

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PRESERVANTE DE UNA MEZCLA DE
EXTRACTOS VEGETALES, SOBRE UNA EMULSIÓN COSMÉTICA DE ACEITE
EN AGUA (O/W), FRENTE A UN SISTEMA PRESERVANTE CONVENCIONAL
DE METIL Y PROPILPARABENO**

NICOLAS CASTILLO MAÑOZCA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI
2016**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PRESERVANTE DE UNA MEZCLA DE
EXTRACTOS VEGETALES, SOBRE UNA EMULSIÓN COSMÉTICA DE ACEITE
EN AGUA (O/W), FRENTE A UN SISTEMA PRESERVANTE CONVENCIONAL
DE METIL Y PROPILPARABENO**

NICOLAS CASTILLO MAÑOZCA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**

DIRECTOR: CARLOS ALBERTO RAMIREZ GIRALDO

CO-DIRECTOR: JULIAN ARBEY GONZÁLEZ OSPINA, MsC.

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA
2016**



Aprobado por:

Cristhian J. Yarce Castellanos
Evaluador

Carlos Alberto Ramírez Giraldo
Tutor de Proyecto

Julián Arbey Gonzales Ospina
Co-Tutor de Proyecto

Santiago de Cali, 15 de Septiembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi madre por confiar en mí y apoyarme a lo largo de este camino, sabiendo que iba a lograr mi meta. También le quiero agradecer a mis amigos de estudio y futuros colegas (Nataly Bernal, Sebastián Flórez y Mateo Echeverry), por ser mi grupo de trabajo y mis amigos a lo largo de la carrera. Quiero agradecer a mi tutor Carlos Ramírez y mi co-tutor Julián González, por ayudarme a desarrollar la idea inicial que fue este proyecto de investigación, aconsejándome en cada paso dado y cada decisión tomada. Por último, quiero agradecer a todo el personal de Tecnoquímicas involucrado en el proceso de autorización y acompañamiento que tuve, para poder realizar la etapa más crucial de esta investigación en las instalaciones de esta gran compañía.

Contenido

ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. DESCRIPCION DEL PROYECTO.....	11
2.1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION.....	11
2.2. MARCO TEORICO.....	12
2.2.1. Sistemas Conservantes.....	12
2.2.1.1. Parabenos.....	14
2.2.2. Extractos naturales.....	14
2.2.2.1. NIM, <i>Melia azadirachta L.</i>	15
2.2.2.2. Magnolia, <i>Magnolia Officinalis</i>	16
2.2.3. Prueba de eficacia del preservante.....	16
2.2.4. Emulsiones cosméticas.....	17
2.2.4.1. Estabilidad de las emulsiones.....	17
2.2.4.2. Estudios de estabilidad en emulsiones.....	18
2.3. Objetivos.....	19
2.3.1. General.....	19
2.3.2. Específicos.....	19
2.4. Metodología.....	19
2.4.1. Materiales y Equipos.....	21
2.4.2. Prueba de eficacia del preservante (USP).....	22
2.4.3. Recuento en placa.....	23
2.4.4. Matriz de Marco Lógico.....	23
2.5. Resultados y Discusión.....	25
2.6. Conclusiones.....	39
2.7. Recomendaciones.....	40
3. BIBLIOGRAFÍA.....	41
4. ANEXOS.....	43

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Actividades de agua (Aw) requeridas para sustentar el crecimiento de microorganismos representativos (USP38/NF33, <1112> Determinación de actividad de agua, 2015).....	13
Tabla 2. Formulación de la base cosmética para la prueba de eficacia.....	20
Tabla 3. Condiciones de cultivo para la preparación de inóculos (USP38/NF33, <51> Prueba de eficacia antimicrobiana, 2015).....	22
Tabla 4. Características generales de las 6 formulaciones.....	25
Tabla 5. Determinación del tipo de emulsión.....	25
Tabla 6. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 1.	27
Tabla 7. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 2.	27
Tabla 8. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 3.	28
Tabla 9. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 4.	28
Tabla 10. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 5. ...	29
Tabla 11. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 6. ...	29
Tabla 12. Resultados del recuento en placa de la Formulación 1, repetición 1.	43
Tabla 13. Resultados del recuento en placa de la Formulación 1, repetición 2.	43
Tabla 14. Recuento medio del los resultados de la Formulación 1.....	44
Tabla 15. Resultados del recuento en placa de la Formulación 2, repetición 1.	44
Tabla 16. Resultados del recuento en placa de la Formulación 2, repetición 2.	44
Tabla 17. Recuento medio del los resultados de la Formulación 2.....	45
Tabla 18. Resultados del recuento en placa de la Formulación 3, repetición 1.	45
Tabla 19. Resultados del recuento en placa de la Formulación 3, repetición 2.	46
Tabla 20. Recuento medio del los resultados de la Formulación 3.....	46
Tabla 21. Resultados del recuento en placa de la Formulación 4, repetición 1.	46
Tabla 22. Resultados del recuento en placa de la Formulación 4, repetición 2.	47
Tabla 23. Recuento medio del los resultados de la Formulación 4.....	47
Tabla 24. Resultados del recuento en placa de la Formulación 5, repetición 1.	48
Tabla 25. Resultados del recuento en placa de la Formulación 5, repetición 2.	48
Tabla 26. Recuento medio del los resultados de la Formulación 5.....	48
Tabla 27. Resultados del recuento en placa de la Formulación 6, repetición 1.	49
Tabla 28. Resultados del recuento en placa de la Formulación 6, repetición 2.	49
Tabla 29. Recuento medio del los resultados de la Formulación 6.....	50

CONTENIDO DE GRAFICAS

Gráfica 1. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulaci3n 1 (Extracto de Nim 2%).	31
Gráfica 2. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulaci3n 2 (Extracto de Magnolia 2%).	32
Gráfica 3. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulaci3n 3 (Mezcla 1:1 del extracto de NIM:Magnolia).	33
Gráfica 4. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulaci3n 4 (Mezcla 0,25:0,75 del extracto de NIM:Magnolia).	34
Gráfica 5. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulaci3n 5 (Mezcla 0,75:0,25 del extracto de NIM:Magnolia).	35
Gráfica 6. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulaci3n 6 (Mezcla 3:1 metilparabeno y propilparabeno).	36

RESUMEN

En la actualidad, en el sector cosmético es de alto impacto el desarrollo de productos autopreservados, con los cuales se pueda declarar que son libres de preservantes químicos. Este tipo de productos se encuentran a la vanguardia en la innovación, y es allí donde los extractos naturales con propiedades antimicrobianas tienen vital importancia al ser utilizados como preservantes alternativos. Esta tendencia contrasta con el constante cuestionamiento del que son objeto la mayoría de los preservantes sintéticos, por los posibles efectos negativos que pueden generar sobre la salud humana y en el medio ambiente. Enmarcados en esta línea de investigación del sector cosmético, el presente proyecto de investigación plantea evaluar la viabilidad de preservar productos cosméticos líquidos y semisólidos con el uso de dos extractos naturales con reconocida actividad antimicrobiana, como posible alternativa a un sistema de preservación convencional como es la mezcla de metil y propil parabeno. Las alternativas naturales evaluadas fueron: el extracto de la corteza de *Magnolia officinalis* y el extracto de las hojas de *Melia azadirachta*.

Para evaluar el desempeño como preservante de los dos extractos naturales y de la mezcla de metil y propil parabeno, se realizaron seis formulaciones de una emulsión de aceite en agua, enriquecida con ingredientes que pudiesen servir como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos. En cada formulación únicamente se modificó el sistema de preservación, para posteriormente realizar la prueba de la eficacia antimicrobiana descrita en el ítem <51> de la USP 38/NF 33, sobre cada una de las formulaciones definidas.

La formulación 1 (extracto de Nim 2% p/p) y la formulación 5 (mezcla 1:3 de Magnolia y Nim) mostraron ser efectivas contra hongos, levaduras y bacterias Gram positivas; pero no, contra bacterias Gram negativas. La formulación 2 (extracto de Magnolia 2% p/p), la formulación 3 (mezcla 1:1 de Magnolia y Nim) y la formulación 4 (mezcla 3:1 de Magnolia y Nim), logran igualar los resultados obtenidos por el sistema preservante convencional (formulación 6), cumpliendo con los dos criterios de aceptación establecidos para la prueba y demostrando que se desempeñara de forma efectiva como agentes antimicrobianos contra las cepas evaluadas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404), manteniendo la integridad y estabilidad microbiológica de una matriz cosmética con alta exigencia de preservación, como la diseñada para este estudio.

Palabras claves: parabenos, preservantes, matriz cosmética, eficacia antimicrobiana, *Magnolia officinalis* y *Melia azadirachta*

ABSTRACT

Today, in the cosmetics sector it is high-impact the development auto preservatives products, which it can claim to be free of chemical preservatives. These types of products are in the front of innovation, and it is where the natural extracts with antimicrobial properties are of vital importance in order to be used as alternative preservatives. This trend contrasts with the constant questioning which are the subject of most synthetic preservatives, for possible negative effects that can generate on human health and the environment. Framed in this line of research in the cosmetic sector, this present project proposes to assess the feasibility of preserving cosmetics liquid and semi-solid with the use of two natural extracts with recognized antimicrobial activity, as a possible alternative to a conventional preservation such as the mixture of methyl paraben and propyl. Natural alternatives evaluated were: the extract from the bark of *Magnolia officinalis* and leaf extract of *Melia Azadirachta*. Both extracts have a recognized antimicrobial activity.

In order evaluate the performance as a preservative of the two natural extracts and mixture of methyl paraben and propyl six formulations of an oil in water enriched with ingredients that could serve as a carbon source for the growth of microorganisms were conducted. In each formulation only preservation system was modified to further testing of the antimicrobial efficacy described in item <51> of USP 38 / NF 33, on each of the formulations defined.

Formulation 1 (Nim extract 2% w/w) and formulation 5 (1:3 mixture of Magnolia and Nim) shown to be effective against fungi, yeasts and Gram-positive bacteria; but not against Gram negative bacteria. Formulation 2 (extract of Magnolia 2% w/w), formulation 3 (1:1 mixture of Magnolia and Nim) and Formulation 4 (3:1 mixture of Magnolia and Nim), manage to match the results obtained by the system conventional preservative (formulation 6), meeting the two acceptance criteria for testing and demonstrating that will serve effectively as antimicrobial agents against strains tested (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404), maintaining the integrity and microbiological stability of a cosmetic matrix with high requirement of preservation, as designed for this study.

Keywords: parabens, preservatives, cosmetics matrix, antimicrobial efficacy, *Magnolia officinalis* and *Melia azadirachta*.

1. INTRODUCCIÓN

Los parabenos son compuestos químicos de amplio uso a nivel industrial por sus propiedades antimicrobianas. La creciente controversia acerca de la actividad carcinogénica que pueden estar aportando los parabenos, pone en duda la seguridad a largo plazo que ofrecen algunos productos en el sector cosmético y farmacéutico (Darbre, Aljarrah, Miller, Coldham, Sauer, & Popo, 2004). Por lo que se hace necesario proponer nuevas alternativas capaces de cumplir la misma función pero con un mejor perfil de seguridad.

Actualmente las industrias del sector cosmético tienen como iniciativa desarrollar y ofrecer productos cada vez más naturales. Los extractos vegetales son una propuesta viable como ingredientes funcionales en muchos tipos de formulaciones, en este estudio la función de interés a evaluar es la acción antimicrobiana (ANDI, 2013). Con el fin de obtener nuevos sistemas preservantes alternativos, que puedan reemplazar el uso de algunos preservantes sintéticos; que son objeto de cuestionamiento por sus posibles efectos negativos sobre la salud humana y sobre el medio ambiente. En este grupo de preservantes cuestionados, se destacan los parabenos, así como otros compuestos que surgieron como alternativas a estos, y que con el pasar el tiempo se les han asociado propiedades irritantes y alergénicas sobre la piel y las mucosas (ANDI, 2013).

En este proyecto se plantea evaluar la propiedad antimicrobiana del extracto de hojas de NIM y el extracto de corteza de Magnolia, a través de la capacidad que puedan tener estos de preservar una emulsión de aceite en agua (O/W), que contiene ingredientes funcionales que son altamente susceptibles a la contaminación microbiológica. Se determinara la eficacia antimicrobiana de los extractos de NIM y Magnolia, cuando son adicionados al producto de manera individual en una concentración del 2% (P/p) y en mezclas a esta misma concentración, pero proporciones 1:1, 0,25:0,75 y 0,75:0.25, respectivamente. La capacidad preservante de estos sistemas será determinada comparativamente con un sistema preservante convencional basado en una mezcla de metilparabeno y propilparabeno a una concentración de 0,4% (P/p), en una proporción 3:1. La evaluación de ambos sistemas será realizada de acuerdo a los lineamientos definidos en la prueba de eficacia del preservante que aparece descrita en los capítulos generales de la farmacopea vigente de los Estados Unidos de América (USP38/NF33, <51> Prueba de eficacia antimicrobiana, 2015).

2. DESCRIPCION DEL PROYECTO

2.1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION

El acelerado crecimiento de la industria cosmética en Latinoamérica y el alto dinamismo de este sector en nuestro país, ha traído la atención del gobierno nacional pues es un sector con mucho potencial para llegar a ser de clase mundial. La industria cosmética y la de productos de aseo y limpieza en Colombia han aumentado constantemente su producción, y reporta un significativo crecimiento en las ventas. Posicionándola como un sector estratégico para el desarrollo de la nación. La cámara de la industria cosmética y aseo de la Asociación Nacional de Industriales (ANDI), proyecta un crecimiento de 3,9%-4,3% por cada año, en el intervalo del 2014 al 2019 (Castro, 2015). Lo que ha generado que las grandes industrias multinacionales se estén perfilando para realizar inversiones en este sector de Colombia, Mary Kay es una de las empresas que ya anuncio su llegada al mercado y se proyecta para iniciar la producción en Colombia (Portafolio, 2015).

El crecimiento sostenido del sector depende en gran medida de la aceptación de la oferta de productos en el mercado, por lo que la opinión de los consumidores sobre los productos es de gran importancia para la industria. Los clientes enfocan su compra teniendo en cuenta la calidad y el precio de los cosméticos, pero la percepción sensorial que experimenta el cliente al momento de usar el producto es muy importante (ANDI, 2013). En cuanto a las características sensoriales, estas se pueden establecer mediante una correcta formulación del producto y la implementación de buenas prácticas de manufactura (BPMs). Sin embargo, para mantenerlas es necesario preservarlo, ya que la principal causa de deterioro se debe a los microorganismos (USP38/NF33, <51> Prueba de eficacia antimicrobiana, 2015). Se sabe que uno de los puntos más cruciales al momento de desarrollar un producto es la correcta elección del sistema preservante, debido a que de este dependerán características como: el olor, color y sabor que tendrá el producto. Además, es deber de la empresa asegurar que el producto estará libre de patógenos que puedan alterar la carga microbiana natural de la epidermis y mucosas externas del cuerpo humano (Leranoz, 2012).

A pesar que los parabenos están siendo cuestionados por su posible implicación carcinogénica (FDA, 2007), en la actualidad son quizá uno de los sistemas preservantes mas utilizados en la industria cosmética y en especial en las formulaciones de cremas y lociones tópicas, como son las emulsiones tipo aceite en agua (O/W). Sin embargo, en paralelo hay un arduo trabajo investigativo en busca de posibles sustitutos alternativos que resulten adecuados para conservar productos cosméticos con alto riesgo de contaminación microbiano, como lo son

las emulsiones de aceite en agua (O/W). Lo que se plantea es evaluar la propiedad antimicrobiana del extracto de las hojas de NIM y de la corteza de Magnolia, para determinar su desempeño como sistema preservante natural en productos cosméticos, con el fin de ofrecer información sobre una posible alternativa al uso de los parabenos, en la preservación de productos cosméticos.

2.2. MARCO TEORICO

Como se mencionó antes, la calidad de los productos tiene impacto en la intención en la aceptación por parte de los consumidores y esto es clave para lograr el crecimiento de esta industria, por tal motivo es de alta importancia elaborar productos que se encuentren en condiciones óptimas para su uso y que sean seguros para la salud de los usuario. Con este propósito, se utiliza un sistema preservante que evita la degradación generada por los microorganismos y asegura que el producto se encuentre libre de agentes patógenos, como *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La elección de este sistema conservante se hace siguiendo lineamientos tanto legales como funcionales, que se enfocan en la seguridad del consumidor y en la conservación del producto.

2.2.1. Sistemas Conservantes

Los sistemas conservantes se componen principalmente de los agentes antioxidantes y los preservantes, los primeros evitan la degradación de los compuestos evitando que estos se oxiden y los otros, impiden la proliferación de bacterias, hongos y levaduras. Los preservantes tienen dos tipos de mecanismos, bacteriostático y/o fungistático o bactericida y/o fungicida. La proliferación de microorganismos es el mayor causante de deterioro en cualquier tipo de producto, pues estos cuentan con sustancias que son fuente potencial de nutrientes para su crecimiento. Por otro lado, hay que saber que el uso de los preservantes no debe reemplazar la utilización de BPMs al momento de la fabricación de un producto cosmético, es explícitamente para mantener las condiciones adecuadas con las que el producto debe ser fabricado y controlar las posibles contaminaciones involuntarias por parte del consumidor al momento de su uso y almacenamiento (Leranoz, 2012).

La elección del sistema preservante va a estar acondicionado tanto al tipo de formulación que se quiere conservar, como a la legislación establecida por el ente regulatorio pertinente. Estos criterios de selección hacen que el preservante sea eficiente y proporcione una completa protección frente a los microorganismos durante el tiempo de vida útil del producto. Para empezar, hay que considerar solo los preservantes que se encuentran permitidos, y usarlo a las concentraciones a las que se encuentran establecidas según el reglamento (CE) 1223 del 2009 del parlamento Europeo, el cual esta armonizado con la normativa de Colombia. El

segundo criterio es seleccionar y evaluar la necesidad del preservante, teniendo en cuenta el grado de susceptibilidad del producto, un indicativo para determinar este criterio es la actividad de agua (A_w). La determinación de la actividad de agua establecida en el capítulo general <1112> de la USP 38/NF 33, es una prueba que establece la cantidad de agua que se encuentra disponible en la formulación, e indica indirectamente el grado de susceptibilidad, porque a mayor actividad de agua, mayor va a ser la proliferación de microorganismos, y si esta es reducida el producto estará menos propenso a la contaminación microbiana. La actividad de agua se puede disminuir implementando pequeños cambios en la concentración de excipientes como el NaCl, sacarosa, alcohol, propilenglicol o glicerina (USP38/NF33, <1112> Determinación de actividad de agua, 2015).

Tabla 1. Actividades de agua (A_w) requeridas para sustentar el crecimiento de microorganismos representativos (USP38/NF33, <1112> Determinación de actividad de agua, 2015).

Bacteria	A_w	Hongos Filamentosos y Levaduras	A_w
<i>P. aeuriginosa</i>	0,97	<i>R. nigricans</i>	0,93
<i>B. cereus</i>	0,95	<i>M. plumbeus</i>	0,92
<i>C. botulinum, Tipo A</i>	0,95	<i>R. mucilaginosa</i>	0,92
<i>E. coli</i>	0,95	<i>S. cerevisiae</i>	0,90
<i>C. perfringens</i>	0,95	<i>P. variotti</i>	0,84
<i>L. viridescens</i>	0,95	<i>P. chrysogenum</i>	0,83
<i>Salmonella spp.</i>	0,95	<i>A. fumigatus</i>	0,82
<i>E. aerogenes</i>	0,94	<i>P. glabrum</i>	0,81
<i>B. subtilis</i>	0,90	<i>A. flavus</i>	0,78
<i>M. lysodekticus</i>	0,93	<i>A. brasiliensis</i>	0,77
<i>S. aureus</i>	0,86	<i>Z. rouxii</i>	0,62
<i>H. holobium</i>	0,75	<i>X. bisporus</i>	0,61

El tercer criterio en la selección, es evaluar las posibles incompatibilidades que puedan existir entre el sistema preservante y los excipientes dentro de la formulación, ya que esto puede reducir tanto la efectividad de la función antimicrobiana como la de los demás componentes. Igualmente, es de vital importancia en el ámbito cosmético tener en cuenta las características organolépticas críticas que aporte el preservante a la formulación.

El preservante ideal debe ser de estructura química conocida, preferiblemente soluble en agua, no debe producir ninguna reacción de sensibilización, tiene que ser estable a condiciones extremas de pH y temperatura. Por otro lado, debe ser compatible con la formulación y el material de envase, no puede alterar organolépticamente el producto y finalmente tiene que tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana, para poder asegurar que el producto va a conservarse y la formulación no se verá alterada por el preservante (Leranoz, 2012). Ningún preservante reúne todas estas cualidades, por eso se da uso de sistemas preservantes, en los que se implementan dos o más compuestos que sean capaces de abarcar al máximo estas características y ampliar el espectro de actividad.

2.2.1.1. Parabenos

Químicamente los parabenos, son ésteres del ácido parahidroxibenzoico, estos compuestos antimicrobianos son actualmente permitidos en el uso cosmético a unas concentraciones máximas de 0,4% individualmente y para mezclas de 0,8%. Los parabenos funcionan principalmente en la fase acuosa y son útiles para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias Gram positivas, y en menor medida Gram negativas (La Comisión Europea, 2014).

Desde el año 2005 el Cosmetic Ingredient Review (CIR) inicio una nueva evaluación de la seguridad en el uso de los parabenos, dicha iniciativa se puede asociar a la sospecha de actividad carcinogénica. En un estudio se demostró la presencia de parabenos en tumores de mama de 20 mujeres (Darbre, Aljarrah, Miller, Coldham, Sauer, & Popo, 2004). Esto se debe a que los parabenos cuentan con propiedades similares a los estrógenos, y estos tienen una implicación en la aparición del cáncer de mama. Sin embargo, en dicho estudio no se encontró evidencia suficiente para decir que los parabenos fueron los causantes de la formación de los tumores. Por otro lado, la FDA no ha determinado ningún cambio en la regulación del uso de los parabenos, pero no dejan de lado la posible existencia de un riesgo a largo plazo con su implementación, y continúan realizando investigaciones (FDA, 2007).

2.2.2. Extractos naturales

Desde los inicios de la medicina, los preparados naturales han sido usados para aliviar dolores y molestias en las personas. En la actualidad, se está tendiendo

nuevamente a darle amplio uso a los extractos vegetales, debido a que la industria cosmética debe responder a los intereses, demandas y necesidades de los usuarios por medio de la innovación; en donde está tomando gran relevancia los productos naturales. Creando un mercado más sostenible y responsable con el medio ambiente (ANDI, 2013).

Los extractos vegetales cuentan con variedad de sustancias bioactivas con propiedades antimicrobianas, dicha actividad se da mediante diferentes mecanismos de acción que aún no son completamente entendidos. A continuación se muestra información más detallada de los extractos vegetales que se utilizaran en el presente estudio.

2.2.2.1. NIM, *Melia azadirachta L.*

El nim inicia su historia hace 5000 años en la India, donde lo utilizaban para curar enfermedades de la piel y para la protección de los insectos, en personas y en plantas. A lo largo de la historia se siguió usando con fines medicinales y se le atribuyeron propiedades antisépticas, humectantes, antiinflamatorias, repelente de insectos, hepatoprotectoras, laxantes y emolientes, por lo que se utilizó como ingrediente en variados preparados comestibles, cosméticos y farmacológicos (Provital Group, 2011).

En cuanto a la fitoquímica del NIM, se pueden encontrar compuestos como terpenoides, flavonoides, esteroides, ácidos, antraquinonas, alcaloides, saponinas y taninos. Específicamente en las hojas se encuentran algunos triterpenoides como el dihidro nimocinol, nimbidina y el 6- α -hidroxi-azadiradiona, limonoides como la azadiractina, el α -pineno, β -pineno y flavonoides como la quercetina y el quercitrin (Sharma & Shiva, 2013) (Provital Group, 2011). Siendo estos compuestos los responsables de tener una actividad antimicrobiana reconocida.

La actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral se ha visto demostrada en varios estudios en donde se evidencia que el aceite extraído de órganos como las hojas, semillas y corteza tienen efecto sobre microorganismos Gram negativos y Gram positivos. Por otro lado, se aprecia la gran efectividad que tiene el extracto de hojas contra hongos como *Candida*, dicho efecto se le acredita a la presencia de quercetin, pineno y azadiractina que se encuentran en las hojas (Provital Group, 2011). El extracto de las hojas de nim ha mostrado mayor efectividad antifúngica con una CMI de 50-200 $\mu\text{g/mL}$, frente al extracto obtenido de las semillas, que muestra una CMI con 650 $\mu\text{g/mL}$. Esto se puede deber principalmente a la mayor presencia de compuestos terpenoides y limonoides en las hojas (Salazar, Alberto, Sánchez, Arteaga, & Londoño, 2015). Por lo que en este estudio se pretende trabajar con un extracto obtenido de las hojas de *Melia azadirachta L.*, el cual es soluble en agua.

2.2.2.2. Magnolia, *Magnolia Officinalis*

El extracto de *Magnolia Officinalis* es usado en la medicina tradicional china y se le asocian actividades antibacterianas por la presencia de los compuestos Magnolol y Honokiol. Se ha demostrado que su actividad antibacteriana es de gran robustez comparada contra la de otros extractos utilizados por la misma cultura. El efecto es realizado por ambos compuestos de forma independiente, pero se ha evidenciado que el trabajo en sinergia de estos dos componentes logra aumentar su efectividad, siendo esta una alternativa natural comparable con algunos antibióticos usados en el mercado, como la estreptomina (Chan, Cheach, Heng, Saw, & Weng, 2008).

En dicho estudio se evaluó la efectividad de los compuestos Magnolol y Honokiol individualmente y en sinergia, donde se compararon posteriormente contra la estreptomina. En el trabajo se concluyó que el extracto de la corteza de *Magnolia officinalis*, en el que se tenía presente el Magnolol y Honokiol en sinergia, tenía efectos comparables a los de la estreptomina. Además, se encontró una actividad antimicrobiana efectiva contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *C. albicans*. También se demostró que el extracto tenía una actividad antimicrobiana contra *M. smegmatis* mayor que la estreptomina en un 20%. Cabe resaltar que el estudio buscaba probar la eficacia de los métodos tradicionales de la medicina china para la preparación de hierbas (Chan, Cheach, Heng, Saw, & Weng, 2008).

En otro estudio realizado se encontró que la actividad del Magnolol y Honokiol contra *C. albicans* exhibían una CMI de 16-32 µg/mL. En donde concluyen que estos compuestos podrían inhibir la formación de biopelículas por medio de la disminución de la adhesión, el impedimento en la transición morfológica de levadura a hifas y finalmente por su efecto fungicida (Liao, Sun, & Wang, 2015).

2.2.3. Prueba de eficacia del preservante

Una vez se ha terminado el desarrollo del producto es importante realizar la prueba de eficacia del preservante, debido a que el agente antimicrobiano debe demostrar su correcta funcionalidad en productos que estén expuestos o sean susceptibles a la contaminación microbiana. Como se mencionó antes, existen productos a los cuales no es necesario adicionar agentes preservantes, ya sea por motivos de diseño en la formulación o porque la actividad de agua es tan baja que no permite la viabilidad de los microorganismos. En esta prueba se tienen unas condiciones de alta exigencia para el producto, debido a que se somete directamente a una contaminación intencional con alta carga microbiana. Los microorganismos de desafío se eligen especialmente para cada caso. En los productos cosméticos, se utilizan microorganismos que están seleccionados teniendo en cuenta los atributos físicos, la formulación y el uso previsto del producto, estos atributos o especificaciones sirven para ubicarlo en una categoría

especifica establecida por la USP (categoría 2) (USP38/NF33, <51> Prueba de eficacia antimicrobiana, 2015).

2.2.4. Emulsiones cosméticas

Las emulsiones son sistemas compuestos por dos líquidos inmiscibles entre sí, donde uno se encuentra uniformemente disperso en el otro, gracias a la presencia de un sistema surfactante que logra disminuir la tensión interfacial generada entre ambas fases, permitiendo su estabilización. Consiste en glóbulos que tienen diámetros iguales o mayores a las partículas coloidales de mayor diámetro. El líquido que se encuentra disperso recibe el nombre de fase interna, y el otro líquido es la fase continua (Gennaro, 2003).

Las cremas y lociones fluidas son productos cosméticos que se formulan principalmente a partir de una emulsión. Estas formulaciones están compuestas por aceites, grasas y ceras que se añaden a una fase acuosa o hidroalcohólica, y se adicionan agentes emulsificantes y emulgentes, de tal forma que se obtiene un sistema estable. Existen dos tipos de emulsiones, si el componente graso se dispersa en la fase acuosa, se obtiene una emulsión aceite en agua u O/W. Si por lo contrario, la fase acuosa se encuentra dispersa en la fase oleosa se tendría una emulsión agua en aceite o W/O (Simmons, 2000).

El tipo de emulsión a obtener dependerá de varios factores, el primero es la proporción de la fase-volumen. Cuanto mayor sea la proporción de una de las dos fases, mayor será su probabilidad de ser la fase externa, y la fase de menor proporción será la fase interna. Por otro lado, la elección de los agentes estabilizantes (emulsificantes y emulgentes) es un factor decisivo, ya que los emulsificantes con los valores HLB altos tienden a formar emulsiones O/W (8-16), mientras que aquellos con HLB bajos (3-8) forman emulsiones W/O. (Gennaro, 2003).

La sigla HLB proviene de Hydrophile Lipophile Balance, esta es una escala empírica que busca describir el balance entre la porción hidrófila y lipófila de una molécula surfactante, la cual determinara finalmente el comportamiento que tendrá la molécula (Gennaro, 2003).

2.2.4.1. Estabilidad de las emulsiones

Las emulsiones son sistemas compuestos por dos líquidos inmiscibles y un agente estabilizante, por lo que una preocupación latente en este tipo de formulaciones es la preservación de la estabilidad del producto durante su vida útil. El primer caso de inestabilidad física es el cremado, en donde se da un proceso de separación entre la fase interna y la externa; la fase interna que se encontraba dispersa se dirigirá ya sea a la superficie o al fondo del recipiente dependiendo de su densidad, para encontrar una mayor estabilidad. El cremado no es un proceso de

inestabilidad tan grave, ya que aplicando una agitación moderada, las gotículas se volverán a dispersar (Gennaro, 2003).

Por otro lado, cuando se produce una coalescencia, las gotículas dispersas se agrupan formando una sola fase y se da la ruptura de la emulsión, debido a que este estado es muy inestable y los agregados resultante no se puede dispersar. Finalmente, otro problema de estabilidad es la inversión de fases, este problema se puede deber inicialmente a la formulación planteada; ya sea porque las proporciones de las dos fases se encuentran muy próximas, porque se utilizó un sistema estabilizante con un valor de HLB inadecuado, o porque se alcanzó la temperatura de inversión de fases. La temperatura afecta directamente la solubilidad relativa de los surfactantes no iónicos, en donde se puede pasar de un surfactante que tenía un comportamiento hidrosoluble a que sea liposoluble, modificando así el signo de la emulsión (Gennaro, 2003).

2.2.4.2. Estudios de estabilidad en emulsiones

Las pruebas de estabilidad sirven para obtener información acerca de cómo se verá afectada la calidad o integridad de un producto terminado con el paso del tiempo, bajo la influencia de varios factores ambientales tales como la temperatura, la humedad, los microorganismos y la luz. Además, es de gran utilidad para determinar el tiempo de vida útil del producto y las recomendaciones de almacenamiento. Asegurando así, que las características tanto funcionales como estéticas del producto, se mantendrán a través del tiempo (ICH, 2003).

Generalmente el producto debe ser evaluado a las condiciones normales de almacenamiento, poniendo a prueba su estabilidad térmica, su sensibilidad a la humedad o el potencial de pérdida de su función. Por eso, estos estudios son considerados de largo plazo, donde se toman inicialmente datos de estos los atributos cada tres meses en el primer año. Otra alternativa son las pruebas aceleradas, donde los estudios están diseñados para aumentar la velocidad de degradación química y cambio físico, utilizando condiciones extremas de almacenamiento. Estas pruebas aceleradas se utilizan solamente para evaluar el efecto que puede tener un producto si las condiciones de almacenamiento no son respetadas en un corto plazo de tiempo (ICH, 2003).

También existen métodos generales para evaluar la estabilidad de las emulsiones, en cuanto a sus principios fisicoquímicos. Estos métodos consisten en los cambios de la masa bruta, estudios con centrifugación, determinaciones dieléctricas, determinaciones de la superficie y estudios con aceleración de movimiento (Gennaro, 2003).

2.3. Objetivos

2.3.1. General

Evaluar la capacidad antimicrobiana de dos extractos vegetales y sus mezclas a tres diferentes niveles de composición, para determinar su utilidad como sistema preservante natural alternativo para la preservación de formas cosméticas líquidas y semisólidas.

2.3.2. Específicos

- Desarrollar la formulación de una emulsión O/W con ingredientes funcionales de uso cosmético, que sea altamente susceptible a la contaminación por microorganismos.
- Determinar la eficacia antimicrobiana que tiene cada extracto vegetal de forma individual, sobre la emulsión O/W que fue diseñada para tener un alto requerimiento de preservación.
- Determinar la eficacia antimicrobiana que tiene cada mezcla de los dos extractos vegetales, sobre una emulsión O/W que fue diseñada para tener un alto requerimiento de preservación.

2.4. Metodología

La primera etapa de esta investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Icesi, en el laboratorio de Farmacotecnia (304L), donde se elaboró la producción de 6 lotes piloto de la formulación cosmética propuesta para evidenciar la eficacia del preservante (Tabla 2). Posteriormente, en área de Microbiología de la planta de Tecnoquímicas en Jamundi, se llevó a cabo el protocolo establecido para la prueba de eficacia antimicrobiana (<51> de la USP 38/NF 33). La metodología desarrollada, cuenta con dos procedimientos, el primero fue para determinar la capacidad preservante que tienen los extractos y la segunda fue el recuento en placa, siendo esta una técnica necesaria para verificar si el producto cumple con los criterios de aceptación que se establecen en la USP.

Inicialmente se realizó el diseño de una emulsión cosmética tipo O/W de uso facial con ingredientes funcionales, como aminoácidos, ácidos grasos y vitaminas; los cuales tienen un efecto hidratante y nutritivo. Estos componentes son una fuente de energía potencial para los microorganismos, por lo que la formulación es de una muy alta susceptibilidad a la contaminación. Esta matriz cosmética se utilizó con el fin de proporcionar las condiciones más desafiantes al sistema preservante.

Se elaboraron 6 formulaciones diferentes, estas cuentan con la misma base cosmética y la única diferencia entre ella fue el sistema de preservación que se utilizo:

Tabla 2. Formulación de la base cosmética para la prueba de eficacia.

No.	Materia prima	Cantidad (%)	g/500g	Función
1	Alcohol Cetílico	6,0	30,0	Contextura
2	Triglicérido Caprílico Capríco	8,0	40,0	Emoliente
3	Steareth-2	2,0	10,0	HLB: 4.9 Emulsificantes
4	Steareth-21	3,0	15,0	HLB: 15.5 Emulsificantes
5	Glicerina Vegetal	8,0	40,0	Humectante, cosolvenca.
6	D-Pantenol	2,0	10,0	Acondicionamiento, Hidratante
7	Vitamina E Acetato	0,2	1,0	Antioxidante
8	ProdeW 500*	1,0	5,0	Ingrediente funcional, nutriente
9	Agua Purificada	69,8	349,0	Vehículo
	Total	100	500	

*ProdeW 500: Esta materia prima es una mezcla estándar que contiene: Sodium PCA, Sodium Lactate, Arginine, Aspartec Acid, PCA, Glycine, Alanine, Serine, Valine, Proline, Threonine, Isoleucine, Histidine, Phenylalanine and Water.

A continuación se muestra el orden en el cual se realizaron las variaciones del sistema preservante y la concentración a la cual se evaluó:

- **Formulación 1:** Extracto de Nim a una concentración de 2% (P/P).
- **Formulación 2:** Extracto de Magnolia a una concentración de 2% (P/P).
- **Formulación 3:** Mezcla 1:1 de extracto de Nim y el extracto de Magnolia a 2% (P/P).
- **Formulación 4:** Mezcla 0.25:0.75 de extracto de Nim y el extracto de Magnolia a 2% (P/P).

- **Formulación 5:** Mezcla 0.75:0.25 de extracto de Nim y el extracto de Magnolia a 2% (P/p).
- **Formulación 6:** Mezcla 3:1 de metilparabeno y propilparabeno a 0,4% (P/p).

2.4.1. Materiales y Equipos

Materias Primas: (Controles de calidad en los anexos.)

- Alcohol Cetílico (Tecnoquímicas S.A, Colombia)
- Triglicérido Caprílico Capríco (Universidad Icesi, Colombia)
- Steareth-2, BRIJ S2-SO-(AP) (Croda, Colombia)
- Steareth-21, BRIJ S721-SO-(AP) (Croda, Colombia)
- Glicerina Vegetal (Universidad Icesi, Colombia)
- D-Pantenol (Tecnoquímicas S.A, Colombia)
- Vitamina E Acetato (Universidad Icesi, Colombia)
- ProdeW 500 (Ajinomoto Do Brasil IND., Brasil)
- Extracto de Magnolia, LEMA 14-A (Naturalis Srl, Italia; Cromaroma Ltda., Colombia)
- Extracto de NIM HG (Aromatheka, Colombia)
- Agua Peptonada (Tecnoquímicas S.A, Colombia)

Equipos:

- Cabina de seguridad biológica FLC 120
- Incubadora $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$
- Balanza analítica digital Mettler Toledo
- Plancha de agitación y calentamiento VWR
- pH metro
- Autoclave de vapor
- Micropipeta Fisherbrand EX.
- Puntas desechables estériles Fisherbrand 101-1000 μL .
- Baño María Memmert WNB 14

Medios de cultivo:

- Agar digerido de caseína y soja
- Agar de Sabouraud dextrosa

Microorganismo de Prueba

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Tecnoquímicas S.A, Colombia)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Tecnoquímicas S.A, Colombia)
- *Escherichia coli* ATCC 8739 (Tecnoquímicas S.A, Colombia)
- *Candida albicans* ATCC 10231 (Tecnoquímicas S.A, Colombia)

- *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404 (Tecnoquímicas S.A, Colombia)

2.4.2. Prueba de eficacia del preservante (USP)

Las cepas estándar que se usaron corresponden a los siguientes ATCC: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. En la tabla 3 se describen las condiciones de cultivo para el inóculo, para las bacterias se utilizó el cultivo de agar Digerido de Caseína y Soya (Casoy) y el agar Sabouraud Dextrosa para los hongos filamentosos. Las cepas estándar fueron proporcionadas por la compañía Microbiologics.

Tabla 3. Condiciones de cultivo para la preparación de inóculos (**USP38/NF33, <51> Prueba de eficacia antimicrobiana, 2015**).

Organismo	Medio Apropriado	Temperatura de Incubación (°C)	Tiempo de incubación (Horas)	Tiempo de recuperación microbiana (Días)
<i>E. coli</i>	Casoy	32,5 ± 2,5°	18-24	3-5
<i>P. aeruginosa</i>	Casoy	32,5 ± 2,5°	18-24	3-5
<i>S. aureus</i>	Casoy	32,5 ± 2,5°	18-24	3-5
<i>C. albicans</i>	Sabouraud	22,5 ± 2,5°	44-52	3-5
<i>A. brasiliensis</i>	Sabouraud	22,5 ± 2,5°	144-240	3-7

Teniendo en cuenta la división de categorías de productos no estériles establecida por la farmacopea americana USP 38/NF 33, los productos cosméticos se pueden clasificar como categoría 2. Para esta categoría, el criterio de aceptación de la eficacia antimicrobiana es el siguiente:

- Bacterias: A los 14 días, se debe tener una reducción logarítmica de no menos de 2.0 desde el inóculo inicial; y a los 28 días ningún incremento con respecto al recuento de los 14 días.
- Levaduras y hongos filamentosos: Ningún incremento a los 14 ni a los 28 días, con respecto al inóculo inicial.

Una vez realizada las 6 formulaciones se procedió hacer la inoculación directamente en el producto de cada una de las cepas mencionadas. Es importante tener en cuenta que la concentración final del inóculo con respecto al producto debe estar en el rango de 1×10^5 y 1×10^6 UFC/mL, y que el volumen adicionado del inóculo se debe encontrar entre 0,5% y 1,0% del volumen total. Por lo que se tomaron 10 gramos de cada formulación, se situaron en whirl-pak

estériles de Nasco, y en estos se introdujeron 0,1 mL de cada microorganismo propuesto. Posteriormente, se incubaron las muestras a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, y se siguió la metodología del recuento en placa en el día 7, 14 y 28 según lo especificado en el capítulo general <61> de la USP 38/NF 33.

2.4.3. Recuento en placa

Esta metodología se llevo a cabo para cuantificar el número de bacterias mesófilas y hongos filamentosos que se pueden desarrollar en condiciones aeróbicas. Las pruebas diseñadas en la farmacopea americana (USP), sirven para determinar si un compuesto o producto terminado cumple con las especificaciones de calidad microbiológica establecidas (USP38/NF33, <61> Examen microbiológico de productos no estériles, 2015).

El método de vertimiento en placa se realizo por duplicado para cada formulación y se uso el recuento medio del los resultados. Para el día 7, se tomo 1 gramo de los 10 gramos que fueron inoculados, dicho gramo se deposito en una caja Petri y se vertió 15-20 mL del agar indicado para cada microorganismo; en este recuento no se realizo ninguna dilución y se hizo con todas las formulaciones. Posteriormente, para el día 14 se realizo el mismo procedimiento, pero en las placas que presentaron un gran crecimiento bacteriano (incontables) en el día 7, se les hicieron 5 diluciones con agua peptonada; de cada dilución se tomo 1 mL y se sembró en una caja Petri. Para el día 28 se siguió utilizando el mismo procedimiento. Todos los recuentos se realizaron 5 días después de la incubación a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

Durante el procedimiento se llevo a cabo un control negativo de cada medio y del agua peptonada, cuando correspondía, en donde se agregara solamente 15-20 mL del agar. En este medio se esperaba que no hubiera ningún tipo de proliferación microbiana, si esto sucedía la prueba quedaba anulada. Ningun control negativo presento proliferación.

2.4.4. Matriz de Marco Lógico

Objetivo General: Evaluar la capacidad antimicrobiana de dos extractos vegetales y sus mezclas a tres diferentes niveles de composición, para determinar su utilidad como sistema preservante alternativo natural para la preservación de formas cosméticas líquidas y semisólidas.

Objetivos Específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
Desarrollar la formulación de una emulsión O/W con ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> Revisar y seleccionar los ingredientes funcionales de la formulación 	<ul style="list-style-type: none"> Obtención de la formulación cuantitativa y cualitativa de los compuestos a 	<ul style="list-style-type: none"> Disposición de la bibliografía necesaria para seleccionar los excipientes teniendo en cuenta criterios

<p>funcionales de uso cosmético, que sean altamente susceptibles a la contaminación por microorganismos.</p>	<p>cosmética y preservarla con los extractos a evaluar.</p>	<p>utilizar en el producto cosmético.</p>	<p>técnicos y funcionales. <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de las materias primas seleccionadas. </p>
---	---	---	---

<p>Determinar la eficacia antimicrobiana que tiene cada extracto vegetal de forma individual, sobre la emulsión O/W que fue diseñada para tener un alto requerimiento de preservación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar el inculo estándar que se describe en el procedimiento. • Inocular una carga microbiana de 10^6 ufc/mL en la matriz cosmética, de cada microorganismo específico. • Llevar a cabo el recuento en placa en los días establecidos por la USP. 	<ul style="list-style-type: none"> • La formulación es estable. • El número de microorganismos supervivientes al tiempo 0, y a los 7, 14, y 28 días. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los niveles de microorganismos viables en la matriz cosmética es máximo de 10^3 ufc/g o mL. Se requiere ausencia de: <i>S. aureus</i>, <i>C. albicans</i>, <i>P. aeuriginosa</i> y <i>A. brasiliensis</i>. • Existe la disponibilidad de las cepas ATCC a utilizar.
---	---	--	---

<p>Determinar la eficacia antimicrobiana que tiene cada mezcla de los dos extractos vegetales, sobre una emulsión O/W que fue diseñada para tener un alto requerimiento de preservación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar el inculo estándar que se describe en el procedimiento. • Inocular una carga microbiana de 10^6 ufc/mL en la matriz cosmética, de cada microorganismo específico. • Llevar a cabo el recuento en placa en los días establecidos por la USP. 	<ul style="list-style-type: none"> • La formulación es estable. • El número de microorganismos supervivientes al tiempo 0, y a los 7, 14, y 28 días. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los niveles de microorganismos viables en la matriz cosmética es máximo de 10^3 ufc/g o mL. Se requiere ausencia de: <i>S. aureus</i>, <i>C. albicans</i>, <i>P. aeuriginosa</i> y <i>A. brasiliensis</i>. • La mezcla de extractos vegetales presentan una actividad antimicrobiana en al menos una de sus proporciones empleadas y se logra abarcar un mayor espectro. • Existe la disponibilidad de las cepas ATCC a utilizar.
---	---	--	--

2.5. Resultados y Discusión

La fabricación de las 6 formulaciones se llevo a cabo en las instalaciones de la universidad Icesi, estos lotes pilotos no fueron elaborados bajo condiciones ambientales controladas por lo que la calidad microbiológica del producto no se puede asegurar completamente. Por esta razón se decidió realizar diversas pruebas antes de iniciar con el ensayo de la eficacia antimicrobiana.

A cada formulación se le realizo diferentes ensayos básicos para determinar el signo de la emulsión y las principales características estas, con el fin de descartar que durante el proceso de fabricación o el tiempo de almacenamiento se hubiese presentado alguna inestabilidad que causara la inversión de fases o un cambio en sus propiedades. Inicialmente se determinaron características como pH y características organolépticas (tabla 4).

Tabla 4. Características generales de las 6 formulaciones.

	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5	Formula 6
pH	5.8	5.1	5.3	5.1	5.6	6.3
Olor	Carac. a Nim, moderado	Carac. a Magnolia, suave	Carac., moderado	Carac., suave	Carac., Moderado	Ninguno
Color	Beige	Blanco	Beige	Blanco	Beige	Blanco
Aspecto y sensación	Suave y ligeramente grasosa	Suave y ligeramente grasosa	Suave y ligeramente grasosa	Suave y ligeramente grasosa	Suave y ligeramente grasosa	Suave y ligeramente grasosa

Posteriormente se evaluó el tipo de emulsión, donde se obtuvieron los resultados ilustrados en la tabla 5. Según el diseño de la formulación base de la crema cosmética, la emulsión deberá ser O/W.

Tabla 5. Determinación del tipo de emulsión.

Emulsión	Difusión en Sudan III	Difusión en Azul de Metileno	Difusión en papel filtro	Lavabilidad	Tipo de Emulsión
Formula 1	No, Baja difusión	Si, alta difusión	Halo grande y opaco	Fácil	O/W
Formula 2	No, Baja difusión	Si, alta difusión	Halo grande y opaco	Fácil	O/W

Formula 3	No, Baja difusión	Si, alta difusión	Halo grande y opaco	Fácil	O/W
Formula 4	No, Baja difusión	Si, alta difusión	Halo grande y opaco	Fácil	O/W
Formula 5	No, Baja difusión	Si, alta difusión	Halo grande y opaco	Fácil	O/W
Formula 6	No, Baja difusión	Si, alta difusión	Halo grande y opaco	Fácil	O/W

Los resultados confirman lo afirmado, se cuenta con un sistema base de una emulsión O/W, porque se puede apreciar que todas las formulaciones tienen una mayor afinidad y se difunden fácilmente en la solución del colorante polar, en este caso se usó el azul de metileno. Por el contrario, no se difunde en el sudan III (tinte soluble en aceites), debido a que la mayor proporción de la formulación es acuosa. Adicionalmente, se percibe que una vez aplicado el producto, se remueve fácilmente con el lavado sin dejar sensación de oclusividad sobre la piel. Esta información se confirma con el HLB = 11,3 de la mezcla de Steareth-2 y Steareth-21, utilizado como sistema emulsificante (ecuación 1). Teniendo en cuenta la tabla 2 que se muestra en el artículo “classification of surface-active agents by “HLB”, podemos observar que los sistemas con valores de HLB en el rango entre 8-18 se usan como emulsificantes O/W (Griffin, 1949).

$$HLB = (HLB_A \times f_A) + (HLB_B \times f_B) \text{ Ecuación 1}$$

En donde:

- HLB_A : Es el HLB correspondiente al Steareth-21 que es 15.5 (Rieger & Rhein, 1997).
- f_A : Es la fracción correspondiente al Steareth-21 que es 60%.
- HLB_B : Es el HLB correspondiente al Steareth-2 que es 4.9 (Rieger & Rhein, 1997).
- f_B : Es la fracción correspondiente al Steareth-2 que es 40%.

$$HLB = (15.5 \times 0.6) + (4.9 \times 0.4) = 11.26$$

Finalmente, en esta etapa preliminar, se realizó un control de calidad microbiológico. Este ensayo fue ejecutado con la colaboración de los estudiantes de control de calidad físico-químico y microbiológico, pues no se incluyó dentro del planteamiento ni en el presupuesto de la investigación. Los resultados obtenidos se encuentran reportados entre las tablas 6-11. En donde se determinó el recuento total de microorganismo aerobios (RTMA) y el recuento total combinado de hongos y levaduras (RTCHL).

Tabla 6. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 1.

Tipo de la Muestra	Especificación RTMA (UFC/g)	Conteo de las placas RTMA (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 1	10 ²	0	0	0	Cumple
Tipo de la Muestra	Especificación RTCHL (UFC/g)	Conteo de las placas RTCHL (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 1	10 ¹	300	320	310	No cumple

Tabla 7. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 2.

Tipo de la Muestra	Especificación RTMA (UFC/g)	Conteo de las placas RTMA (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 2	10 ²	0	10	5	Cumple
Tipo de la Muestra	Especificación RTCHL (UFC/g)	Conteo de las placas RTCHL (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 2	10 ¹	0	0	0	Cumple

Tabla 8. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 3.

Tipo de la Muestra	Especificación RTMA (UFC/g)	Conteo de las placas RTMA (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 3	10 ²	0	0	0	Cumple
Tipo de la Muestra	Especificación RTCHL (UFC/g)	Conteo de las placas RTCHL (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 3	10 ¹	0	10	5	Cumple

Tabla 9. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 4.

Tipo de la Muestra	Especificación RTMA (UFC/g)	Conteo de las placas RTMA (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 4	10 ²	0	0	0	Cumple
Tipo de la Muestra	Especificación RTCHL (UFC/g)	Conteo de las placas RTCHL (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 4	10 ¹	0	0	0	Cumple

Tabla 10. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 5.

Tipo de la Muestra	Especificación RTMA (UFC/g)	Conteo de las placas RTMA (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 5	10 ²	600	1200	900	No Cumple
Tipo de la Muestra	Especificación RTCHL (UFC/g)	Conteo de las placas RTCHL (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	100	100	100	N/A
Formulación 5	10 ¹	680	570	630	Invalido

Tabla 11. Resultados del control de calidad microbiológico de la formulación 6.

Tipo de la Muestra	Especificación RTMA (UFC/g)	Conteo de las placas RTMA (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 6	10 ²	0	0	0	Cumple
Tipo de la Muestra	Especificación RTCHL (UFC/g)	Conteo de las placas RTCHL (UFC/g)			Concepto
		Placa 1	Placa 2	Promedio	
Control Negativo	0	0	0	0	N/A
Formulación 6	10 ¹	0	0	0	Cumple

Las formulaciones 2,3,4 y 6 cumplieron las especificaciones tanto del recuento total de microorganismo aerobios (RTMA) como el recuento total combinado de hongos y levaduras (RTCHL), para el control de calidad microbiológico establecido en el numeral <61> Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de recuento microbiano de la USP 38/NF 33. Para la categoría de las cremas cutáneas se establece que debe haber máximo 10^2 UFC/g para el RTMA y 10^1 UFC/g para el RTCHL, y como se puede apreciar en las tablas de resultados, los controles negativos y las placas con las muestras tuvieron un crecimiento de <100 UFC/g RTMA y <10 UFC/g RTCHL (USP38/NF33, <1111> Examen microbiológico de productos no esteriles, 2015).

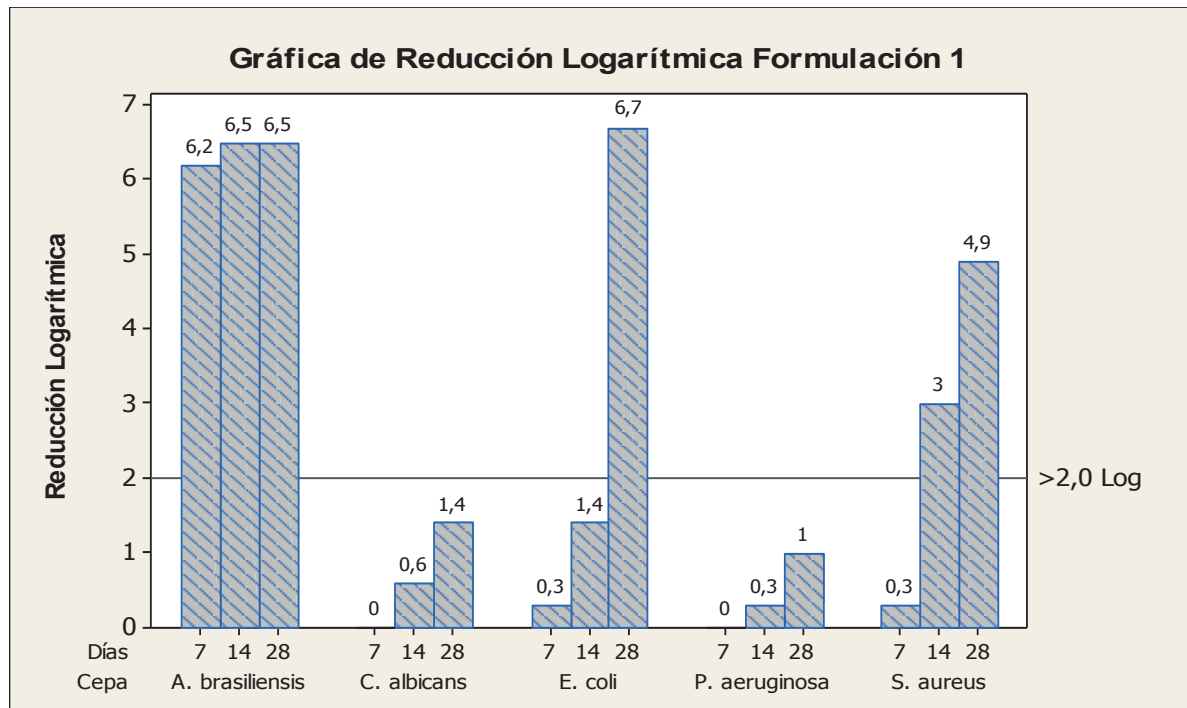
Por otro lado, la formulación 1 tuvo un cumplimiento de la especificación del RTMA, pero en el caso del RTCHL presentó un crecimiento >10 UFC/g por lo que no cumplió con lo establecido. Finalmente, la formulación 5 mostró un crecimiento bacteriano >100 UFC/g el RTMA y el control negativo no tuvo proliferación. En cambio, en el RTCHL tampoco se cumplió con la especificación establecida pero se evidenció una posible contaminación al momento de realizar la prueba, ya que el control negativo presentó una proliferación de microorganismos.

En los dos casos que no se cumplió con las especificaciones establecidas, se asocia este comportamiento a una contaminación generada en el proceso de fabricación del lote piloto correspondiente. Esta contaminación se relaciona con las condiciones ambientales que se tienen en el laboratorio 304L y no con una contaminación cruzada entre los materiales utilizados en la fabricación y el producto final. Esto se debe a que en esta área no se tiene un control de la calidad del aire que se suministra. A pesar que se tuvo especial cuidado con la limpieza de cada material utilizado en el proceso.

Aun así, esta prueba solo sirve para hacer una idea inicial de la carga microbiana que tiene cada producto, pero no hubo una influencia significativa en los ensayos posteriores. En relación con la prueba de eficacia, la carga inicial con la que se contrastó los siguientes días no fue hallada por medio de un recuento en placa del día 0, ya que esta investigación parte de inóculos estandarizados, adquiridos por Tecnoquímicas a la empresa Microbiologics; dichos estándares están certificados por Epower microorganisms y tienen una determinada concentración inicial. El primer recuento en placa que se realizó fue el del día 7, este no influye en el criterio de aceptación, pero sirve para tener una guía inicial de cómo está funcionando el sistema preservante. Además, el recuento del día 7 fue útil para decidir si se debían hacer futuras diluciones en el caso de que dicho recuento tuviera tanto crecimiento microbiano que fuera incontable. En estos casos se tomó la decisión de reportar nuevamente la concentración inicial, ya que no era posible realizar un conteo aproximado.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada formulación en la prueba de eficacia antimicrobiana, ilustrando primero las repeticiones realizadas por individual y posteriormente el recuento medio de los resultados. La decisión de aceptación o rechazo de los criterios establecidos se tomó con el recuento medio de los resultados como está establecido en la USP 38/NF 33.

Gráfica 1. Gráfica de Barras para el recuento medio de la Formulación 1 (Extracto de Nim 2%).



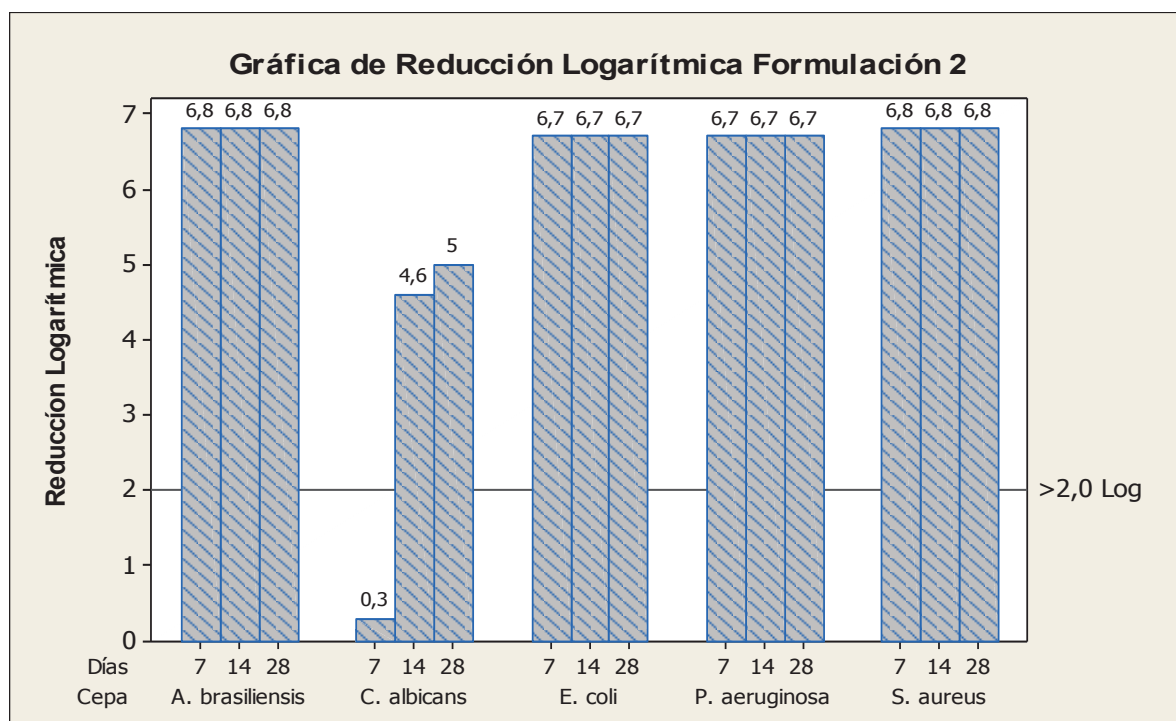
En el caso de E. coli el recuento en placa del día 14, que es el primer determinante en el criterio de aceptación, muestra que no cumplió con la especificación, solo se encontró una disminución de 1.4 en escala logarítmica, y a pesar que a los 28 días se observa una reducción logarítmica de 5.7, no se puede establecer un cumplimiento de la prueba, pues según lo descrito en la USP los dos parámetros deben ser cumplidos a totalidad.

Lo anterior corresponde al análisis y concepto de calidad que se obtiene de ver la tabla 14 del recuento medio para E. coli, pero al analizar las repeticiones realizadas por aparte, se puede apreciar que en la repetición 1 el preservante cumple con el criterio establecido pero no lo cumple en la repetición 2. En este caso el criterio de aceptación se toma a partir del recuento medio de ambas repeticiones, ya que es lo establecido por la USP, aunque este comportamiento se puede asociar con un posible error al realizar la técnica del recuento en placa; y se analizara más en profundidad con los resultados de la formulación 5.

Con respecto a *P. aeruginosa* en ambas repeticiones no se cumplió con los criterios de aceptación. En el recuento medio tuvo una disminución de tan solo 0.3 logaritmos en el día 14 y para el día 28 no hubo ningún aumento con respecto al día 14. Pero al no cumplir con el primer criterio se concluye que la eficacia de preservación del extracto de NIM frente a este microorganismo no es lo suficientemente buena para asegurar la integridad del producto.

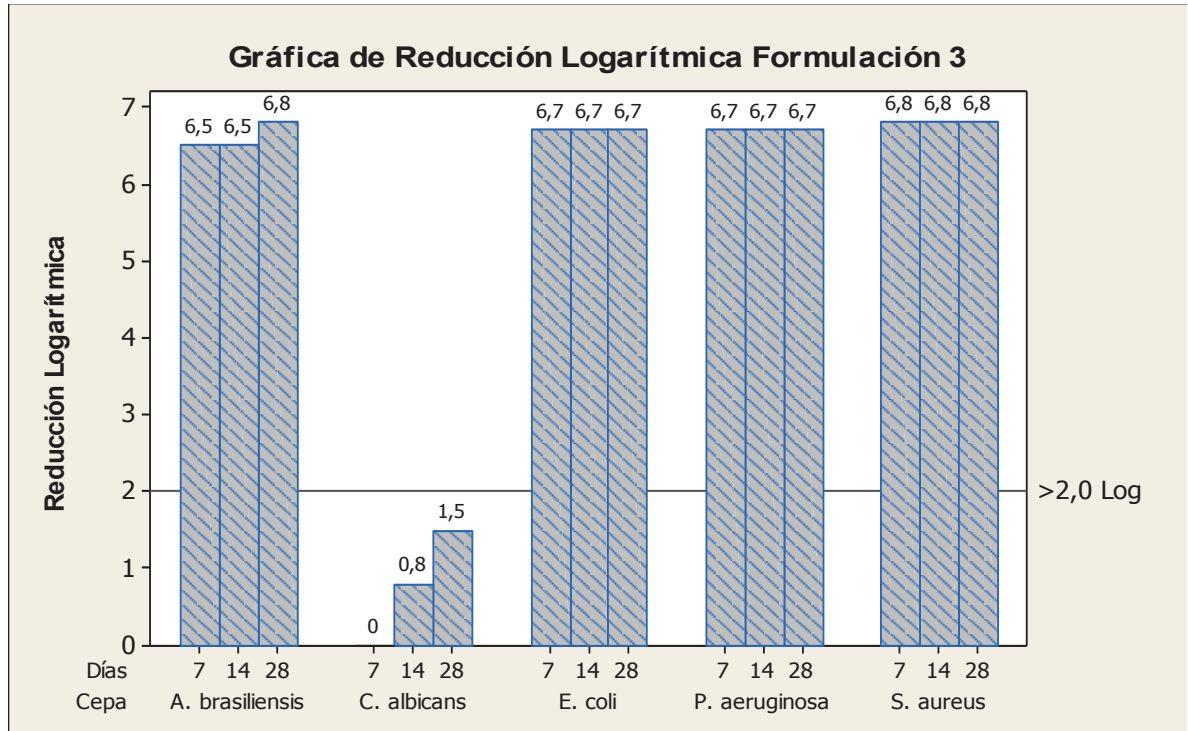
En relación con *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *S. aureus* se encontró que cumplían con las especificaciones establecidas para esta prueba y por lo que se puede decir que en el caso de estos microorganismos, el extracto de NIM a una concentración del 2% p/p funciona de forma efectiva contra hongos, levaduras y bacterias Gram positivas.

Gráfica 2. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulación 2 (Extracto de Magnolia 2%).



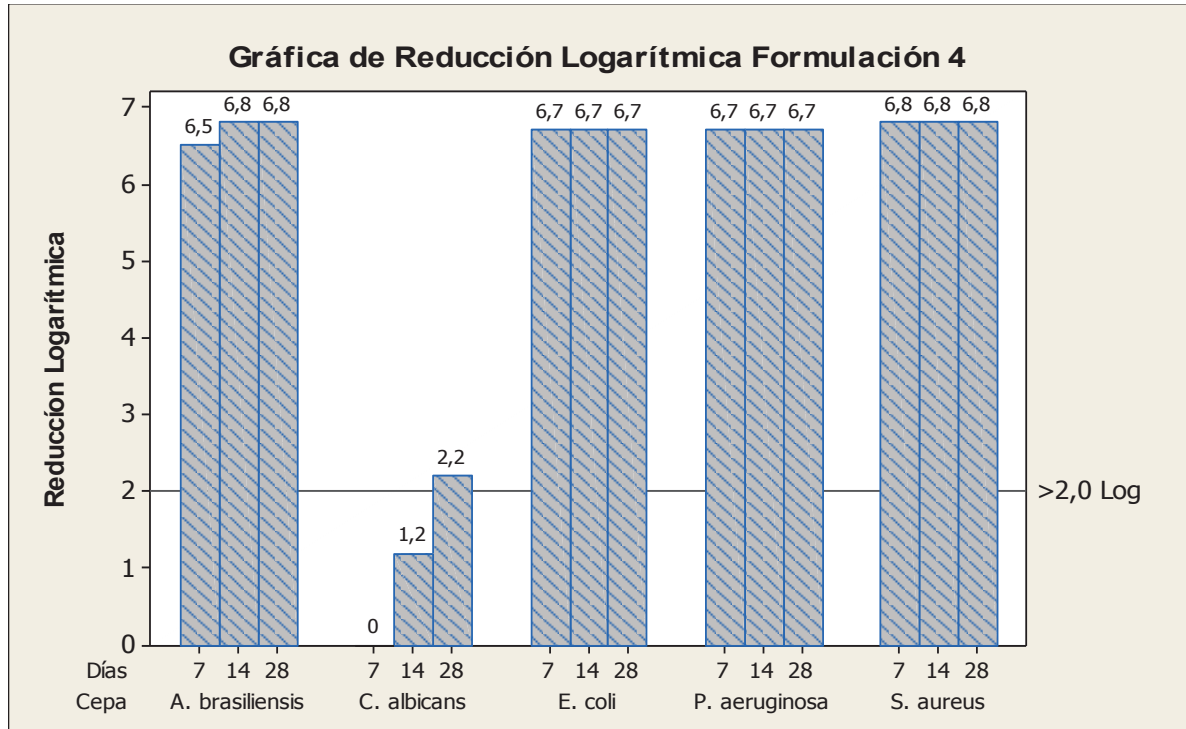
La formulación 2 mostro un optimo desempeño en la prueba de eficacia antimicrobiana, como se puede apreciar en la tabla 17 del recuento medio. En la mayoría de los microorganismos a excepción de *C. albicans*, el sistema preservante fue capaz de lograr una reducción logarítmica del 100%. En este caso el sistema preservante está compuesto por el extracto de magnolia al 2% p/p, y se puede concluir que este extracto a esa concentración es capaz de mantener la integridad de la formulación frente a un amplio espectro microbiano.

Gráfica 3. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulación 3 (Mezcla 1:1 del extracto de NIM:Magnolia).



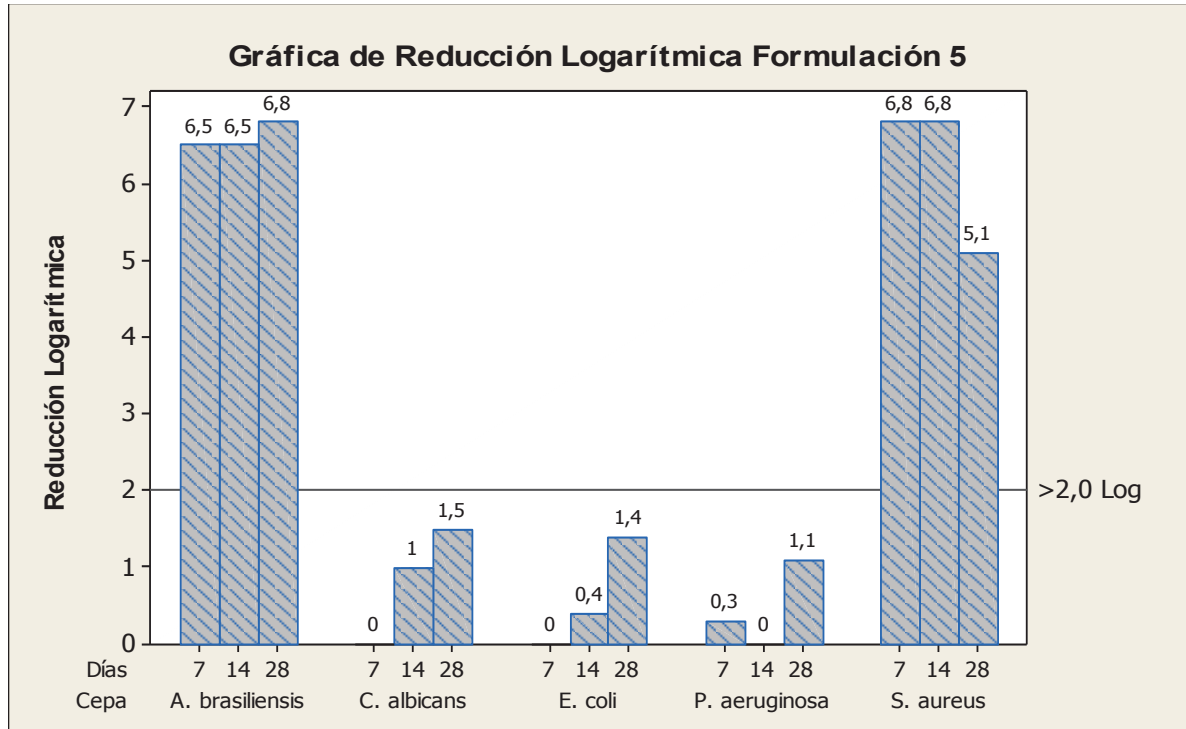
Al igual que en la formulación 2, esta presenta un recuento medio que muestra un desempeño óptimo del sistema preservante, logrando incluso una reducción logarítmica de 1,5 al día 28 para *C. albicans*, a pesar que la especificación para levaduras y hongos filamentosos solamente menciona que no se debe presentar ningún incremento con respecto a la concentración inicial. En consecuencia, se puede decir que la mezcla 1:1 del extracto de NIM y de Magnolia es una alternativa viable para lograr la preservación de una matriz cosmética O/W. Además, se aprecia como mejoran significativamente los resultados del extracto de NIM al estar en sinergia con el extracto de Magnolia.

Gráfica 4. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulación 4 (Mezcla 0,25:0,75 del extracto de NIM:Magnolia).



Considerando lo anterior, se puede observar el mismo comportamiento sinérgico que tiene el extracto de NIM y el extracto de Magnolia. Para el caso de la formulación 4, nuevamente se evidencia un sistema preservante que cumple con todos los criterios de aceptación de la prueba de eficacia antimicrobiana. Además, de demostrar que al utilizar el extracto de Magnolia se mejoran las reducciones logarítmicas de casi todos los microorganismos al 100%. Además, en el caso de *C. albicans*, al estar Magnolia en mayor proporción (75%) que NIM, se ve un mejor resultado, logrando una reducción de casi 1.0 logaritmo más que la formulación 3; donde los extractos se encontraban en igual proporción (1:1). Nuevamente, se puede concluir que este sistema preservante natural es capaz de mantener las condiciones microbiológicas de una matriz cosmética y remediar incluso una eventual contaminación accidental de la misma.

Gráfica 5. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulación 5 (Mezcla 0,75:0,25 del extracto de NIM:Magnolia).



Finalmente, en la formulación 5 se presentó un resultado muy similar al obtenido en la formulación 1 que tenía como sistema preservante al extracto de NIM. Los microorganismo *C. albicans* y *A. brasiliensis*, cumplen con la especificación pero las bacterias evaluadas en esta prueba no alcanzan los criterios para su aceptación.

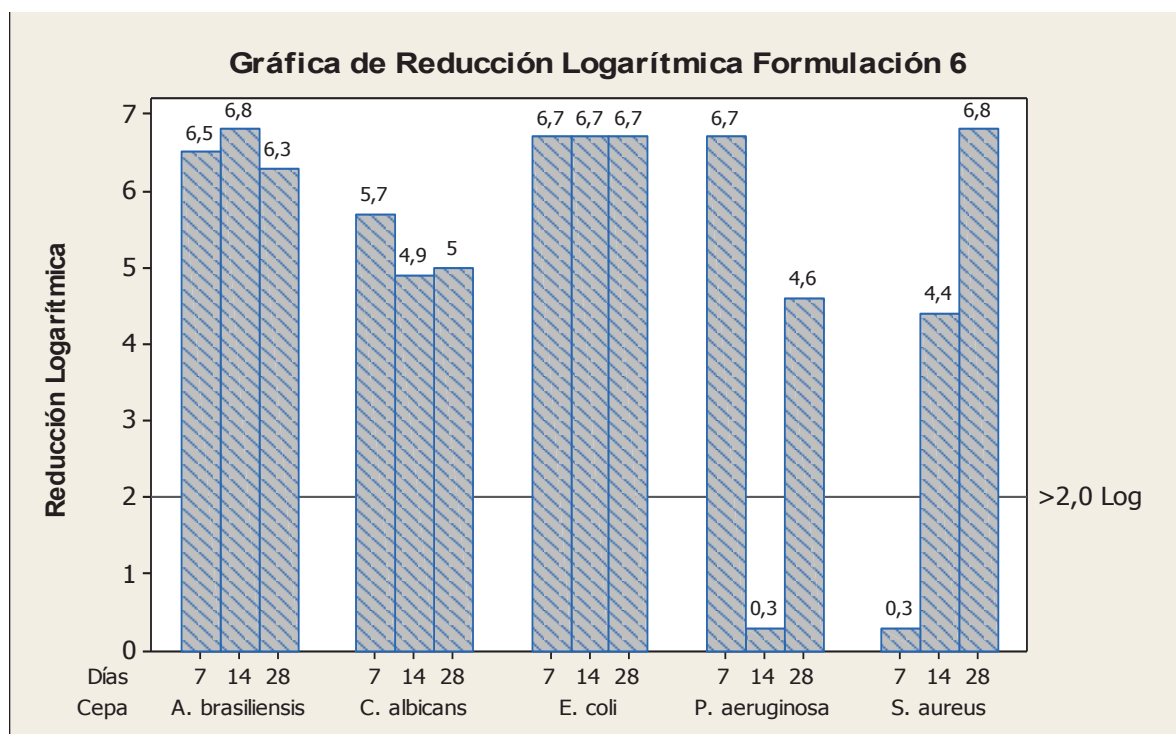
En cuanto a *E. coli* se tiene una pobre reducción logarítmica de tan solo 0.4 para el día 14 y de 1.4 para el día 28, en esta formulación el extracto de Nim se encontraba en una mayor proporción (75%) con respecto al extracto de Magnolia; lo que demuestra que el extracto de Nim por sí solo no es efectivo como agente preservante frente a un microorganismo como *E. coli* y por ende, esta mezcla tampoco lo es.

Se debe agregar que para *P. aeruginosa*, esta formulación presenta el mismo comportamiento que la formulación 1, no logro hacer una reducción logarítmica significativa para conseguir pasar la prueba evaluada, reafirmando la idea de la ineficiencia del extracto de Nim para preservar una matriz cosmética frente a este microorganismo. Es importante resaltar que en la repetición 1 posiblemente hubo un error al realizar la técnica para el recuento en placa del día 7, pues no mostro

ningún crecimiento, y dicha inhibición no es coherente a los demás resultados obtenidos (tanto para la repetición 2 y formulación).

Por otro lado, para *S. aureus* en la repetición 1 del día 28, se presentó un incremento de casi 2.0 logaritmos con respecto al día 14, generando que este no cumpliera con el segundo criterio de aceptación de la prueba de eficacia antimicrobiana. En este caso no hay razones de peso para asociar este hecho a una contaminación externa al momento de realizar el ensayo. Lo que hace pensar que posiblemente dicho crecimiento se presentó por una ineficiencia del sistema preservante. Aunque, no se tiene suficiente evidencia para concluir que este sistema preservante no sea efectivo contra *S. aureus*.

Gráfica 6. Grafica de Barras para el recuento medio de la Formulación 6 (Mezcla 3:1 metilparabeno y propilparabeno).



La formulación 6, corresponde a un sistema preservante convencional con metilparabeno y propilparabeno, que son los dos compuestos químicos a los cuales se les pretende buscar un reemplazo que preferiblemente sea de origen natural. Se hizo la evaluación con el fin de comparar los resultados obtenidos con los de más sistemas de preservación propuestos como alternativas naturales de reemplazo. El análisis de los resultados, muestra que en la repetición 1 del día 14 para la *P. aeruginosa* hubo un repentino crecimiento microbiano, esta proliferación se puede asociar a una posible contaminación en el momento en que se realizó la siembra para el recuento en placa. Este pudo ser un error en el procedimiento,

pero al no saber concretamente que fue lo que lo genero no hay razones de peso para poder afirmar que esta formulación fallo en la prueba de eficacia antimicrobiana para este microorganismo específico. Con respecto a los demás microorganismos, se evidencia claramente que este sistema preservante convencional es muy efectivo a una baja concentración (0,4% p/p) asegurando la integridad de una matriz cosmética con altas exigencias de conservación.

En definitiva, al momento de comparar todos los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que se observa una tendencia muy marcada y coherente en cada uno de los recuentos realizados, se puede afirmar que el sistema preservante que logro igualar a los compuestos químicos (parabenos) fue el del extracto de Magnolia 2% (formulación 2), con los resultados más contundentes, pues logro eliminar al 100% la mayoría de los microorganismos evaluados. La formulación 3 y 4, también se igualaron al sistema preservante convencional, pero es importante resaltar que este comportamiento se asocia principalmente a la presencia del extracto de Magnolia en concentraciones mayores o iguales al 50% del sistema preservante. Para la formulación 3, la mezcla se encontraba en igual proporción 1:1 y para la formulación 4 el extracto de magnolia predominaba estando en una mezcla 3:1 con el extracto de Nim.

La eficacia del extracto de Magnolia como agente preservante natural, puede ser debida a la acción antimicrobiana de los compuestos polifenolicos que contiene, , como lo son el Magnoliol y el Honokiol.. En un estudio realizado, se demostró que estos compuesto eliminan microorganismos como *S. aureus* (Gram positivo) y *P. aeruginosa* (Gram negativo), mediante la alteración de la permeabilidad celular, permitiendo la perdida de macromoléculas funcionales del interior de la célula. Cuando los compuestos polifenolicos pasan la membrana celular interaccionan con diferentes enzimas y proteínas de membrana, generando un flujo opuesto de protones. Además, se cree que estos metabolitos también interaccionan con los componentes fosfolipidicos aumentando la permeabilidad de la membrana, todo esto genera finalmente la lisis celular (Hu, Qiao, & Zhang, 2011). El mecanismo utilizado parece ser el mismo tanto para bacterias Gram positivas como para Gram negativas, por lo que presuntamente se espera que este extracto sea de amplio espectro, tal como se evidenció en las pruebas de eficacia antimicrobiana realizadas, donde demostró ser el más efectivo sistema preservante, con un desempeño que supero incluso al sistema preservante convencional de metil y propil parabeno.

Otro punto crítico para los sistemas de preservación basados en extractos naturales, que limita este tipo de investigaciones, son las propiedades organolépticas que aportan cada compuesto integrado en la formulación, pues pueden afectar características físicas del producto cosmético desarrollado, como son: apariencia, olor y color. Como se menciona antes en el marco teórico, la aceptación del consumidor es crucial y las propiedades organolépticas son un factor a tener en cuenta, pues los productos cosméticos pretenden aumentar o

realzar la belleza, y por ende estos deben poseer características agradables en cuanto a su aroma, color, textura y sensación al tacto.

Los extractos vegetales dependiendo de su naturaleza y método de extracción pueden aportar en mayor o menor medida a sus propiedades. El extracto de Nim presento un mayor impacto sobre las características del olor y el color de la emulsión cosmética. La formulación 1 que contenía 2% p/p del extracto de Nim presento un color beige, siendo este un cambio muy marcado puesto que la base de la formulación sin los extractos era completamente blanca (tabla 4). Otro factor que afecto el extracto de Nim de forma marcada fue el aroma, dándole un olor característico similar al extracto puro; dicho olor no es desagradable, pero lo ideal es no afectar de forma significativa estas características. En la formulación base propuesta no se tiene incorporado ninguna materia prima con el fin de aportar un aroma específico, pero de ser así este olor característico del extracto de Nim podría competir con la fragancia incorporada al producto, por lo que se requiere un trabajo adicional para poder enmascararla, lo cual no es una tarea fácil de lograr, y probablemente no se tenga éxito, afectando así la aceptación del producto por parte del consumidor. Este comportamiento se evidencia nuevamente en la formulación 5, la cual es una mezcla 3:1 del extracto de Nim y el extracto de Magnolia, y al estar en mayor proporción Nim se ven afectadas dichas propiedades.

Caso contrario se presenta con el extracto de Magnolia, el cual tiene un impacto mucho más moderado en cuanto al color, pues no presento ninguna variación con respecto al color de la base, la cual continúo siendo completamente blanca. Respecto al olor, el extracto de Magnolia apporto un ,muy ligero olor característico al extracto puro, que no se percibe con facilidad. Esto reafirma que el extracto de Magnolia presenta un mejor perfil de desempeño no solo en lo relativo a su eficacia como preservante por lo que promete ser una excelente elección de preservación natural en productos cosméticos líquidos y semisólidos.

El mayor reto al pretender usar extractos vegetales, es poder desarrollar mezclas que puedan ser utilizadas a bajas concentraciones, para evitar que tengan un impacto en de forma significativa en las características organolépticas, pero que garanticen la función que se les quiere dar; en este caso un efecto antimicrobiano que conserve la integridad y seguridad del producto durante su vida útil.

Llevar a cabo este proyecto de investigación, permitió evaluar un posible uso del extracto de Magnolia como sistema preservante, donde demostró tener una efectividad comparable con la de la mezcla de parabenos evaluada; pudiendo ser empleado como una alternativa de preservación natural para las formas cosméticas líquidas y semisólidas.

2.6. Conclusiones

- Se realizó con éxito una formulación base con las especificaciones planteadas, en donde se logró incorporar adecuadamente los 6 sistemas preservantes, obteniendo así una emulsión cosmética de aceite en agua (O/W) que cuenta con materias primas que aumentan la susceptibilidad del producto a la proliferación microbiana.
- El extracto de *Magnolia officinalis* a una concentración de 2% p/p demostró ser un sistema preservante natural eficaz contra los microorganismos evaluados en la prueba (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404). Este extracto promete ser un excelente preservante natural para productos cosméticos.
- El extracto de *Melia azadirachta* L. (Nim) a una concentración de 2% p/p actúa efectivamente eliminando hongos, levaduras y bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- La eficacia antimicrobiana del extracto de Nim a 2% p/p frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram negativa) y *Escherichia coli* ATCC 8739 (Enterobacteria), no fue lo suficientemente efectivo para preservar correctamente una emulsión O/W, teniendo en cuenta los criterios de aceptación establecidos por la USP 38/NF 33.
- Las mezclas de los extractos vegetales utilizados que contenían una proporción mayor o igual al 50% de *Magnolia officinalis*, incrementaron el espectro de acción efectiva que tenía el extracto de *Melia azadirachta* L. (Nim) por sí solo, generando que todas las cepas evaluadas presentaran sensibilidad frente a estos sistemas preservantes.

2.7. Recomendaciones

- Se debe realizar una mayor investigación sobre el extracto de corteza de *Magnolia officinalis*, haciendo variaciones en la concentración utilizada para preservar un sistema, pues es posible que a menores concentraciones ofrezca la misma eficacia antimicrobiana.
- Se recomienda la elaboración de las formulaciones base en un área con condiciones ambientales controladas, para obtener un producto de mayor calidad microbiológica al inicio de la investigación.
- Se aconseja desafiar aun más el extracto de corteza de *Magnolia officinalis*, para esto se pueden utilizar otras cepas microbianas establecidas por la USP.
- Se recomienda buscar otro extracto vegetal eficaz contra hongos, para reemplazar el extracto *Melia azadirachta* (Nim), pues este extracto a concentraciones mas altas tendra un mayor impacto en las características organolepticas. Procurando encontrar posibles combinaciones con el extracto de corteza de *Magnolia officinalis*, que demuestre ser efectivas.

3. BIBLIOGRAFÍA

Portafolio. (19 de Marzo de 2015). *Mary Kay contempla producción local*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de Portafolio: <http://www.portafolio.co/negocios/mary-kay-contempla-produccion-local>

Castro, J. C. (08 de Mayo de 2015). *Industria de la belleza vislumbra un buen futuro en Colombia*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de Dinero: <http://www.dinero.com/edicion-impresa/negocios/articulo/perspectiva-industria-belleza-colombia-2015/211931>

ANDI. (2013). Informe de sostenibilidad. *Industria de cosmética y aseo* , 21-23, 53-57.

Leranoz, S. (2012). Conservantes cosméticos. *Dermofarmacia* , 21, 74-78.

La Comisión Europea. (18 de Septiembre de 2014). Reglamento (UE) N° 1004.

Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J., & Popo, G. S. (2004). Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. *Journal of Applied Toxicology* , 24, 5-13.

FDA. (31 de Octubre de 2007). *Parabens*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de <http://www.fda.gov/cosmetics/productsingredients/ingredients/ucm128042.htm>

Provital Group. (03 de Noviembre de 2011). Nim. 1-7.

Sharma, D., & Shiva, Y. P. (2013). Preliminary and Pharmacological Profile of Melia Azedarach L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* , 3 (12), 133-138.

Liao, K., Sun, L., & Wang, D. (2015). Effects of Magnolol and Honokiol on Adhesion, Yeast-Hyphal Transition, and Formation of Biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One* , X (2), 1-20.

Chan, L. W., Cheach, E., Heng, P., Saw, C., & Weng, W. (2008). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Cortex Magnoliae officinalis and Some Other Medicinal Plants Commonly Used in South-East Asia. *Chinese Medicine* , III (15), 1-10.

Salazar, O., Alberto, R., Sánchez, F. O., Arteaga, M. A., & Londoño, G. (2015). Antifungal Activity of Neem Extracts Against Dermatophytes. *Acta Biológica Colombiana* , XX (3), 201-207.

USP38/NF33. (2015). <51> Prueba de eficacia antimicrobiana. En *USP38/NF33* (págs. 109-112). Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.

Simmons, J. V. (2000). Actividad superficial, emulsiones y detergencia . En *Cosméticos: Formulación, preparaciones y aplicación* (págs. 108-127). Madrid: A. Madrid Vicente.

Gennaro, A. R. (2003). Soluciones, emulsiones, suspensiones y extractos . En *Remington Farmacia* (págs. 857-864). Buenos Aires: Médica Panamericana.

ICH. (6 de Febrero de 2003). Stability testing of new drug substances and products Q1A. ICH.

USP38/NF33. (2015). <61> Examen microbiológico de productos no estériles. En *USP 38/NF 33* (págs. 115-122). Rockville: The united states pharmacopeial convention.

USP38/NF33. (2015). <1111> Examen microbiológico de productos no esteriles. En *USP38/NF33* (pág. 1284). Rockville: The united states pharmacopeial convention.

USP38/NF33. (2015). <1112> Determinación de actividad de agua. En *USP38/NF33* (págs. 1285-1287). Rockville: The united states pharmacopeial convention.

Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by "HLB". *Journal of the society of cosmetic chemists* , 311-326.

Rieger, M., & Rhein, L. D. (1997). *Surfactants in Cosmetics*. New York: Marcel Dekker.

Hu, Y., Qiao, J., & Zhang, X. a. (2011). Antimicrobial effect of Magnolia officinalis extract against Staphylococcus aureus. *Society of Chemical Industry* , 91, 1050-1056.

4. ANEXOS

ANEXO 1. Tablas de resultados de los recuentos en placa.

Tabla 12. Resultados del recuento en placa de la Formulación 1, repetición 1.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ mL	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	2.4 $\times 10^6$	6.4	0.4	3.7 $\times 10^5$	5.6	1.2
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	1	0.0	6.8	1	0.0	6.8	2	0.3	6.5
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	7.1 $\times 10^5$	5.9	0.8	6.2 $\times 10^5$	5.8	0.9
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	8	0.9	5.9	228	2.4	4.4	30	1.5	5.3

Tabla 13. Resultados del recuento en placa de la Formulación 1, repetición 2.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	5.3 $\times 10^5$	5.7	1.1	7.3 $\times 10^4$	4.9	1.9
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	7	0.8	5.9	2	0.3	6.5	2	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	5.0 $\times 10^6$	6.7	0.0	4.3 $\times 10^5$	5.6	1.1	2	0.3	6.4
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	4.3 $\times 10^6$	6.6	0.0	3.5 $\times 10^5$	5.5	1.1
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	5.8 $\times 10^6$	6.8	0.0	1.1 $\times 10^4$	4.1	2.7	120	2.1	4.7

Tabla 14. Recuento medio de los resultados de la Formulación 1.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 x10 ⁶	6.8	6.0 x10 ⁶	6.8	0.0	1.5 x10 ⁶	6.2	0.6	2.2 x10 ⁵	5.3	1.4
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 x10 ⁶	6.8	4	0.6	6.2	2	0.3	6.5	2	0.3	6.5
<i>E. coli</i>	8739	5.0 x10 ⁶	6.7	2.3 x10 ⁶	6.4	0.3	2.1 x10 ⁵	5.3	1.4	1	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 x10 ⁶	6.7	4.5 x10 ⁶	6.7	0.0	2.5 x10 ⁶	6.4	0.3	4.8 x10 ⁵	5.7	1.0
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 x10 ⁶	6.8	2.9 x10 ⁶	6.5	0.3	5.6 x10 ³	3.7	3.0	75	1.9	4.9

Tabla 15. Resultados del recuento en placa de la Formulación 2, repetición 1.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 x10 ⁶	6.8	6.0 x10 ⁶	6.8	0.0	10	1.0	5.8	130	2.1	4.7
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 x10 ⁶	6.8	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 x10 ⁶	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 x10 ⁶	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 x10 ⁶	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 16. Resultados del recuento en placa de la Formulación 2, repetición 2.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 x10 ⁶	6.8	0	0.0	6.8	292	2.5	4.3	0	0.0	6.8
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 x10 ⁶	6.8	1	0.0	6.8	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8

<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 17. Recuento medio de los resultados de la Formulación 2.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	3.0 $\times 10^6$	6.5	0.3	151	2.2	4.6	65	1.8	5.0
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	1	0.0	6.8	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 18. Resultados del recuento en placa de la Formulación 3, repetición 1.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	9.8 $\times 10^5$	6.0	0.8	2.6 $\times 10^5$	5.4	1.4
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	1	0.0	6.8	2	0.3	6.5	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	1	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 19. Resultados del recuento en placa de la Formulación 3, repetición 2.

Microorg anismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC /g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	9.5 $\times 10^5$	6.0	0.8	1.8 $\times 10^5$	5.3	1.5
<i>A. brasiliensi s</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginos a</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 20. Recuento medio del los resultados de la Formulación 3.

Microorg anismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC /g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	9.6 $\times 10^5$	6.0	0.8	2.2 $\times 10^5$	5.3	1.5
<i>A. brasiliensi s</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	2	0.3	6.5	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginos a</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	1	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 21. Resultados del recuento en placa de la Formulación 4, repetición 1.

Microorg anismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC /g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	3.8 $\times 10^5$	5.6	1.2	4.2 $\times 10^4$	4.6	2.2
<i>A. brasiliensi s</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8

<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 22. Resultados del recuento en placa de la Formulación 4, repetición 2.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATC C	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	4.8 $\times 10^5$	5.7	1.1	3.6 $\times 10^4$	4.6	2.2
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 23. Recuento medio de los resultados de la Formulación 4.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	4.3 $\times 10^5$	5.6	1.2	3.9 $\times 10^4$	4.6	2.2
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 24. Resultados del recuento en placa de la Formulación 5, repetición 1.

Microorg anismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC /g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	4.0 $\times 10^6$	6.6	0.2	1.5 $\times 10^5$	5.2	1.6
<i>A. brasiliensi s</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	2	0.3	6.5	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	5.0 $\times 10^6$	6.7	0.0	1.3 $\times 10^6$	6.1	0.6	1.5 $\times 10^5$	5.2	1.5
<i>P. aeruginos a</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	2.8 $\times 10^6$	5.4	1.2
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	85	1.9	4.8

Tabla 25. Resultados del recuento en placa de la Formulación 5, repetición 2.

Microorg anismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC /g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	5.5 $\times 10^5$	5.7	1.0	1.8 $\times 10^5$	5.3	1.5
<i>A. brasiliensi s</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	1	0.0	6.8	1	0.0	6.8	0	0.0	6.8
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	5.0 $\times 10^6$	6.7	0.0	3.0 $\times 10^6$	6.5	0.2	2.7 $\times 10^5$	5.4	1.3
<i>P. aeruginos a</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	4.8 $\times 10^5$	5.7	1.0
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 26. Recuento medio del los resultados de la Formulación 5.

Microorg anismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/ g	Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC/ g	Log	Redu c Log	UFC /g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	6.0 $\times 10^6$	6.8	0.0	5.5 $\times 10^5$	5.7	1.0	1.8 $\times 10^5$	5.3	1.5
<i>A. brasiliensi s</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	2	0.3	6.5	0	0.0	6.8

<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	5.0 $\times 10^6$	6.7	0.0	2.1 $\times 10^6$	6.3	0.4	2.1 $\times 10^5$	5.3	1.4
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	2.3 $\times 10^6$	6.4	0.3	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	3.8 $\times 10^5$	5.6	1.1
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	43	1.6	5.1

Tabla 27. Resultados del recuento en placa de la Formulación 6, repetición 1.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	10	1.0	5.8	134	2.1	4.7	67	1.8	5.0
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	2	0.3	6.5	1	0.0	6.8	3	0.5	6.3
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	4.5 $\times 10^6$	6.7	0.0	240	2.4	4.3
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	5.8 $\times 10^6$	6.8	0.0	450	2.7	4.1	0	0.0	6.8

Tabla 28. Resultados del recuento en placa de la Formulación 6, repetición 2.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 $\times 10^6$	6.8	16	1.2	5.6	3	0.5	6.3	43	1.6	5.1
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 $\times 10^6$	6.8	1	0.0	6.8	1	0.0	6.8	3	0.5	6.3
<i>E. coli</i>	8739	5.0 $\times 10^6$	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 $\times 10^6$	6.7	1	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 $\times 10^6$	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8	0	0.0	6.8

Tabla 29. Recuento medio del los resultados de la Formulación 6.

Microorganismos	Inicial			7 días			14 días			28 días		
	ATCC	UFC/g	Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log	UFC/g	Log	Redu c Log
<i>C. albicans</i>	10231	6.0 x10 ⁶	6.8	13	1.1	5.7	69	1.8	4.9	55	1.7	5.0
<i>A. brasiliensis</i>	16404	6.1 x10 ⁶	6.8	2	0.3	6.5	1	0.0	6.8	3	0.5	6.3
<i>E. coli</i>	8739	5.0 x10 ⁶	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7	0	0.0	6.7
<i>P. aeruginosa</i>	9027	4.5 x10 ⁶	6.7	1	0.0	6.7	2.3 x10 ⁶	6.4	0.3	120	2.1	4.6
<i>S. aureus</i>	6538	5.8 x10 ⁶	6.8	2.9 x10 ⁶	6.5	0.3	225	2.4	4.4	0	0.0	6.8

ANEXO 2. Certificados de análisis y documentos correspondientes de las materias primas usadas.



CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT PRODEW 500^g
 LOT N° 1507007 6
 MANUFACTURING DATE (DD.MM.YYYY) 20.07.2015
 VALIDITY 3 YEARS AFTER MANUFACTURING DATE

ITEM	LIMIT	RESULT
Description	Colorless to pale yellow liquid, a slightly characteristic odor	Passed test
Identification - Amino Acids	Passed Test	Passed test
Identification - Lactate	Passed Test	Passed test
pH	4.8 - 6.0	5.7
Heavy Metals (Pb)	NMT 20ppm	NMT 20ppm
Arsenic (As ₂ O ₃)	NMT 20ppm	NMT 20ppm
Solid Content	47.0 - 49.0%	48.8
Nitrogen Content	5.8 - 6.2%	5.7
Total Viable Counts	NMT 100cfu/ml	NMT 100cfu/ml


 DIGITAL SIGNATURE
 APPROVED BY:
 EVERTON SOARES MANTOVANI
 QUALITY ASSURANCE
 27.07.2015 16:38:51

AJINOMOTO DO BRASIL IND. E COM. DE ALIMENTOS LTDA
 Rod. Anhanguera Km 131
 13480-970 - Limeira - SP - Brazil
 Fone: + 55-11-5080-6700

BOLETIN DE ANÁLISIS
ANALYSIS REPORT

PROVITAL GROUP

For a beautiful life, from nature to the lab.

PR-0215-RS-01-FOR-01 Rev.01

PRODUCTO: NIM EXTRACTO H.G.
PRODUCT: NEEEM EXTRACT H.G.

CODIGO: 4397000G
CODE:

LOTE: 1302247
BATCH:

FECHA PRODUCCIÓN: 18/Nov/2013
PRODUCTION DATE:

FECHA REANÁLISIS: 18/Nov/2016
RETEST DATE:

ENSAYO ASSAY	ESPECIFICACIÓN SPECIFICATION	RESULTADO RESULT
ASPECTO ASPECT E-001000	LIQUIDO TRANSPARENTE - LIQ.LIGERAMENTE TURBIO TRANSPARENT LIQUID - SLIGHTLY TURBID LIQUID	CORRECTO CORRECT
COLOR COLOUR E-002000	PARDO OSCURO - PARDO OSCURO VERDOSO DARK BROWN - GREENISH DARK BROWN	CORRECTO CORRECT
DENSIDAD A 20°C DENSITY 20°C E-003000	1,040 - 1,060	CORRECTO CORRECT
pH pH E-004000	5,0 - 6,0	CORRECTO CORRECT
RESIDUO SECO (6h) DRY RESIDUE (6h) E-005000	1,5 - 3,5	2,8%
AEROBIOS TOTALES AEROBIC BACTERIA E-006000	MAX. 100	CORRECTO SIN LG CORRECT
HONGOS Y LEVADURAS YEASTS AND MOULDS E-007000	MAX. 10	CORRECTO SIN LG CORRECT
PATOGENOS PATHOGENIC GERMS E-008000	AUSENCIA EN 1 g EXEMPT IN 1 g	CORRECTO CORRECT

El color y la apariencia de los extractos vegetales puede evolucionar tras la producción, sin afectar a las propiedades del producto. En caso de turbidez, líase el color usando el código de referencia. The color and appearance of the extracts may evolve after production, without affecting the properties of the product. In case of turbidity, filter colour using the reference code.

El resultado es válido electrónicamente. Válido sin firma. Electronic data sheet. Valid without signature.

El resultado es válido para los códigos de envasado en los que coinciden los 5 primeros dígitos del código de referencia. The result is valid for the packaging codes in which the first 5 digits of the reference code coincide.

SAFETY DATA SHEET**CRODA****BRIJ™ S721-SO-(AP)**

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

SECTION 1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product name : BRIJ™ S721-SO-(AP)
Product code : ET47451
Chemical Name : Fatty alcohol ethoxylate

Manufacturer or supplier's details

Company : Croda Inc
Address : 300 A Columbus Circle
Edison, NJ 08837-3907
Telephone : (732) 417-0800
Telefax : (732) 417-0804

Emergency telephone : USA: 24 Hour Emergency Response Information CHEMTREC
toll free: 1-800-424-9300; direct/international: 1-703-527-3887.
CANADA: Quantum Murray (spill response)1-877-378-7745.
CANADA: CANUTEC(collect) 1-613-996-6666. EUROPE: 00
32 3575 5555. ASIA PACIFIC - excl. China: +65 6542-9595.
CHINA: +86 21 2315 9344. AUSTRALIA: +61 2 9616 5890.
SOUTH AFRICA: +32 3 575 55 55. LATAM: 0800 720 8000.
1-613-996-6666. INDIA: +91 22 30948467/8. JAPAN: +65
6542 9595 (24時間 日本語対応無料通話, シンガポール)

Recommended use of the chemical and restrictions on use

Recommended use : Raw material
Prepared by : Product Safety and Regulatory Affairs Department
(732) 417-0800

SECTION 2. HAZARDS IDENTIFICATION**GHS Classification**

Not a hazardous substance or mixture.

GHS Label element

Not a hazardous substance or mixture.

Other hazards which do not result in classification

May irritate eyes.
May irritate skin.
Ingestion may cause irritation to mucous membranes.
May cause irritation of respiratory tract.

SECTION 3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Substance / Mixture : Pure substance

Hazardous ingredients

1 / 8

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

No hazardous ingredients

SECTION 4. FIRST AID MEASURES

- If inhaled : If breathed in, move person into fresh air.
If symptoms persist, call a physician.
- In case of skin contact : Take off contaminated clothing and shoes immediately.
Wash off with soap and plenty of water.
If symptoms persist, call a physician.
- In case of eye contact : In case of contact, immediately flush eyes with plenty of water
for at least 15 minutes.
- If swallowed : If large quantities of this material are swallowed, call a
physician immediately.

SECTION 5. FIRE-FIGHTING MEASURES

Flammable properties

- Flash point : > 110 °C (> 230 °F)
Method: closed cup
- Suitable extinguishing media : Use extinguishing measures that are appropriate to local
circumstances and the surrounding environment.
Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon
dioxide.
- Unsuitable extinguishing media : High volume water jet
- Specific hazards during fire
fighting : Do not use a solid water stream as it may scatter and spread fire.
Do not allow run-off from fire fighting to enter drains or water
courses.
- Special protective equipment for
fire-fighters : In the event of fire, wear self-contained breathing apparatus.

SECTION 6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

- Personal precautions, protective
equipment and emergency
procedures : Use personal protective equipment.
Ensure adequate ventilation.
- Methods and materials for
containment and cleaning up : Sweep up and shovel into suitable containers for disposal.
Keep in suitable, closed containers for disposal.

SECTION 7. HANDLING AND STORAGE

- Advice on safe handling : Handle in accordance with good industrial hygiene and safety
practice.

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

Avoid contact with skin and eyes.

Conditions for safe storage : Store in original container.
Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place.

Materials to avoid : No special restrictions on storage with other products.

SECTION 8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

Ingredients with workplace control parameters

Contains no substances with occupational exposure limit values.

Personal protective equipment

Respiratory protection : No personal respiratory protective equipment normally required.

Hand protection
Remarks : For prolonged or repeated contact use protective gloves.

Eye protection : Safety glasses

Skin and body protection : impervious clothing

SECTION 9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Appearance : solid

Color : off-white

Odor : characteristic

Odor Threshold : no data available

pH : 5 - 8, 10% In water

Melting point : no data available

pour point : approximately 45 °C (113 °F)

Boiling point : no data available

Flash point : > 110 °C (> 230 °F)Method: closed cup

Vapor pressure : no data available

Relative density : approximately 1.0

Density : no data available

Solubility(ies)

Water solubility : no data available

Solubility in other solvents : insoluble
Solvent: mineral oil

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

insoluble
Solvent: propylene glycol

insoluble
Solvent: Isopropanol

Partition coefficient: n-octanol/water : no data available

Thermal decomposition : no data available

SECTION 10. STABILITY AND REACTIVITY

Chemical stability : Stable under normal conditions.

Possibility of hazardous reactions : No dangerous reaction known under conditions of normal use.

Conditions to avoid : None known.

Incompatible materials : Strong oxidizing agents

Hazardous decomposition products : In case of fire hazardous decomposition products may be produced such as:
Carbon oxides

SECTION 11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Acute toxicity

Product:

Acute oral toxicity : LD50 rat: > 5,000 mg/kg
Remarks: Low acute toxicity.

Skin corrosion/irritation

Product:

Species: rabbit
Exposure time: 3 d
Method: Draize Test
Remarks: No skin irritation

Serious eye damage/eye irritation

Product:

Species: rabbit
Exposure time: 3 d
Method: Draize Test
Remarks: slight irritation

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

Respiratory or skin sensitization

Product:

Remarks: no data available

Germ cell mutagenicity

Product:

Genotoxicity in vitro : Remarks: no data available

Carcinogenicity

Product:

Remarks: This information is not available.

Reproductive toxicity

Product:

Effects on fertility : Remarks: This information is not available.

STOT-single exposure

Product:

Assessment: no data available

STOT-repeated exposure

Product:

Assessment: no data available

Aspiration toxicity

Product:

No aspiration toxicity classification

Further information

Product:

Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

SECTION 12. ECOLOGICAL INFORMATION

Ecotoxicity

Product:

Toxicity to fish : LC50 (Oncorhynchus mykiss (rainbow trout)): 8.4 mg/l
Exposure time: 96 h

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

Test Method: static test

Persistence and degradability

Product:

Biodegradability

: Test Type: Modified MITI
Concentration: %
Biodegradation: 72 %
Remarks: (OECD 301C)

Test Type: Biological Oxygen Demand (BOD 25 DAY/COD)
Concentration: %
Biodegradation: 30 %
Remarks: Modified MITI, (OECD 301C)

Chemical Oxygen Demand (COD)

: 2,130 mg/g

Bioaccumulative potential

Product:

Bioaccumulation

: Remarks: no data available

Partition coefficient: n-octanol/water

: Remarks: no data available

Mobility in soil

Product:

Stability in soil

: Remarks: no data available

Other adverse effects

Product:

Results of PBT and vPvB assessment

: no data available

SECTION 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Disposal methods

Waste from residues

: Dispose of in accordance with local regulations.

Contaminated packaging

: Empty remaining contents.
Empty containers should be taken to an approved waste handling site for recycling or disposal.

SECTION 14. TRANSPORT INFORMATION

International regulation

Transport in bulk according to Annex II of MARPOL 73/78 and the IBC Code

Not applicable for product as supplied.

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

Print Date 11/29/2014

Domestic regulation

Special precautions for user

Remarks : Not regulated for transport in accordance with DOT, TDG, IMDG, and IATA regulations.

SECTION 15. REGULATORY INFORMATION

SARA 311/312 Hazards : No SARA Hazards

SARA 302 : SARA 302: No chemicals in this material are subject to the reporting requirements of SARA Title III, Section 302.

SARA 313 : SARA 313: This material does not contain any chemical components with known CAS numbers that exceed the threshold (De Minimis) reporting levels established by SARA Title III, Section 313.

US State Regulations

Pennsylvania Right To Know

Ethoxylated Fatty Alcohol 9005-00-9 - 100 %

New Jersey Right To Know

Ethoxylated Fatty Alcohol 9005-00-9 - 100 %

California Prop 65

WARNING! This product contains a chemical known in the State of California to cause cancer.

Formaldehyde 50-00-0
Acetaldehyde 75-07-0
ethylene oxide 75-21-8
1,4-dioxane 123-91-1

WARNING: This product contains a chemical known in the State of California to cause birth defects or other reproductive harm.

ethylene oxide 75-21-8

The ingredients of this product are reported in the following inventories:

TSCA All chemical substances in this product are listed on the TSCA Inventory.

REACH On the inventory, or in compliance with the inventory

DSL All components of this product are on the Canadian DSL.

AICS On the inventory, or in compliance with the inventory

ENCS On the inventory, or in compliance with the inventory

ISHL On the inventory, or in compliance with the inventory

KECI On the inventory, or in compliance with the inventory

PICCS On the inventory, or in compliance with the inventory

IECSC On the inventory, or in compliance with the inventory

Inventories

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S721-SO-(AP)

Version 1.0

Revision Date 09/25/2014

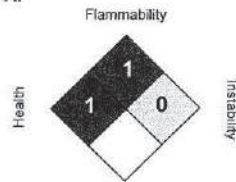
Print Date 11/29/2014

AICS (Australia), DSL (Canada), IECSC (China), ENCS (Japan), ISHL (Japan), KECI (Korea), NZIoC (New Zealand), PICCS (Philippines), TSCA (USA)

SECTION 16. OTHER INFORMATION

Further information

NFPA:



Special hazard.

HMIS II:

HEALTH	1
FLAMMABILITY	1
Reactivity	0

0 = not significant, 1 = Slight,
2 = Moderate, 3 = High
4 = Extreme, * = Chronic

The information provided in this Material Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text.

CRODA

Calle 90 N. 19-41 ofc 601
Bogotá, Colombia
Teléfono 321 4230

Bogotá, 18 de febrero de 2016
CM-142-2016

Señores
TECNOQUIMICAS
Sr. Carlos Alberto Ramirez Giraldo
Calle 23 No 7 – 34
Cali

REF: ENVIO MUESTRAS SIN VALOR COMERCIAL

Apreciados señores:

Con la presente estamos enviando la siguiente muestra para su evaluación y desarrollo.

PRODUCTO	GRAMOS	LOTE
BRIJ S2-SO-(AP)	200	1001127
BRIJ S721-SO-(AP)	200	897915

Cualquier inquietud o solicitud adicional por favor no duden en contactarnos nuevamente.

Cordialmente,

LINA RUBIANO
Croda Colombia

CRODA

Certificate prepared at

Croda Inc.
315 Cherry Lane
New Castle DE 19720
USA

Certificate of Analysis

A quality management system registered to the international standard ISO 9001 was used to manufacture and test this material.

Customer details

Customer Ref.
Inspection Lot 040000558587
C of A Printed. 18.02.2016
Croda Order No.
Croda Del. No.
Quantity. 0.000

Batch Details

Product Name: BRIJ S721-SO-(AP)
Product Code: ET47451/0180/4S77
Batch No: 0000897915

Date of test: 28.07.2014
Date of manufacture: 26.07.2014
Retest date: 25.07.2016

Specification: REVISED 04-JUN-2013

Quality Control Results

Analytical Test Method No.	Characteristic	Specification Limit		Value	Unit	Status
		Lower	Upper			
	Addendum 00	Pass or Fail		Pass	-	P
EU0100A0	ACID VALUE	0.0	2.0	0.3	mg KOH/g	P
AU3200A0	COLOR (1963 GARDNER)	0.00	1.00	0.20	Gardner	P
EU050400	HYDROXYL VALUE	44	61	50	mg KOH/g	P
FU2904H0	WATER CONTENT	0.0	2.0	0.4	%	P
LU6101A0	1,4-DIOXANE	0	5	0	ppm	P
LU610300	RESIDUAL EO	0	1	0	ppm	P

Batch Status: Pass

The quality tests on this batch are reported above. The tests carried out are those necessary to demonstrate compliance with our product specification and are not intended to guarantee the product as suitable for any application beyond those contained in the specification. We recommend you perform your own quality and or identification checks on receipt

The name printed at the end of this document is an electronic signature.

CRODA

Certificate prepared at

Croda Inc.
315 Cherry Lane
New Castle DE 19720
USA

Certificate of Analysis

A quality management system registered to the international standard
ISO 9001 was used to manufacture and test this material.

Customer details

Customer Ref.	040000558587
Inspection Lot	
C of A Printed.	18.02.2016
Croda Order No.	
Croda Del. No.	
Quantity.	0.000

Confirmed by

David Niehaus QA Manager

CRODA

Certificate prepared at

Croda Inc.
315 Cherry Lane
New Castle DE 19720
USA

Certificate of Analysis

A quality management system registered to the international standard
ISO 9001 was used to manufacture and test this material.

Customer details

Croda Sucursal Colombia
Lina Rubiano
Calle 90 N. 19-41 Ofc 601
Calle 90 N. 19-41 Ofc 601
Edificio Quantum
11 Bogotá
Colombia

Customer Ref. CROD5425-B9VP2M1J6
Inspection Lot 090000211373
C of A Printed. 02/05/2016
Croda Order No. 2122883
Croda Del. No. 82343835
Quantity. 1.000G40

Batch Details

Product Name: BRIJ S2-SO-(AP)
Product Code: ET47446/SAMP
Batch No: 0001001127

Date of test: 02.06.2015
Date of manufacture: 18.05.2015
Retest date: 17.05.2017

Specification: REVISED 08-JUN-2011

Quality Control Results

Analytical Test Method No.	Characteristic	Specification Limit		Value	Unit	Status
		Lower	Upper			
	Addendum 00	Pass or Fail		Pass	-	P
AU020000	APPEARANCE (CLARITY) (60°C)	CLEAR		Pass	-	P
AU020000	APPEARANCE (FORM) 60°C	LIQUID		Pass	-	P
EU010000	ACID VALUE	0.00	1.00	0.32	mg KOH/g	P
AU320200	COLOR (APHA)	0	50	4	APHA	P
EU050400	HYDROXYL VALUE	150	170	159	mg KOH/g	P
EU270300	PEROXIDE VALUE	0.0	5.0	0.0	meqO2/kg	P
EU0402A0	SAPONIFICATION VALUE	0.0	2.0	0.1	mg KOH/g	P
FU2904H0	WATER CONTENT	0.00	1.00	0.14	%	P
FU070800	MELTING POINT (FJ)	44	48	47	°C	P
LU6101A0	ETHYLENE OXIDE	0	1	0	ppm	P
LU6101A0	1,4-DIOXANE	0	5	0	ppm	P

If you received only a sample of this product, please request updated specification before placing the first purchase order.

Batch Status: Pass

The quality tests on this batch are reported above. The tests carried out are those necessary to demonstrate compliance with our product specification and are not intended to guarantee the product as suitable for any application

CRODA

Certificate prepared at

Croda Inc.
315 Cherry Lane
New Castle DE 19720
USA

Certificate of Analysis

A quality management system registered to the international standard
ISO 9001 was used to manufacture and test this material.

Customer details

Croda Sucursal Colombia
Lina Rubiano
Calle 90 N. 19-41 Ofc 601
Calle 90 N. 19-41 Ofc 601
Edificio Quantum
11 Bogotá
Colombia

Customer Ref. CROD5425-B9VP2M1J6
Inspection Lot 090000211373
C of A Printed. 02/05/2016
Croda Order No. 2122883
Croda Del. No. 82343835
Quantity. 1.000G40

beyond those contained in the specification. We recommend you perform your own quality and or identification checks on receipt

The name printed at the end of this document is an electronic signature.

Confirmed by

Shirley Dooley Quality Lab Administrator

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S2-SO-(AP)

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

SECTION 1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product name : BRIJ™ S2-SO-(AP)
Registered Product Identity : BRIJ S2
Product code : ET47446
INCI : Steareth-2
Chemical Name : Fatty alcohol ethoxylate

Manufacturer or supplier's details

Company : Croda Inc
Address : 300 A Columbus Circle
Edison, NJ 08837-3907
Telephone : (732) 417-0800
Telefax : (732) 417-0804

Emergency telephone : USA: 24 Hour Emergency Response Information CHEMTREC
toll free: 1-800-424-9300; direct/international: 1-703-527-3887.
CANADA: Quantum Murray (spill response)1-877-378-7745.
CANADA: CANUTEC(collect) 1-613-996-6666. EUROPE: 00
32 3575 5555. ASIA PACIFIC - excl. China: +65 6542-9595.
CHINA: +86 21 2315 9344. AUSTRALIA: +61 2 9616 5890.
SOUTH AFRICA: +32 3 575 55 55. LATAM: 0800 720 8000.
1-613-996-6666. INDIA: +91 22 30948601/2. JAPAN: +65
6542 9595 (24時間 日本語対応無料通話、シンガポール)

Recommended use of the chemical and restrictions on use

Recommended use : Surfactant
Prepared by : Product Safety and Regulatory Affairs Department
(732) 417-0800

SECTION 2. HAZARDS IDENTIFICATION

GHS Classification

Acute aquatic toxicity : Category 1
Chronic aquatic toxicity : Category 2

GHS Label element

Hazard pictograms : 

Signal Word : Warning

Hazard Statements : H400 Very toxic to aquatic life.
H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary Statements : **Prevention:**
P273 Avoid release to the environment.
Response:
P391 Collect spillage.

SAFETY DATA SHEET**CRODA****BRIJ™ S2-SO-(AP)**

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

Disposal:

P501 Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

Other hazards which do not result in classification

May irritate eyes.
 May irritate skin.
 Ingestion may cause irritation to mucous membranes.
 May cause irritation of respiratory tract.

SECTION 3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Substance / Mixture : Pure substance

Hazardous Ingredients

Chemical Name	CAS-No.	Concentration [%]
Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO	9005-00-9	>= 90 - <= 100

SECTION 4. FIRST AID MEASURES

If inhaled : If breathed in, move person into fresh air.
 If symptoms persist, call a physician.

In case of skin contact : Take off contaminated clothing and shoes immediately.
 Wash off with soap and plenty of water.
 If symptoms persist, call a physician.

In case of eye contact : Immediately flush eye(s) with plenty of water.
 If eye irritation persists, consult a specialist.

If swallowed : If large quantities of this material are swallowed, call a physician immediately.

SECTION 5. FIRE-FIGHTING MEASURES**Flammable properties**

Flash point : > 149 °C (> 300 °F)

Suitable extinguishing media : Use extinguishing measures that are appropriate to local circumstances and the surrounding environment.
 Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

Unsuitable extinguishing media : High volume water jet

Specific hazards during fire fighting : Do not use a solid water stream as it may scatter and spread fire.
 Do not allow run-off from fire fighting to enter drains or water courses.

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S2-SO-(AP)

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

- Specific extinguishing methods : Standard procedure for chemical fires.
- Further information : Material will float on top of water, treat as a grease fire.
- Special protective equipment for fire-fighters : In the event of fire, wear self-contained breathing apparatus.

SECTION 6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures : Use personal protective equipment.
Ensure adequate ventilation.
- Methods and materials for containment and cleaning up : Sweep up and shovel.
Keep in suitable, closed containers for disposal.

SECTION 7. HANDLING AND STORAGE

- Advice on safe handling : Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.
- Conditions for safe storage : Store in original container.
Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place.
- Materials to avoid : No special restrictions on storage with other products.

SECTION 8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

Ingredients with workplace control parameters

Contains no substances with occupational exposure limit values.

Personal protective equipment

- Respiratory protection : No personal respiratory protective equipment normally required.
- Eye protection : Safety glasses
- Skin and body protection : impervious clothing
- Hygiene measures : Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

SECTION 9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

- Appearance : solid
- Color : white
- Odor : No data available

SAFETY DATA SHEET**CRODA****BRIJ™ S2-SO-(AP)**

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

Odor Threshold	: No data available
pH	: 5 - 8, Aqueous solution of isopropanol
pour point	: approximately 43.3 °C (109.9 °F)
Boiling point	: No data available
Flash point	: > 149 °C (> 300 °F)
Vapor pressure	: No data available
Relative density	: approximately 0.97
Density	: No data available
Solubility(ies)	
Water solubility	: No data available
Solubility in other solvents	: insoluble Solvent: propylene glycol
	insoluble Solvent: mineral oil
	soluble Solvent: Ethanol
Partition coefficient: n-octanol/water	: No data available
Thermal decomposition	: No data available

SECTION 10. STABILITY AND REACTIVITY

Chemical stability	: Stable under normal conditions.
Possibility of hazardous reactions	: Hazardous polymerization does not occur. Stable under recommended storage conditions.
Conditions to avoid	: None known.
Incompatible materials	: Strong oxidizing agents
Hazardous decomposition products	: In case of fire hazardous decomposition products may be produced such as: Carbon oxides

SECTION 11. TOXICOLOGICAL INFORMATION**Acute toxicity****Ingredients:****Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:**

SAFETY DATA SHEET**CRODA****BRIJ™ S2-SO-(AP)**

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

- Acute oral toxicity : LD50 Oral rat, male and female: > 21,000 mg/kg
Method: OECD Test Guideline 401
- Acute inhalation toxicity : Method: Expert judgment
Assessment: The substance or mixture has no acute inhalation toxicity
Remarks: Based on available data, the classification criteria are not met
- Acute dermal toxicity : LD50 Dermal : > 2,000 mg/kg
Method: OECD Test Guideline 402
Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

Skin corrosion/irritation**Ingredients:****Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:**

Species: rabbit

Result: No skin irritation

Method: OECD Test Guideline 404

Serious eye damage/eye irritation**Ingredients:****Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:**

Species: rabbit

Classification: Based on available data, the classification criteria are not met

Method: OECD Test Guideline 405

Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

Respiratory or skin sensitization**Ingredients:****Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:**

Species: guinea pig

Result: Did not cause sensitization on laboratory animals.

Method: OECD Test Guideline 406

Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

Germ cell mutagenicity**Ingredients:****Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:**

Genotoxicity in vitro

: Type: Ames test

Test species: Salmonella typhimurium

Metabolic activation: with and without metabolic activation

Result: negative

Method: OECD Test Guideline 471

: Type: In vitro gene mutation study in mammalian cells

Test species: Chinese hamster ovary cells

Metabolic activation: with and without metabolic activation

Result: negative

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S2-SO-(AP)

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

Method: OECD Test Guideline 476

Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

: Type: Chromosome aberration test in vitro

Test species: Chinese hamster ovary cells

Metabolic activation: with and without metabolic activation

Result: negative

Method: OECD Test Guideline 473

Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

Carcinogenicity

Ingredients:

Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:

Carcinogenicity - Assessment : No data available

Reproductive toxicity

Reproductive toxicity -
Assessment

: No toxicity to reproduction, Information given is based on data obtained from similar substances.

Did not show teratogenic effects in animal experiments.,

Information given is based on data obtained from similar substances.

STOT-single exposure

Ingredients:

Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:

Remarks: not applicable

STOT-repeated exposure

No data available

Repeated dose toxicity

Ingredients:

Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:

rat:

NOAEL: 500

Application Route: Oral

Method: OECD Test Guideline 408

Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

Aspiration toxicity

Ingredients:

Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO:

No aspiration toxicity classification

SECTION 12. ECOLOGICAL INFORMATION

Ecotoxicity

SAFETY DATA SHEET**CRODA****BRIJ™ S2-SO-(AP)**

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

Ingredients:**Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO :**

Toxicity to fish : (Pimephales promelas (fathead minnow)): 8.15 mg/l
Exposure time: 96 h
Test Method: static test
GLP: no
Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

(Oncorhynchus mykiss (rainbow trout)): > 100 mg/l
Exposure time: 96 h
Test Method: static test
Remarks: No toxicity at the limit of solubility.

Toxicity to daphnia and other aquatic invertebrates : EC50 (Daphnia magna (Water flea)): 0.32 mg/l
Exposure time: 48 h
Test Method: static test
Method: OECD Test Guideline 202
Remarks: Information given is based on data obtained from similar substances.

M-Factor : 1
Toxicity to daphnia and other aquatic invertebrates (Chronic toxicity) : EC20: 0.0542 mg/l
Exposure time: 21 d
Species: Daphnia magna (Water flea)
Method: QSAR

Persistence and degradability**Ingredients:****Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO :**

Biodegradability : Result: Readily biodegradable.
Biodegradation: 83.6 %
Exposure time: 28 d
Method: OECD Test Guideline 301B
GLP: yes

Bioaccumulative potential**Product:**

Partition coefficient: n-octanol/water : Remarks: No data available

Ingredients:**Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO :**

Bioaccumulation : Remarks: Bioaccumulation is unlikely.

Partition coefficient: n-octanol/water : log Pow: estimated 7.07

Mobility in soil

No data available

Other adverse effects

No data available

Product:

Additional ecological : No toxicity at the limit of solubility.

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S2-SO-(AP)

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

information

SECTION 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Disposal methods

- Waste from residues : Dispose of in accordance with local regulations.
- Contaminated packaging : Empty remaining contents.
Empty containers should be taken to an approved waste handling site for recycling or disposal.

SECTION 14. TRANSPORT INFORMATION

International regulation

IATA-DGR

- UN/ID No. : 3077
- Proper shipping name : Environmentally hazardous substance, solid, n.o.s.
(fatty alcohol ethoxylate)
- Class : 9
- Packing group : III
- Labels : 9
- Packing instruction (cargo aircraft) : 956
- Packing instruction (passenger aircraft) : 956

IMDG-Code

- UN number : 3077
- Proper shipping name : ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, SOLID,
N.O.S.
(fatty alcohol ethoxylate)
- Class : 9
- Packing group : III
- Labels : 9
- EmS Code : F-A, S-F
- Marine pollutant : yes

Transport in bulk according to Annex II of MARPOL 73/78 and the IBC Code

Not applicable for product as supplied.

Domestic regulation

49 CFR

Not regulated as a dangerous good

Special precautions for user

- Remarks : DOT - Regulated in bulk containers (>119 gallons) - only.

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S2-SO-(AP)

Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

SECTION 15. REGULATORY INFORMATION

SARA 311/312 Hazards : No SARA Hazards

SARA 302 : SARA 302: No chemicals in this material are subject to the reporting requirements of SARA Title III, Section 302.

SARA 313 : SARA 313: This material does not contain any chemical components with known CAS numbers that exceed the threshold (De Minimis) reporting levels established by SARA Title III, Section 313.

US State Regulations

Pennsylvania Right To Know

Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO 9005-00-9 90 - 100 %

New Jersey Right To Know

Octadecan-1-ol, ethoxylated, < 2.5 EO 9005-00-9 90 - 100 %

California Prop 65

WARNING! This product contains a chemical known in the State of California to cause cancer.

Formaldehyde 50-00-0
Acetaldehyde 75-07-0
ethylene oxide 75-21-8
1,4-dioxane 123-91-1

WARNING: This product contains a chemical known in the State of California to cause birth defects or other reproductive harm.

ethylene oxide 75-21-8

The ingredients of this product are reported in the following inventories:

TSCA All chemical substances in this product are listed on the TSCA Inventory.

REACH On the inventory, or in compliance with the inventory

DSL All components of this product are on the Canadian DSL.

AICS On the inventory, or in compliance with the inventory

ENCS On the inventory, or in compliance with the inventory

ISHL On the inventory, or in compliance with the inventory

KECI On the inventory, or in compliance with the inventory

PICCS On the inventory, or in compliance with the inventory

IECSC On the inventory, or in compliance with the inventory

For explanation of abbreviations see section 16.

SECTION 16. OTHER INFORMATION

SAFETY DATA SHEET

CRODA

BRIJ™ S2-SO-(AP)

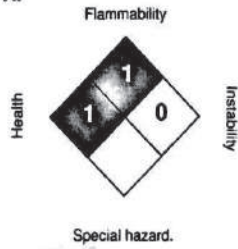
Version 1.1

Revision Date 02/16/2015

Print Date 02/16/2015

Further information

NFPA:



HMIS II:

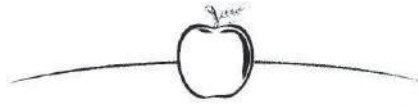
HEALTH	1
FLAMMABILITY	1
Reactivity	0

0 = not significant, 1 = Slight,
2 = Moderate, 3 = High
4 = Extreme, * = Chronic

Key or legend to abbreviations and acronyms used in the safety data sheet

AICS (Australia), DSL (Canada), IECSC (China), REACH (European Union), ENCS (Japan), ISHL (Japan), KECI (Korea), NZIoC (New Zealand), PICCS (Philippines), TSCA (USA)

The information provided in this Material Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text.



Cromaroma Ltda.

Bogotá, 01 de febrero de 2016
AB 018C/16

Señores:
TECNOQUIMICAS
ATN: DR. CARLOS RAMÍREZ
Cali - Colombia

Estimado Doctor:

De acuerdo con su amable solicitud tengo el gusto de enviar las siguientes muestras y cotización, que espero sea satisfactoria:

REF: EXTRACTO DE MAGNOLIA (SISTEMA PRESERVANTE NATURAL)

PRODUCTO: **LEMA 14-A**
PRECIO: PENDIENTE POR CONFIRMAR
EMBALAJE: 5, 20 Y 50 KILOS
DISPONIBILIDAD: 75 DÍAS DESPUÉS DE SU ORDEN DE COMPRA Y CONFIRMACIÓN DE DISPONIBILIDAD POR PARTE DEL PROVEEDOR
PROVEEDOR: NATURALIS (ITALIA)

NOTA: A estos valores favor adicionar el IVA. Este precio se entiende FOB Bogotá. Información técnica de cada producto.

Quedo a la espera de sus comentarios.

Saludos cordiales,

ING. Q. RUBY MILLAN NEISA
DIVISIÓN COSMÉTICOS
Cel.: 3134213746
E-mail.: ruby.millan@cromaroma.com.co



TECHNICAL DATA SHEET

LEMA 14-A

Natural preservative system
(patent pending)

- Innovative self-preservative system
- Approved world wide
- Resistant to hydrolysis, temperature and pH

APPLICATIONS

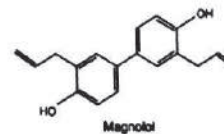
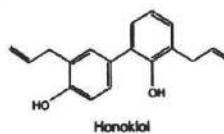
Leave-on 0,4 – 0,6%
Rinse-off 0,4 – 0,6%

ACTIVE INGREDIENTS

Honokiol

CAS: 35354-74-6

EINECS: /



Magnolol

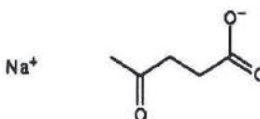
CAS: 528-43-8

EINECS: /

SODIUM LEVULINATE

CAS: 19856-23-6

EINECS: 243.378-4





According to Regulation (EC) No. 1907/2006
Version 4 Revision Date 21.09.2015

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE/MIXTURE AND OF THE COMPANY/UNDERTAKING

1.1 Product identifiers

Product name **LEMA 14-A**
Inci name Magnolol, Honokiol, Sodium levulinate

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Identified uses : cosmetics

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

Company: NATURALIS Srl
VIA Valassina 64
20851 Lissone (MB)-ITALY

Tel. e fax Tel. 0362/545457
Fax. 0362/526364

e-mail info@naturalis.it

1.4 Emergency telephone number

Emergency Phone # : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleni Niguarda Ca' Granda - Milano)

2. HAZARDS IDENTIFICATION

2.1 Classification of the substance or mixture Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Acute toxicity, Oral (Category 4)
Skin irritation (Category 2)
Eye irritation (Category 2)
Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3)

2.2 Label elements

Labelling according Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]

Pictogram



Signal word Warning

Hazard statement(s)

H302 Harmful if swallowed.
H315 Causes skin irritation.

Naturalis Srl

Legal Head Office Via Valassina n° 64 20851 Lissone (MB) - Italy
tel. +39 0362 545457; fax +39 0362 526364; P.IVA 03819190160
www.naturalis.it; info@naturalis.it



H319
H335

Causes serious eye irritation.
May cause respiratory irritation.

Precautionary statement(s)

P261

Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Supplemental Hazard

Statements

none

2.3 Other hazards – none

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

3.1 Mixture

Hazardous ingredients according to Regulation (EC) No 1272/2008

COMPONENTS	CAS	EINECS	CLASSIFICATION	CONCENTRATION (%)
Magnolol /Honokiol	528-43-8/35354-74-6			15-25%
Sodium Levulinate	19856-23-6	243-378-4	Acute Tox.4; Skin Irrit. 2; Eye Irrit. 2; STOT SE 3; H302, H315, H319, H335	75-85%

4. FIRST AID MEASURES

4.1 Description of first aid measures

General advice

Consult a physician. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.

If inhaled

If breathed in, move person into fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Consult a physician.

In case of skin contact

Wash off with soap and plenty of water. Consult a physician.

In case of eye contact

Rinse thoroughly with plenty of water for at least 15 minutes and consult a physician.

If swallowed

Never give anything by mouth to an unconscious person. Rinse mouth with water. Consult a physician.

4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.

4.3 Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

no data available

5. FIRE-FIGHTING MEASURES

5.1 Extinguishing media

Suitable extinguishing media

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

5.2 Special hazards arising from the substance or mixture

Carbon oxides

5.3 Advice for firefighters

Naturalis Srl

Legal Head Office Via Valassina n° 64 20851 Lissone (MB) – Italy
tel. +39 0362 545457; fax +39 0362 526364; P.IVA 03819190160
www.naturalis.it; info@naturalis.it



Wear self contained breathing apparatus for fire fighting if necessary.

5.4 Further information
no data available

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

6.1 Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Use personal protective equipment. Avoid dust formation. Avoid breathing vapors, mist or gas. Ensure adequate ventilation. Evacuate personnel to safe areas. Avoid breathing dust.

6.2 Environmental precautions

Do not let product enter drains.

6.3 Methods and materials for containment and cleaning up

Pick up and arrange disposal without creating dust. Sweep up and shovel. Keep in suitable, closed containers for disposal.

6.4 Reference to other sections

For disposal see section 13.

7. HANDLING AND STORAGE

7.1 Precautions for safe handling

Avoid contact with skin and eyes. Avoid formation of dust and aerosols. Provide appropriate exhaust ventilation at places where dust is formed. Normal measures for preventive fire protection.

7.2 Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Store in cool place. Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place. Light sensitive.

7.3 Specific end uses

no data available

8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

8.1 Control parameters

No one

8.2 Exposure controls

Appropriate engineering controls

Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice. Wash hands before breaks and at the end of workday.

Personal protective equipment

Eye/face protection

Safety glasses with side-shields conforming to EN166 Use equipment for eye protection tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or EN 166(EU).

Skin protection

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices.

Wash and dry hands.

Naturalis Srl

Legal Head Office Via Valassina n° 64 20851 Lissone (MB) – Italy
tel. +39 0362 545457; fax +39 0362 526364; P.IVA 03819190160
www.naturalis.it; info@naturalis.it



The selected protective gloves have to satisfy the specifications of EU Directive 89/686/EEC and the standard EN 374 derived from it.

Body Protection

Complete suit protecting against chemicals. The type of protective equipment must be selected according to the concentration and amount of the dangerous substance at the specific workplace.

Respiratory protection

For nuisance exposures use type P95 (US) or type P1 (EU EN 143) particle respirator. For higher level protection use type OV/AG/P99 (US) or type ABEK-P2 (EU EN 143) respirator cartridges.

Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

9.1 Information on basic physical and chemical properties

Appearance	Liquid
Color	Light yellow
Odor	Characteristic
Density (20°C)	ca 1,14 g/ml
Refractive index	1,522 – 1,534
Initial boiling point	>100°C
Melting point	>100°C
Flow time	<15s
Water solubility (20°C)	< 1g/l
Water solubility (60°C)	<10g/l

9.2 Other safety information

no data available

10. STABILITY AND REACTIVITY

10.1 Reactivity

no data available

10.2 Chemical stability

no data available

10.3 Possibility of hazardous reactions

no data available

10.5 Incompatible materials

Bases, Oxidizing agents, Reducing agents

10.6 Hazardous decomposition products

Other decomposition products - no data available

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

11.1 Information on toxicological effects

Acute toxicity

LD50 Oral - rat - 1.850 mg/kg

LD50 Dermal - rabbit - > 5.000 mg/kg

Naturalis Srl

Legal Head Office Via Valassina n° 64 20851 Lissone (MB) – Italy

tel. +39 0362 545457; fax +39 0362 526364; P.IVA 03819190160

www.naturalis.it; info@naturalis.it



Skin corrosion/irritation
Skin - rabbit - Skin irritation - 24 h

Serious eye damage/eye irritation
Eye irritation

Respiratory or skin sensitization
no data available

Germ cell mutagenicity
no data available

Carcinogenicity
IARC: No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

Reproductive toxicity
no data available

Specific target organ toxicity - single exposure
Inhalation - May cause respiratory irritation.

Specific target organ toxicity - repeated exposure
no data available

Aspiration hazard
no data available

Potential health effects
Inhalation May be harmful if inhaled. Causes respiratory tract irritation.
Ingestion Harmful if swallowed.
Skin May be harmful if absorbed through skin. Causes skin irritation.
Eyes Causes serious eye irritation.

Signs and Symptoms of Exposure
To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.

12. ECOLOGICAL INFORMATION

12.1 Toxicity
no data available

12.2 Persistence and degradability
no data available

12.3 Bioaccumulative potential
no data available

12.4 Mobility in soil
no data available

Naturalis Srl
Legal Head Office Via Valassina n° 64 20851 Lissone (MB) – Italy
tel. +39 0362 545457; fax +39 0362 526364; P.IVA 03819190160
www.naturalis.it; info@naturalis.it



12.5 Results of PBT and vPvB assessment
no data available

12.6 Other adverse effects
no data available

13. DISPOSAL INFORMATION

13.1 Waste treatment methods

Product

Offer surplus and non-recyclable solutions to a licensed disposal company.

Contaminated packaging

Dispose of as unused product.

14. TRANSPORT INFORMATION

14.1 UN number

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.2 UN proper shipping name

ADR/RID: Not dangerous goods

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

14.3 Transport hazard class(es)

ADR/RID:

- IMDG: -

IATA: -

14.4 Packaging group

ADR/RID:

- IMDG: -

IATA: -

14.5 Environmental hazards

ADR/RID:

no IMDG Marine pollutant:

no IATA: no

14.6 Special precautions for user

no data available

15. REGULATORY INFORMATION

This safety datasheet complies with the requirements of Regulation (EC) No. 1907/2006.

15.1 Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

no data available

15.2 Chemical Safety Assessment

no data available

16. OTHER INFORMATION

Further information

The above information is believed to be correct but does not purport to be all inclusive and shall be used only as a guide. The information in this document is based on the present state of our knowledge and is applicable

Naturalis Srl

Legal Head Office Via Valassina n° 64 20851 Lissone (MB) – Italy

tel. +39 0362 545457; fax +39 0362 526364; P.IVA 03819190160

www.naturalis.it; info@naturalis.it