
**Tabla 1.** Composición química de la emulsión 1.

Componentes	Fase	Función	HLB	Cantidad
Vaselina	Oleosa	Bloquea la pérdida de agua actuando como oclusivo	11	30 g
Agua destilada	Acuosa	Vehículo fase acuosa	-	25 g
Aceite de almendra	Oleosa	Emulgente	12	20 g
Cera de abeja	Oleosa	Emulsificador, provee de solidos al producto	9	10 g
Aceite de coco	Oleosa	Emulgente y antioxidante	8	10 g
Ácido esteárico	Acuosa	Saponificación	7	3 g
Bórax	Acuosa	Estabilizante	-	1 g
AEs	Oleosa	Aroma	-	3% v/v

### ***Formulación sólida 2.***

Se pesaron los componentes que se muestran en la tabla 2 en balanza analítica Mettler PE 3600. Los componentes de la fase oleosa se mezclaron y precalentaron a 67°C. Luego se añadieron los componentes de la fase acuosa que fueron mezclados previamente. La Integración de ambas fases se realizó bajo agitación vertical a 300 rpm durante un tiempo de 60 min. Se vertieron en envases de 100 g de capacidad para su almacenamiento.

\*  
**Tabla 2.** Composición química de la emulsión 2.

Componentes	Fase	Función	HLB	Cantidad
Vaselina	Oleosa	Bloquea la pérdida de agua actuando como oclusivo	11	30 g
Agua destilada	Acuosa	Vehículo fase acuosa	-	25 g
Aceite de almendras	Oleosa	Emulgente	12	20 g
Cera de abeja	Oleosa	Emulsificador, provee de solides al producto	9	10 g
Aceite de coco	Oleosa	Emulgente y anti oxidante	8	10 g
Ácido esteárico	Acuosa	Saponificación	7	3 g
Bórax	Acuosa	Estabilizante	-	1 g
AEs	Oleosa	Aroma y actividad antimicrobiana	-	3% v/v
Ácido láctico	Acuosa	Regulador de pH	-	0.5% v/v

### **Determinación de parámetros físico-químicos de emulsiones cosméticas.**

#### ***Caracteres organolépticos.***

Se determinó bajo la observación de aroma, color, brillo, grumos y apariencia de las emulsiones cosméticas (Pérez Navarro, 2016).

#### ***Clasificación del tipo de emulsión.***

Se colocó en un vaso de precipitado 30 mL de agua destilada con 0.5 g de la emulsión y se agitó suavemente. Luego de 1 min se observó si las fases de la emulsión resultaban separadas obteniendo la cremación. Esto se repitió para cada formulado (Lillini *et al.*, 2016).

#### ***pH.***

El registro del valor de pH de los formulados se realizó por medio de la disolución de 1 g de emulsión en 10 mL de agua destilada y medida con pHmetro Hanna Instruments (Pérez Navarro, 2016).

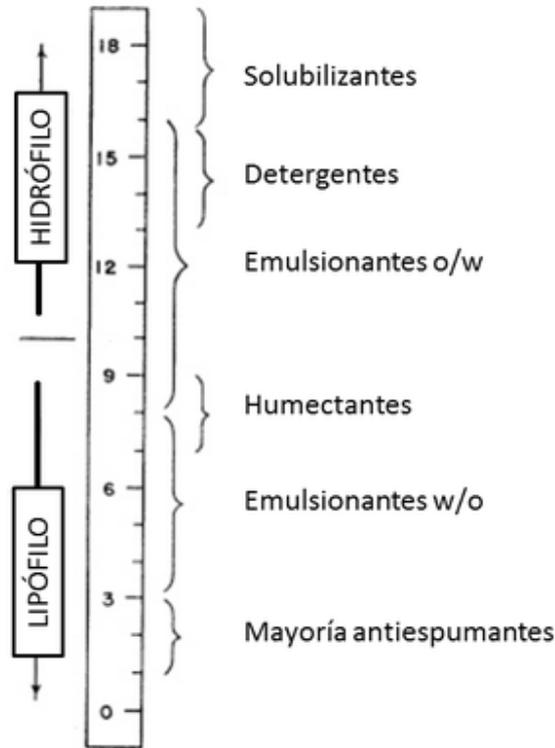
#### ***HBL.***

Griffin y colaboradores (1974) propusieron una fórmula para el cálculo matemático y una escala (valores arbitrarios del 1 al 20) para comparar tipos de emulsiones.

$$HLB = x_1 HLB_1 + x_2 HLB_2$$

Dónde:  $x_1$  y  $x_2$ : fracciones en peso de los surfactantes;  $HLB_1$  y  $HLB_2$ : HBL de cada surfactante; HBL: HBL total de la fórmula.

Los distintos valores de HBL para cada componente de la emulsión se encuentran tabulados. Luego del cálculo, se comparó el valor obtenido con los propuestos en la figura 3.



**Figura 3.** Escala de equilibrio hidrofílico-lipofílico.

***Estabilidad térmica.***

Las muestras de los formulados cosméticos fueron sometidas a ciclos de temperatura en un baño termostático TDK (30 a 70°C) y freezer (-10°C) (Lillini *et al.*, 2016). Después de 6 ciclos de 40 y -10°C, se determinó la estabilidad térmica por observación.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Aceites esenciales.**

#### ***Rendimientos porcentuales.***

Los rendimientos de extracción de AEs fueron: *B. spartioides* de 1% p/p y *P. trifoliata* 0.2% p/p. El valor que se reportó en bibliografía por Oliva y colaboradores (2007) sobre *B. spartioides* fue de 0.2% para las especies vegetales que se encuentran en zona patagónica de la Argentina, abarcando Santa Cruz y Chubut. Para *P. trifoliata* el rendimiento publicado es de 2% y 3% respectivamente (Hsouna *et al.*, 2017). Las diferencias encontradas pueden deberse a la estación del año en las que fueron recolectadas, posible domesticación, temperatura de secado, la zona geográfica en donde se las encontró y el tipo de suelo en donde crecieron.

#### ***Caracterización química.***

Los componentes mayoritarios caracterizados por CG-MS del AEs de *B. spartioides* colectada en zona semiárida pampeana, se muestran en la tabla 3. El metabolito mayoritario fue limoneno (44%), en discrepancia con Oliva y colaboradores (2017). Esto se puede atribuir a que la composición química de un aceite esencial puede variar ampliamente debido a factores medioambientales bajo los cuales la planta se desarrolló (régimen de precipitaciones y de vientos, estacionalidad, humedad, tipo de suelo y de relieve, interacciones bióticas, etc.); y a factores genéticos y fisiológicos intrínsecos (ciclo de vida, estado de desarrollo, existencia de variedades, división de sexos, etc)(Romeu *et al.*, 2007).

**Tabla 3.** Componentes mayoritarios identificados en el AEs de *B. spartioides*.

Compuestos mayoritarios	*Composición (%)
Limoneno	44
Espatulenol	12

\*Composición (%) = área del compuesto x 100/área total del cromatograma

En el caso de *P. trifoliata* se observó la presencia de dos de los componentes descriptos para esta especie vegetal, de la familia de los cítricos (Hsouna *et al.*, 2017), en concordancia con Tundis y colaboradores (2016) limoneno es el componente mayoritario abarcando más del 50% de la

composición química. En la tabla 4 se muestran los componentes mayoritarios identificados mediante CG-MS.

**Tabla 4.** Componentes mayoritarios identificados en el AEs de *P. trifoliata*.

Compuestos mayoritarios	*Composición (%)
Limoneno	62
Beta-pineno	24

\*Composición (%) =  $\text{área del compuesto} \times 100 / \text{área total del cromatograma}$

Se realizó la cuantificación de limoneno en los AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata* con el fin de determinar cuál poseía mayor concentración de este principio activo. Como era de esperar, analizando las tablas 3 y 4, *P. trifoliata* contuvo una mayor concentración de limoneno dentro de su composición química. La importancia de cuantificar, es que podemos hacer referencia exacta del principio activo en cada AEs. En la tabla 5 observamos las concentraciones que arrojó la cuantificación.

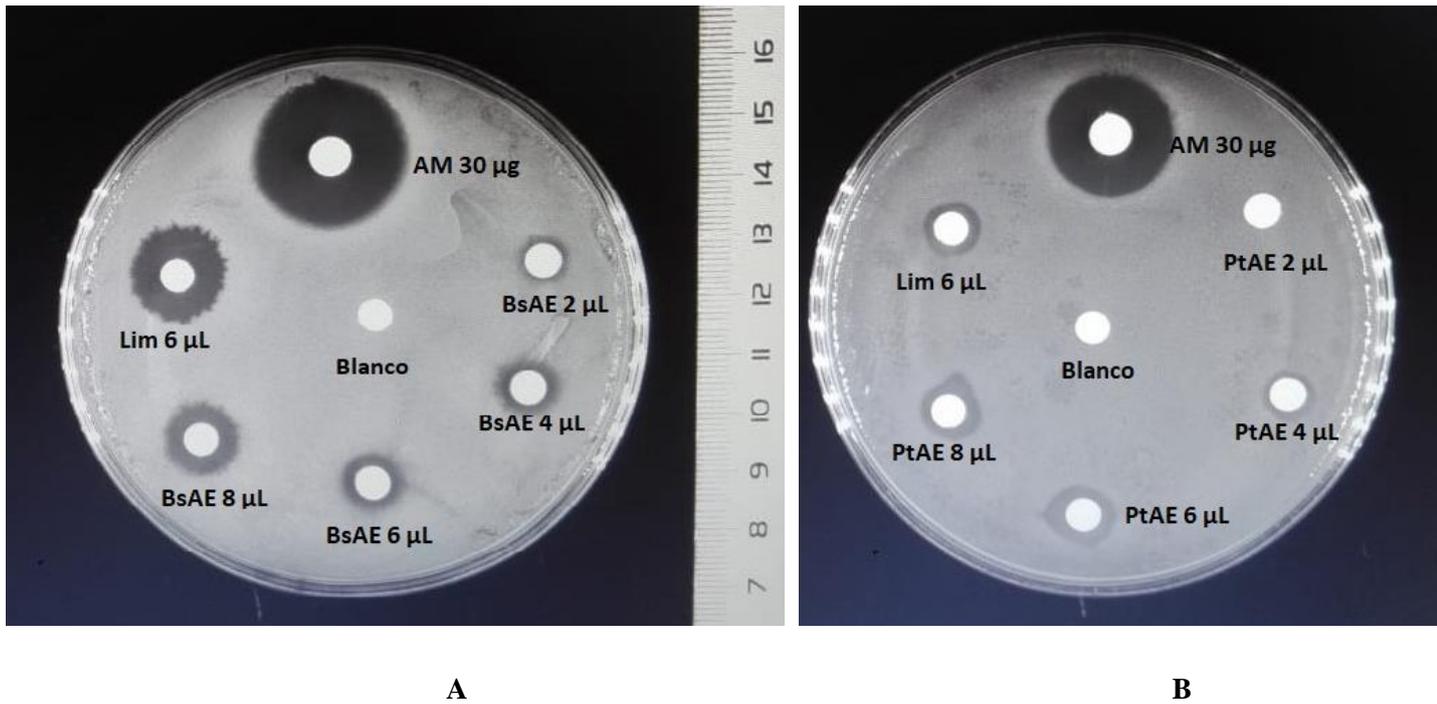
**Tabla 5.** Cuantificación de limoneno en los AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata*.

Especie vegetal	*Concentración (mg/mL)
<i>B. spartioides</i>	269.5
<i>P. trifoliata</i>	577.5

\*Concentración (mg/mL) = obtenido a partir de curva de calibrado

### **Actividad antimicrobiana.**

La acción antibacteriana de los AEs está dada por su composición química (Cañigüeral, 2007). Los aceites de *B. spartioides* y *P. trifoliata* contienen limoneno como componente mayoritario, el cual puede acumularse en la membrana plasmática de los microorganismos y por tanto causar pérdida de su integridad para favorecer la inhibición del crecimiento (Espina *et al.*, 2013). La actividad antimicrobiana de distintos volúmenes de los AEs frente a *S. aureus* se ensayaron mediante la técnica de difusión en disco. Allí se observó que *B. spartioides* inhibió el crecimiento en mayor proporción respecto a *P. trifoliata*. En la figura 4 A y B que se presentan a continuación se pueden observar las zonas de inhibición, se utilizaron dos controles en el ensayo. Un antibiótico sintético (Amikacina) y uno natural (limoneno).



**Figura 4.** Ensayo de difusión en disco. **A:** AEs de *B. spartioides* BsAE frente a *S. aureus*. Lim: limoneno; AM: amikacina; BsAE: aceite esencial de *B. spartioides*. **B:** AEs de *P. trifoliata* (PtAE) frente a *S. aureus*. Lim: limoneno; AM: amikacina; PtAE: aceite esencial de *P. trifoliata*.

Este hecho se otorgó a posibles efectos sinérgicos entre los componentes del AEs de *B. spartioides* (Oliva *et al.*, 2007). Ya que se encontró esta inhibición con un menor porcentaje del principio activo limoneno en la composición química respecto a *P. trifoliata*.

En las tablas 6 y 7 se muestran los diámetros de inhibición para distintos volúmenes de AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata* frente a *S. aureus*. Cada ensayo se realizó por triplicado.

**Tabla 6.** Efecto inhibitorio de AEs de limoneno y *B. spartioides* BsAE frente a *S. aureus*.

Limóneno ( $\mu\text{L}$ )	Diámetro (mm)	BsAE ( $\mu\text{L}$ )	Diámetro (mm)
0	$5.69 \pm 0.26$	0	$5.23 \pm 0.09$
2	$15.77 \pm 0.58$	1	$5.70 \pm 4.94$
4	$18.93 \pm 0.77$	3	$9.68 \pm 1.15$
5	$20.91 \pm 1.79$	5	$10.45 \pm 0.96$
6	$21.15 \pm 2.81$	6	$10.53 \pm 0.29$
8	$24.19 \pm 2.65$	7	$21.84 \pm 0.20$
AM	$31.09 \pm 0.90$	8	$13.09 \pm 0.38$
		Limóneno (6 $\mu\text{L}$ )	$10.75 \pm 0.16$
		AM	$29.97 \pm 0.55$

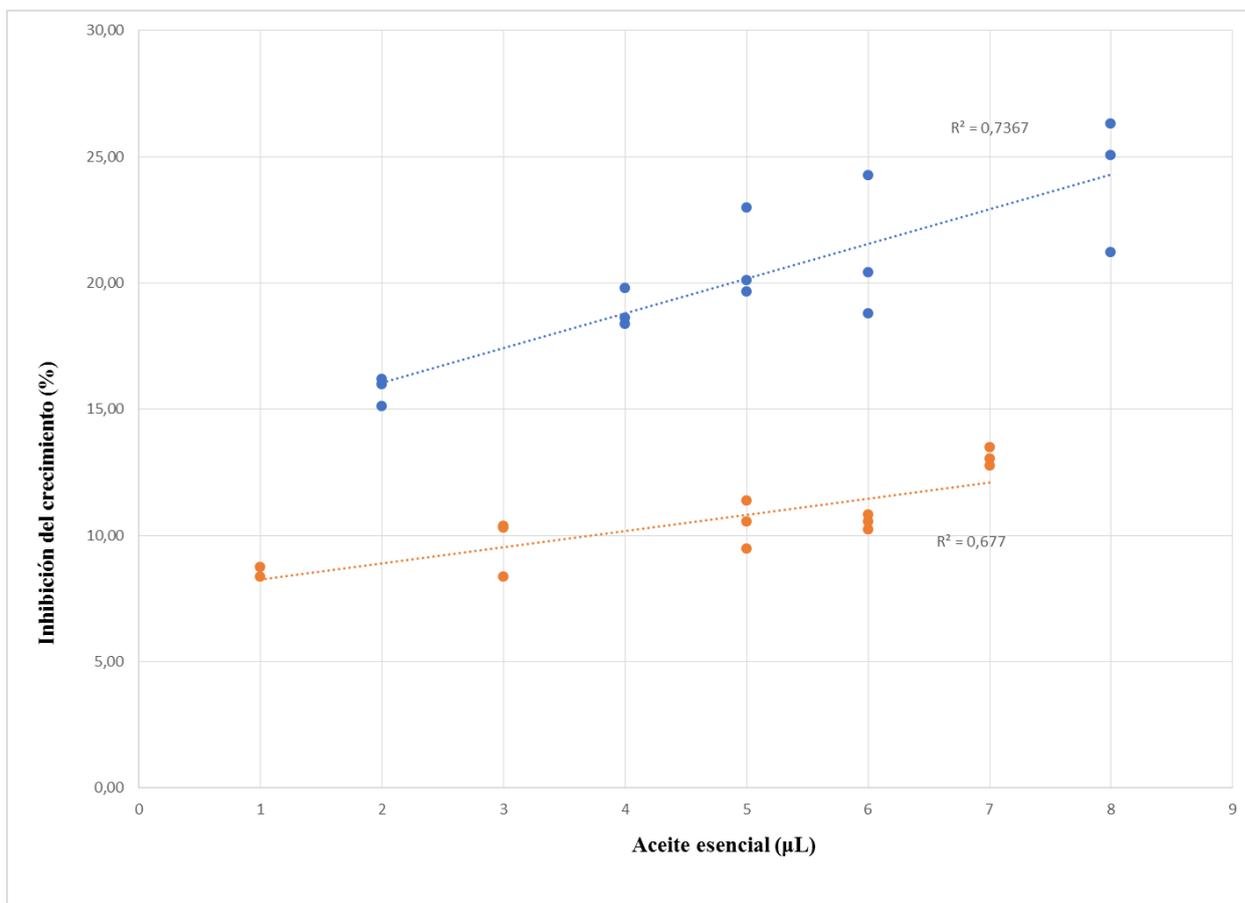
**Tabla 7.** Efecto inhibitorio de AEs de limoneno y *P. trifolata* PtAE frente a *S. aureus*.

Limóneno (µL)	Diámetro (mm)	PtAE (µL)	Diámetro (mm)
0	5.69 ± 0.26	0	5.24 ± 0.04
2	15.77 ± 0.58	1	5.65 ± 0.29
4	18.93 ± 0.77	3	6.02 ± 0.70
5	20.91 ± 1.79	5	6.45 ± 0.69
6	21.15 ± 2.81	6	8.40 ± 0.67
8	24.19 ± 2.65	7	7.67 ± 0.59
AM	31.09 ± 0.90	8	10 ± 0.60
		Limóneno (6 µL)	8.70 ± 0.49
		AM	31.04 ± 0.89

La mayor capacidad antimicrobiana se expresó para volúmenes de 5, 6 y 7 µL de AEs de *B. spartioides* cuyos diámetros de halo fueron 10.45, 10.53 y 21.84 mm. Estos valores representaron una inhibición porcentual del 34.87, 35.13 y 72.0% respectivamente. Puede ser considerado como sensible dentro de la clasificación de Russi (2008). Diámetros inferiores a 20 mm, indican una sensibilidad intermedia y con al menos un efecto bacteriostático pero diámetros inferiores a 13 mm las bacterias son catalogadas como resistentes a la sustancia de prueba. El efecto bacteriostático, es aquel que aunque no produce la muerte bacteriana, impide la reproducción; las bacterias envejecen y mueren. El hecho de que una sustancia sea bacteriostática o bactericida dependerá de su mecanismo de acción y, por tanto, de su estructura química, pero también contribuyen paralelamente otros factores como la concentración alcanzada en el sitio de la acción, tiempo de acción, tamaño del inóculo bacteriano y fase de crecimiento de la bacteria. Así, los β-lactámicos sólo son bactericidas en la fase de crecimiento activo de la bacteria, mientras que las polimixinas son bactericidas en cualquier fase. Un antibiótico bacteriostático también puede comportarse como bactericida en determinadas condiciones favorables. Esto ocurre por ejemplo con el grupo de antibióticos como los macrólidos (Paredes y Roca, 2004).

El AEs de *P. trifoliata* presentó diámetros de inhibición bastante menores a 13 mm, por lo tanto se consideró que carece de efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Para evidenciar que *B. spartioides* presento verdadero efecto inhibitorio fue necesario realizar un análisis de regresión de limoneno ( $\mu\text{L}$ ) vs inhibición del crecimiento bacteriano (%). A continuación se presenta la figura 5 que lo demuestra.



**Figura 5.** Análisis de regresión del índice de porcentaje de inhibición del crecimiento de limoneno (●) y *B. spartioides* BsAE (●).

En función a los resultados obtenidos, se determinó que 6  $\mu\text{L}$  de AEs de *B. spartioides* fue el volumen mínimo a utilizar para efectos inhibitorios significativos, siendo 7  $\mu\text{L}$  el de mayor efecto mostrado en el ensayo de difusión en disco.

### Emulsiones cosméticas.

Se seleccionó la formulación más estable, a partir de la caracterización de parámetros físicos-químicos. A continuación se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Parámetros físico químicos de los formulados 1 y 2.

Emulsión	Brillo	pH	Color	Aroma	Consistencia	Grumos
Formulado 1	No	8.3	Manteca	No	Cremosa grasosa	Si
Formulado 2	Si	5.4	Manteca	Miel	Cremosa fluida	No

El único parámetro que se mantuvo constante en ambos formulados fue el color manteca. En cuanto a las demás variables las diferencias en el brillo, aspecto y grumos de ambos formulados se atribuyeron a la etapa de adición y agitación durante el mezclado de la fase acuosa y la fase oleosa. La agitación fue una de las etapas claves para la correcta formación de la emulsión. A diferencia de lo propuesto por Tello, (2015) la formación de la emulsión conllevó varios ensayos de optimización para determinar el correcto tiempo de mezclado y la potencia óptima de agitación. Durante la optimización se trabajó con dos velocidades de agitación, 150 y 300 rpm para el mezclado de las fases. En la formulación 1, la agitación fue de 150 rpm en donde las fases se vieron separadas una vez concluida la elaboración, por lo que para la formulación 2 se optó por 300 rpm lográndose una emulsión estable en 60 minutos.

El formulado 1 no contuvo en su composición química un regulador de pH, esto llevó a obtener una manteca alcalina de pH 8.30 ocasionado por el bórax que fue uno de los constituyentes químicos de la fase acuosa. La bibliografía reporta que para emulsiones de uso tópico, el pH deberá ser 5 o 5.5 esto se debe a la acidez que presenta la epidermis y así evitar que se vea afectado su normal funcionamiento (Rosero, 2012). Como solución a esta problemática, en la formulación 2 se utilizó ácido láctico de concentración 0.5% v/v adicionado a la fase acuosa gota a gota hasta llegar a un valor de pH óptimo de 5.4. Es común la incorporación de ácido láctico a las formulaciones cosméticas ya que este ácido es parte de la sudoración de la piel en una proporción del 0.5% (Ferraro *et al.*, 2012).

El valor de HBL fue determinado por medio del cálculo matemático propuesto por Griffin y colaboradores (1974). Para ambas emulsiones fue de 7.61, al corroborar la figura 3 de equilibrio hidrofílico-lipofílico, las emulsiones se clasificaron como humectantes.

Las emulsiones fueron clasificadas al observar el aspecto que presentaron cuando fueron mezcladas con agua destilada. Dando lugar a emulsiones directas aceite/agua (O/W) o inversas agua/aceite (W/O). Los resultados obtenidos indicaron que ambas emulsiones fueron del tipo (W/O), ya que los emulgentes en estos casos son solubles en aceites y ceras por lo que las fases durante el ensayo se vieron separadas, por un lado el producto cosmético y por otro el agua destilada (Lillini *et al.*, 2016).

Cuando se evaluó la estabilidad, la formulación 1 no logró ser estable en el transcurso de los 12 días (6 ciclos) y las fases se vieron separadas dando lugar a la conversión del tipo de emulsión. Además se caracterizó por presentar un aroma rancio. Hecho que se atribuyó a la descomposición de los aceites fijos por acción de la temperatura. La importancia de este estudio radicó en la posibilidad de obtener indicios sobre el comportamiento del producto en un intervalo de tiempo y frente a condiciones ambientales a las que puede estar sometida la emulsión (Rosero, 2012).

Respecto a la formulación 2, todos los parámetros físico-químicos se mantuvieron estables luego de los ensayos y mantuvo la consistencia cremosa. Es decir la fase dispersa se mantuvo uniforme en la fase continua. Entre los factores que se destacan para explicar lo que sucedió, están las fuerzas de interface que actúan en los glóbulos de la emulsión (intermoleculares como de Van de Waals) así como también las circunstancias del ensayo en este caso la variación de la temperatura (Aranberri *et al.*, 2006). A diferencia de Rosero (2012), fue estable frente a las condiciones de ( $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) logradas en el ensayo de estabilidad tanto a temperaturas extremas como a la ambiente. Al ser W/O y contener en su fórmula más del 60% de productos naturales, ayudó a que la piel no reaccione ante el agregado del cosmético ya que el estrato corneo está cubierto por una emulsión del mismo tipo, llamado manto ácido (Ferraro *et al.*, 2012). Dada la estabilidad y pH que presentó, se decidió seleccionarla como formulación cosmética para la elaboración de una manteca corporal humectante. En la figura 7 se puede observar el producto logrado.



**Figura 6.** Emulsión número 2.

#### ***Incorporación del AEs de *B. spartioides* a la formulación número 2.***

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, reportó una Guía en 2016 donde estableció que la proporción de AEs a agregar en formulaciones cosméticas es de un máximo del 3%. Esto dependerá principalmente de que metabolitos secundarios estén presentes en dicho aceite. Por ejemplo *B. spartioides* presenta dentro de su composición química una mayor concentración de limoneno, éste no es tóxico ni produce irritación cutánea. Otro factor que considera esta legislación es la zona de uso del cosmético. Por esta razón se pensó para uso externo principalmente en zonas secas de la piel por ser humectante y conservar la humedad intrínseca de la piel. A la emulsión 2 que fue la que se eligió por su estabilidad y pH logrado se le incorporo un 3% v/v de AEs de *B. spartioides*. El aroma fue suave y agradable pudiéndose reconocer el aroma a hierbas verdes. Al ser esparcida el aroma persistió en piel.

## 5. CONCLUSIONES

### **Aceites esenciales.**

- A partir de la cuantificación de limoneno en los AEs de *B. spartioides* y *P. trifoliata*, se determinó que para la segunda especie vegetal fue de 577.5 mg/mL, siendo la que presentó mayor cantidad de principio activo.
- El AEs de *B. spartioides* presentó una interesante actividad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer frente a la cepa modelo de *S. aureus* ATCC 25923. Para 5, 6 y 7  $\mu$ L de AEs se obtuvieron 34.87, 35.13 y 72.87% de inhibición del crecimiento bacteriano. Los valores 34.87 y 35.13% se corresponden con una sensibilidad intermedia y un efecto bacteriostático. Y 72.87% con un efecto sensible.

### **Emulsiones cosméticas.**

- Se obtuvo una emulsión de aplicación cosmética W/O a partir de la selección de una fórmula con más del 60% de productos naturales. Estable con agitación durante 60 min en el proceso de elaboración, el valor de pH fue de 5.5 obtenido a partir del agregado de ácido láctico al 0.5% v/v a la fase acuosa. La emulsión se clasificó como humectante.
- La incorporación del AEs de *B. spartioides* fue de 3% v/v respecto a la fórmula total, brindando un aroma suave y delicado a hierbas verdes.

## REFERENCIAS

Alcalde T, (2008), *Cosmética natural y ecológica: regulación y clasificación*, Vol. 27 (9), pp. 96-104.

Allen L, (2010), *Emulsions, Secundum Artem*, Vol. 4 (1).

Alvear Rosero S, (2012), *Estudio de estabilidad acelerada en cremas formuladas con aceites frutos de tres especies vegetales: monte (*Mauritia flexuosa*), chonta (*Bactrisgasipaes*) y sachá inchi (*Plukenetia volubilis*)*, (Tesis de grado), Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.

Andreatta T, Parolini C y Pérez M, (2017), *Inserción de la cosmética orgánica en Argentina*, (Tesis de grado), Universidad Argentina de Empresas, Facultad de Ciencias Económicas.

Aranberri I, Clint J y Fletcher P, (2006), *Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos*, *Revista Iberoamericana de Polimeros*, Vol. 7 (3), pp. 211-231.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D y Idaomar M, (2008), *Biological effect of essential oils-A review*, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46 (2), pp. 446-475.

Baldwin I, Halitschke R, Paschold A, Von Dahl C y Preston C, (2006), *Volatile Signaling in plant-plant interactions: “talking trees in the genomics era”*, *Science*, pp. 812-815.

Becerra C y Acosta G, (2013), *Actividad antibacteriana de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Cúrcuma longa*) de Colombia*, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Vol. 18 (2), pp. 237-246.

Bernal M y Guzmán M, (1984), *El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer*. *Biomédica*, Vol. (3 y 4).

\*  
Bohlmann J y Keeling C, (2008), Terpenoid biomaterials, *The Plant Journal*, Vol. 54 (4),pp. 656-669.

Calderón D, (2017), Efecto del aceite esencial de *Citrus limón* sobre la viabilidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* in vitro, (Tesis de grado), Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas.

Cañigueral S y Roser V, (2007), Los aceites esenciales en fitoterapia, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Vol. 6 (5), pp. 146.

Castaño P, Hader I, Ciro G, Zapata M y Jimenez R, (2010), Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias de interés alimentario, *Vitae*, Vol. 17 (2), pp. 149-154.

Cháirez F, Gallegos P, Valenzuela R, Delgadillo L y López C, (2019), Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, Linalool,  $\alpha$ -terpineno y timol, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol. 22, pp. 241-248.

Contreras R y Pomar J, (2002), Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, Serie de Normas Técnicas N°30, Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud, Organismo Público Descentralizado de Sector Salud.

Cseke L, Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Duke J y Brielmann H, (1997), *Natural Products from Plants*, Second Edition, ISBN 0-8493-2976-0.

Dalmasso A, Cruces Ey Caprio S, (2016), Respuesta al corte de *Baccharis spartioides* (Hook. & Arn. ex DC) J. Rémy, *Multequina*, Vol. 25, pp. 23-28. ISSN 0327-9375 ISSN 1852-7329 on-line.

Dewick P, (2009), *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, Third Edition, ISBN: 978-0-470-74168-9.

\*  
Dirección Europea para la Calidad del Medicamento y la Asistencia Sanitaria del Consejo de Europa (2016), Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos, 1º Edición, NIPO 733180016.

Espina L, Gelaw T, Castelvi S, Pagán R y García D, (2013), Mechanism of bacterial inactivación by (+) limonene and its potential use in food preservati3n combined processes, Plas one, Vol. 8 (2), pp. 1371-1381.

Ferraro G, Martino V, Bandoni A y Nadinic J, (2012), Fitocosmética, fitoingredientes y otros productos naturales, Eudeba, Buenos Aires, Argentina, ISBN 978-950-1969-8.

Flores Y, Peralta S y Espinoza M, (2014), Efecto inhibitorio in vitro del extracto etan3lico de *Rosmarinus officinalis*L. “romero” sobre el crecimiento *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, Vol. 1 (2). ISSN 2313-0369/2014.

Gobbo Neto L y López N (2007), Characterization of the biological potential of the essential oils from five species of medicinal plants, Scientific Research, Vol. 30, pp. 374-381.

Hsouna B, Halima B, Smaoui S and Hamdi N, (2017), *Citrus lim3n* essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat.

Jiménez V, (2017), Optimizaci3n del rendimiento y determinaci3n del contenido de limoneno del aceite esencial de flavedo de mandarina, (Tesis de grado), Universidad San Ignacio de Loyola, Lima Perú.

Khan B, Akhtar N, Khan M, Waseem K, Mahmood T, Rasul A, Iqbal MKhan H, (2011), Basics of pharmaceutical emulsions: a review, African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 5 (25), pp. 2715-2725.

Lemus P, (2006), Análisis comparativo de estabilidad acelerada y estabilidad a largo plazo de jarabe de Ambroxol en dos diferentes concentraciones, adultos y niños, (Tesis de grado), Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

\*  
Lillini G, Pasquali R, Pedemonte C, Bregni C y Lavaselli S, (2016), Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol, Revista Colombiana Ciencias Químicas y Farmacia, Vol. 45 (1), pp. 5-20.

Loreto F, Dicke M, Schnitzler J y Turlings J, (2014), Plant volatiles and the environment, Plant Cell and Environment, Vol. 37 (8), pp. 1905-1908.

Martínez M, Bandell J y González N, (1996), Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera (Sábila), Revista Cubana Plant Med, Vol. 1 (3), pp. 18-20.

Martínez M y Paredes E, (2013), Eficacia antibacteriana in vitro de marco (*Ambrosia arborescens mill.*) y paico (*Dysphania ambrosioides*) en una formulación cosmética, (Tesis de grado), Universidad Politécnica Salesiana de Quito.

Mendoza et. al., (2018), Desarrollo de una crema de hojas de *Piperaduncun L.* (Piperaceae) con actividad fotoprotectora in vitro, Vol. 25 (1), pp. 115-12

Minero F y Díaz L, (2017), Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas, ArsPharm, Vol. 58 (1), pp. 5-12.

Muñoz J, Alfaro M y Zapata I, (2007), Avances en la formulación de emulsiones, grasas y aceites, Vol. 51 (1), ISSN 0017-3495.

Navarrete C, Gil J, Durango D y García C, (2009), Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales, Vol. 162, pp. 8592, ISSN 00127353.

Navarro Pérez Y, (2016), Reformulación de emulsiones cosméticas con activos naturales, (Tesis de grado), Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Facultad de Química y Farmacia.

\*  
Ochoa S, Torres L, Moorillon V, Camacho A y Torres B, (2017), Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades, *Biomédica*, Vol. 37 (2), pp. 224-243.

Ochoa S, Torres L, Moorillon V, Camacho A y Torres B, (2017), Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades, *Biomédica*, Vol. 37 (2), pp. 224-243.

Oliva M, Zunino M y López M, (2007), Variation in the essential oil composition and antimicrobial activity of *Baccharis spartioides* (H. et. A). Rimsy from three regions of Argentina, *Journal Essential Oil*, Vol. 19, pp. 509-513.

Paredes F y Roca J, (2004), Acción de los antibióticos, *Ámbito Farmacéutico, Farmacología*, Vol. 23 (3), pp: 116-124.

Radulovic N, Blagojevic P, Stojanovic Z y Stojanovic M, (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 20 (7), pp. 932–952.

Rahman A, Reza S, Yoon J y Kang S, (2008), In vitro inhibition of food borne pathogens by volatile oil and organic extracts of *Poncirus trifoliata* Rafin. Seeds, *J SciFood Agric*, Vol. 89, pp. 876-881.

Rodríguez Flores, (2014), Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre el crecimiento *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, *Salud y Vida Sipanense*, Vol. 1 (2), ISSN 2313-0369.

Rojas J, García A y López J, (2005), Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Vol. 4 (2), pp. 28-32.

Romeu R, Botta E y Díaz Y, (2007), Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) y evaluación in vitro de su actividad acaricida, *Fitosanidad*, Vol. 11 (2), pp. 75-78.

\*  
Russel A, (2003), Challenge Testing: principles and practice, International Journal of Cosmetic Science, Vol. 25, pp. 147-153.

Russi N, (2008), Susceptibilidad a antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina, (Tesis de grado), Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias veterinarias.

Salager J, (1998), Formulación HLB, PIT, R de Winsor, Laboratorio de Formulación, Interfaces Reología Y Procesos, Universidad de los Andes Facultad de Ingeniería Escuela de Ingeniería Química, Mérida-Venezuela, versión 2.

Scora R y Bitters W, (1966), The essentials oil of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. And its selections in relation to classification, Phytochemistry. Vol. 5, pp. 1139-1146.

Shankar Raut J y Karuppayil M, (2014), A status review on the medicinal properties of essential oils, Journal Elsevier.

Solano X, Silva T y Gutierrez M, (2016), Inhibición del *Staphylococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”, Odontología, Vol. 19 (2), pp. 29-34.

Tello M, (2013), Formulación de una crema hidratante elaborada con ingredientes orgánicos a base de sábila, (Tesis de grado), Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Ambientales.

Tundis R, Bonesi M, Sicari V, Pellicano T y Tenuta M, (1966), *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activity via the inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes, Journal of functional foods, Vol. 25, pp. 477-485.

Zampini I, Cudmani N e Isla I, (2007), Actividad antimicrobiana de plantas medicinales Argentinas sobre bacterias antibiótico resistentes, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Vol. 41 (3), ISSN 0326-2967.