DISEÑO EXPERIMENTAL DE MEZCLAS PARA EL CONSERVANTE DE UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA NATURAL Y ORGÁNICA

Autores: Roberto Diéguez Rodríguez[1], Quirino Arias Cedeño[2], Maikel Diéguez Rodríguez[3], Mijail Mijares Bullaín Galardis[4]

[1] Licenciado en Ciencias farmacéutica. Master en Química Biológica.

[2] Dr. C. en Química Biológica

[3] M. Sc. en Diseño y Fabricación Asistido por Computadora

[4] M. Sc. en Química Biológica

[1] Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Granma, Granma, Cuba.

dieroberto29@gmail.com

RESUMEN

Se presenta una estrategia de optimización de un diseño de experimento, a través de la estructuración de un procedimiento para el diseño de mezclas utilizando el sistema computacional Statgraphics Centurion XV; que brinda la secuencia metodológica de pasos necesarios para encontrar la proporción máxima o mínima de los componentes de una mezcla. Se evaluaron en cada fase del diseño los puntos críticos para la toma de decisiones; así como los límites de los componentes para determinar la región experimental, utilizando como caso de estudio la investigación de un conservante natural y orgánico para una formulación cosmética. Se estableció el Diseño de mezclas Simplex-Lattice, para tres componentes incluyendo el agua y las cinco respuestas de la actividad antimicrobiana; que permitió determinar que son necesarias sólo 14 corridas para el experimento. Los datos se ajustaron con un modelo cúbico, y para un mejor entendimiento de la respuesta se utilizó un análisis de regresión lineal simple cuya aplicación al caso de estudio permite reducir los costos experimentales. De acuerdo con la predicción será el componente, aceite esencial el de mayor influencia sobre las Bacterias Gram (+), el componente aceite sobre las Bacterias Gram (-) y sobre los Hongos y Levadura el componentes aceite esencial es el de mayor influencia.

Palabras clave: Statgraphics; Diseño de mezcla; Simplex Lattice; conservante; cosmético natural y orgánico; aceite vegetal.

INTRODUCCIÓN

En todo proceso investigativo existen aspectos inciertos que se deben esclarecer para llegar a una solución óptima de un problema. En este aspecto es de gran utilidad aplicar el diseño de experimentos (DE) que consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué

manera, en la obtención de datos, que al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas (Humberto & Román, 2008). En el campo de las investigaciones, la optimización es también uno de los problemas de mayor importancia, para la localización de variables que hace más eficiente el establecimiento de condiciones de procesos que conducen al mayor rendimiento.

Optimizar los recursos físico-químicos y/o microbiológicos es posible con la utilización de modelos matemáticos y con el auxilio de paquetes computacionales. La utilización de uno u otro dependerá en gran medida del conocimiento teórico que se tenga del problema, los recursos económicos disponibles (Mesa, Brossard, Guerrero, & Henry, 1998; Rispoli† & Vishal Shah*, 2008)

En el diseño de experimento (DE), se implementa en procesos y productos que la respuesta se ve afectada por varios factores (Rodríguez, Ruiz, Salcedo, Jiménez, & Mckinley, 2020), se estudia la influencia de las variables en condiciones que deben ser conocidas y controladas por el investigador para observar y medir los resultados de la variación consciente de estas, aumentando la confiabilidad de los hallazgos logrados así como para someter a prueba una teoría (García-Córdoba, 2005). La optimización de la producción de muchos producto se puede realizar por *metodología de superficie de respuesta* (MSR) o por diseño de experimento con mezcla en nuestra investigación los componentes o ingredientes no son independientes por lo que se escogerá el DE con mezclas para elaborar una mescla adecuada de un conservantes que se utilizara en una formulación cosmética (Cabrales; Castillo, 2016; García, 2016; Siverio, 2014)

Es conveniente estructurar el DE auxiliado por un paquete estadístico en cuatro etapas, Planeación y diseño, Análisis, Interpretación y Diagnostico. En cada etapa es necesario definir un conjunto de interrogantes relevantes, lo cual ocasiona que se observen salidas que no son relevantes en la etapa que se está realizando (Humberto & Román, 2008); en un diseño experimental exitoso la planeación es la etapa más importante y por tanto a la que requiere más atención y tiempo (Rodríguez et al., 2020).

En los DE con mezclas, los factores son los componentes o ingredientes de una mezcla y las variables de respuesta dependen de las proporciones con las que participan los ingredientes en la misma y no de la cantidad de estos. Se clasificaran según el tipo de diseño, modelo y gráfica. En este experimento se escogerá entre los diseños Simplex-reticular, Simplex con centroide, Vértices extremos y Mixto cual es el más adecuado. También se seleccionará el modelo entre los Canónico de primer orden, De segundo orden, Cúbico especial, Cúbico. Para

el caso de estudio fue usado el paquete computacional Statgraphics para mejorar y facilitar la planeación y el análisis de los estudios experimentales (Humberto & Román, 2008).

El objetivo de esta investigación es elaborar una estrategia de optimización de un diseño experimental de mezcla de aceites vegetales como conservantes de una formulación cosmética orgánica y natural. Esta estrategia permitirá disminuir los costos experimentales para lograr la experimentación de tres componentes, dos conservantes, el disolvente y cinco respuestas de la actividad antimicrobiana de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El **material vegetal** seleccionado en el experimento se tuvo en cuenta las plantas *Cúrcuma longa L. y Luffa Cylíndrica L*, atendiendo a los reportes populares sobre sus empleos en tratamiento de diversas afecciones, aunque esos efectos terapéuticos no han sido validados experimentalmente; además se consideró la disponibilidad de estas plantas en la flora de nuestra localidad y estudios realizados que demuestran de su actividad antimicrobiana

El material vegetal recolectado se clasificó, según NRSP 309 del MINSAP. Luego se sometió a un proceso de lavado con agua potable, y desinfección mediante inmersión en una disolución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 %, asegurando la calidad del material vegetal, según las exigencias de la Organización Mundial de la Salud.

La extracción de los aceites se utilizó los siguientes métodos. Para la *Cúrcuma longa L.* el método seleccionado es arrastre con vapor a partir del material seco se empleó el procedimiento descrito en la NRSP 311 del MINSAP. En la *Luffa Cylindrica L,* el método seleccionado es el soxhle empleando el n-heptano como solvente.

Según (Humberto & Román, 2008) el diseño de experimento es una metodología desarrollada para aplicar sistemáticamente la estadística a la experimentación. Con esta estrategia de optimización, se pretende adquirir determinadas habilidades, tales como:

- Seleccionar una estrategia experimental para dar la solución a problemas de investigación.
- Utilizar programas estadísticos profesionales para la elaboración de la secuencia experimental y el análisis de los resultados.
- Identificar y utilizar el o los diseños estadísticos que deben utilizarse para lograr una experimentación eficiente.
- Interpretar los resultados obtenidos.

En los diseños factoriales y diseño de metodología de superficie de repuesta (MSR). Los niveles de cada factor son independientes de los niveles de los otros factores. Sin embargo,

en los experimentos con mezcla, los factores son los componentes o ingredientes de una mezcla, los niveles de dichos ingredientes no son independientes. Este hecho hace que los diseños anteriores no se apliquen a experimentos con mezclas (Humberto & Román, 2008, p. 482).

En nuestra investigación guiándonos por el mapa conceptual, no utilizaremos el diseño de vértices extremos porque la región experimental tiene la forma del simplex ni el diseño mixto porque existen factores que afectan la respuesta estudiada pero no corresponden a proporciones de los componentes en las mezcla ejemplo temperatura, tiempo, etc (Humberto & Román, 2008, pp. 496,500). Escogeremos entre el diseño simplex-reticular y diseño simplex con centroide.

Los problemas de experimentos con mezclas tendrán q componentes o ingredientes y cada tratamiento en el experimento consiste en una combinación particular o mezcla de dichos ingredientes. Denotando x1, x2,…, xq, las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla deben satisfacer dos restricciones:$0 \leq x_i \leq 1$, para cada componente i (Bedoya Castaño, 2019).

La región experimental, para tres componentes es un triángulo. Además, en los diseños de mezcla las regiones mencionadas son al mismo tiempo las regiones de operatividad, ya que cualquier mezcla posibles es un punto del simplex, como se muestra en la figura 1 (ALFARO, 2019).

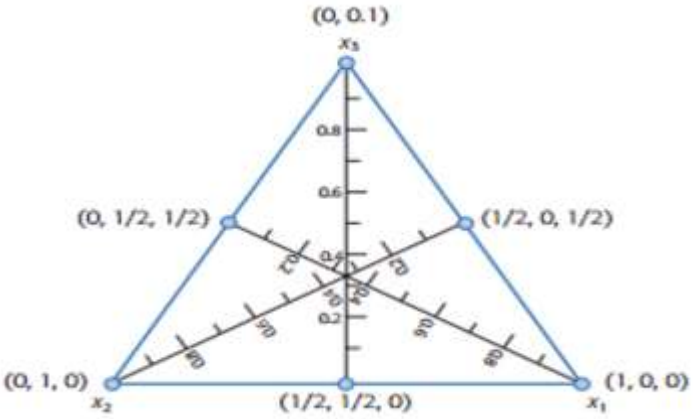

Figura 1 Diseño simplex. Fuente: (Gutiérrez & de la Vara, 2008)

Estos diseños se utilizan pues los niveles de los factores en las mezclas son interdependientes unos de otros de manera muy estrecha. Para el caso de tres componentes el espacio muestral es un triángulo cuyos vértices corresponden a formulaciones que son componentes puros (la mezcla es del 100% de uno de los componentes (Humberto & Román, 2008).

Luego es posible cuantificar la influencia que tienen los diferentes componentes sobre la respuesta, tanto en forma individual como en su acción conjunta con otros componentes. Modelando la respuesta para predecirla en cualquier formulación posible, la composición de la mezcla que proporcione mejores resultados (Humberto & Román, 2008).

El diseño simplex reticular o simplex Lattice (Anchatuña & Enrique, 2014) considera a los q componentes y permite ajustar un modelo estadístico de orden m. Los puntos del diseño consisten en todas las posibles combinaciones de componentes o mezclas que se forman al considerar que las proporciones pueden tomar los m + 1 valores entre cero y uno dados por: Xi=0,1/m, 2/m,…m/m

Implica que q = 3 y m = 2; por ello, los valores que pueden tomar los componentes son xi = 0, ½, 1. Con lo que las mezclas de tres componentes que se pueden formar con estos valores son:

(x1,x2,x3)= (1,0,0); (0,1,0); (0,0,1); (1/2,1/2,0);

(1/2,0,1/2) y (0,1/2,1/2)

Que corresponden a las tres mezclas puras y a tres binarias. El diseño simplex reticular incluye básicamente puntos en la frontera, el cual se identifica a partir de los espacios métricos donde ***A*** es un subconjunto (***X, d)***. que define a **(x ∈ X)** como un punto interior de ***A*** si existe una vecindad **V ∈ V(x)** tal que **V ⊂ A** ; a **(x ∈ X)** como punto exterior de ***A*** si existe una vecindad **V ∈ V(x)** tal que **V ∈ Y\A** así como a **(x ∈ X)** como punto de frontera de ***A*** si no es exterior ni interior de ***A***, o sea, si cumple que **V ∈ V ⇒ V ∩ A ≠ ∅** (Fraguela Collar, 2002)**.** Por otro lado si el experimentador desea hacer predicciones en el interior es recomendable agregar corridas que estén en el interior (Amadio, Medina, Dediol, Zimmermann, & Miralles, 2011).

Una vez obtenidos los resultados experimentales de un diseño de mezcla es necesario ajustar un modelo estadístico para investigar el efecto de los componentes sobre la respuesta. Consideremos que puede ser ajustado a un modelo de primer orden en la práctica, se denota con la siguiente ecuación:

$$E(y) = \sum_{i=1}^{q} \beta_i x_i$$

La interpretación de la magnitud de los coeficientes de un modelo de mezclas debe tratarse en forma especial debido a que $0 \leq x_i \leq 1$. Por ejemplo, un término lineal del tipo β_i

únicamente contribuye al modelo cuando $x_i > 0$, y la máxima contribución ocurre cuando $x_i = 1$, en cuyo caso el efecto máximo es igual a β_i.

Cuando se ajusta un modelo cuadrático es necesario incorporar la restricción x1 + x2 +…+ xq = 1, Suponiendo que se tienen tres componentes x1, x2, x3, por lo que el polinomio de segundo grado está dado por.

$$\boldsymbol{E(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2}$$

En general, para q componentes este modelo está dado por:

$$\boldsymbol{E(y) = \sum_{i=1}^{q} \beta_i x_i + \sum_{i<j} \sum_{i=1}^{q} \beta_{ij} x_i x_j}$$

donde el coeficiente βi representa la respuesta esperada en la mezcla pura xi = 1, y al mismo tiempo es la altura de la superficie en el vértice xi = 1. Cuando la mezcla es estrictamente aditiva el polinomio lineal es adecuado. Una mezcla es considerada estrictamente aditiva cuando en el centro de las aristas correspondientes a cada par de vértices se predice el promedio de lo estimado en los vértices. Es precisamente el coeficiente βij el que representa el exceso de la respuesta del modelo cuadrático sobre el lineal, y dependiendo de su signo se habla de sinergismo o antagonismo entre los componentes correspondientes debido a la mezcla no aditiva. La máxima contribución de este término se da en el punto xi = xj = ½.

En ocasiones, cuando el modelo cuadrático no es suficiente para describir la respuesta puede ajustarse el modelo cúbico completo, que para tres componentes está dado por:

$$E(y)=\beta_1 x_1+\beta_2 x_2+\beta_3 x_3+\beta_{12} x_1 x_2+\beta_{13} x_1 x_3+\beta_{23} x_2 x_3+\beta_{123} x_1 x_2 x_3$$
$$+\delta_{12} x_1 x_2 (x_1-x_2)+\delta_{13} x_1 x_3 (x_1-x_3)+\delta_{23} x_2 x_3 (x_2-x_3)$$

$$E(y) = \sum_{i=1}^{q} \beta i X i \sum_{i<j} \sum_{j=2}^{q} \beta ij xi xj + \sum_{i<j} \sum_{j=2}^{q} \delta ij xi xj (xi - xj) + \sum_{i<j} \sum_{j<k} \sum_{k=3}^{q} \beta ijk Xi Xj Xk$$

En el modelo cúbico, los términos tales como $x_i x_j (x_i - x_j)$ permiten mezclas tanto con sinergia como con antagonismo a lo largo del lado $x_i - x_j$ (Humberto & Román, 2008).

Seguidamente para un mejor entendimiento de la respuesta se utilizara un ***análisis de regresión*** que tiene como objetivo modelar en forma matemática el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes (factores). Este modelo matemático puede ser usado para propósitos de predicción, optimización y control(Humberto & Román, 2008).

La ***regresión lineal simple*** está constituida por dos variables *X* y *Y*, por lo que se quiere explicar el comportamiento de Y con base en los valores que toma X. Para esto, se mide el valor de Y sobre un conjunto de *n* valores de X, con lo que se obtienen *n* parejas de puntos (x_1, y_1), (x_2, y_2), …, (x_n, y_n). Ha *Y* se le llama la *variable dependiente* o la *variable de respuesta* y a *X* se le conoce como *variable independiente* o *variable regresora*. La variable X no necesariamente es aleatoria, ya que en muchas ocasiones el investigador fija sus valores; en cambio, *Y* sí es una variable aleatoria. Una manera de estudiar el comportamiento de *Y* con respecto a *X* es mediante un modelo de regresión que consiste en ajustar un modelo matemático de la forma:

$$Y=f(X)$$

a las *n* parejas de puntos. Con ello, se puede ver si dado un valor de la variable independiente *X* es posible predecir el valor promedio de *Y*.

Suponga que las variables *X* y *Y* están relacionadas linealmente y que para cada valor de *X*, la variable dependiente, *Y*, es una variable aleatoria. Es decir, que cada observación de *Y* puede ser descrita por el modelo:

$$Y=\beta_0+\beta_1 X+\varepsilon$$

donde ε es un error aleatorio con media cero y varianza σ^2. También suponga que los errores aleatorios no están correlacionados. La ecuación anterior es conocida como el *modelo de regresión lineal simple*.

A continuación como estudio de caso se analizara la mezcla, donde se utilizarán 3 componentes como variables de entrada que están dentro de formula general, los cuales son aceite esencial (X_1), aceite (X_2) y agua (X_3). Las variables de respuesta serán la actividad antimicrobiana a los microorganismos EC (Y_1), PA (Y_2), SA (Y_3), AB (Y_5), CA (Y_6).

Los límites superior e inferior de cada componente se obtuvieron a partir del análisis de la formula general de la crema natural y orgánica para el 2.5% de su concentración total.

En esta investigación se utilizaran como conservantes el aceite esencial de *Cúrcuma longa L. y* el aceite de *Luffa Cylíndrica L*, que se les otorgo los siguientes límites (bajo=0; alto=2.5; total de mezcla 79.9), los límites del agua son (bajo=77.4; alto=79.9; total de mezcla=79.9), que son los componentes que varían.

La evaluación de los resultados se realiza en función de la reducción logarítmica del número de microorganismos viables determinados en los tiempos específicos, en relación con los valores correspondientes al inoculo inicial sembrado.

El estándar internacional ISO 11930:2012, proporciona los siguientes criterios para la evaluación de la eficacia del sistema de preservación:

CRITERIO A. se asigna si los resultados obtenidos satisfacen al mismo tiempo todas las condiciones que se indican a continuación:

Después de 7 días: la reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias y al menos 1 logaritmo de Candida albicans;

Después de 14 días: reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias (sin ningún aumento con respecto al resultado de los 7 días), al menos 1 logaritmo para Candida albicans (sin ningún aumento con respecto al resultado de los 7 días) y ningún aumento con respecto al tiempo cero para Aspergillus niger;

Después de 28 días: reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias (sin ningún aumento con respecto al resultado de los 14 días), al menos 1 logaritmo para Candida albicans (sin ningún aumento con respecto al resultado de los 14 días) y al menos 1 logaritmo para Aspergillus niger.

CRITERIO B. se asigna si los resultados satisfacen al mismo tiempo todas las condiciones que se indica a continuación:

Después de 14 días: reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias, por lo menos 1 logaritmo para Candida albicans y ningún aumento con respecto al tiempo cero para Aspergillus niger.

Después de 28 días: la reducción de al menos 3 logaritmos para las bacterias (sin ningún incremento con respecto a la vez anterior), de al menos 1 logaritmo de Candida albicans (un aumento con respecto a la vez anterior) y ningún aumento de Aspergillus niger.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Fue establecido para este estudio de caso, la influencia de las proporciones de los aceites y el solvente en los ingredientes del cosmético como se muestra en la tabla 1(ECOCERT, Mayo de 2012).

Tabla 1 Fórmula general de crema natural y orgánica para 2.5%. Fuente: elaboración propia.

#	(%)	FUNCIÓN/ COMPONENTE	ORIGEN DEL INGREDIENTE
	FASE GRASA (FUNCIÓN)		

#	(%)	FUNCIÓN/ COMPONENTE	ORIGEN DEL INGREDIENTE
1	12	Emoliente/Triglicerido-Manteca Vegetal	Natural, procedencia vegetal, con certificación orgánica.
2	3	Emoliente/Triglicerido	De origen natural
	EMULSIFICANTES (FUNCIÓN)		
3	3	Emulsificante/No iónico	De origen natural
4	2	Emulsificante/No iónico	De origen natural
	FASE ACUOSA (FUNCIÓN)		
5	0.1	Espesante, Controlador de viscosidad	De origen natural
6	**77.4**	Solvente	Origen natural
	ADITIVOS (FUNCIÓN)		
7	**2.5** Máxima cantidad de la mezcla de aceite esencial y aceite vegetal de nuestra localidad	Preservante	Origen natural, categoría vegetal, con certificación orgánica.
	100		

Para la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica se utilizaron cinco cepas de referencia internacional, depositadas en el American Type Culture Collection (ATCC):

- (SA) = Staphylococcus aureus (ATCC 29737) Gram positiva
- (PA) = Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) Gram negativa
- (EC) = Escherichia coli (ATCC 25922) Gram negativa
- (CA) = Candida albicans (ATCC 10231) Levadura
- (AN) = Aspergillus niger Moho.

La capacidad de la formulación cosmética de conservarse frente al ataque microbiano se verifica sobre la base de la observación de la reducción en el recuento del número total de organismos viables (para la prueba de cada cepa microbiana) dentro de un período de tiempo determinado, de acuerdo con los criterios de aceptabilidad indicados en el estándar internacional ISO 11930:2012.

El procedimiento de la prueba se puede resumir en:

a) Preparación de microorganismos para el inóculo.

b) Preparación de los inóculos de cada microorganismo.

c) Inoculación de las muestras con los microorganismos.

d) Comprobación de la supervivencia de microorganismos a intervalos predeterminados.

e) Evaluación de los resultados.

Como resultado de la ejecución del diseño y los modelos matemáticos seleccionados se obtienen mediante el Statgraphics un total de 14 corridas. Estas corridas especifican porcientos de cada componente dentro de la mezcla, como se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Resultados obtenidos en cada punto experimental. Fuente: elaboración propia.

#	COMPONENTES		
	aceite esencial	Aceite	Agua
1	0.0	0.833333	79.0667
2	2.5	0.0	77.4
3	0.0	2.5	77.4
4	0.833333	1.66667	77.4
5	0.416667	1.66667	77.8167
6	0.833333	0.833333	78.2333
7	0.0	0.0	79.9
8	1.66667	0.0	78.2333
9	1.66667	0.416667	77.8167
10	0.833333	0.833333	78.2333
11	0.0	1.66667	78.2333
12	0.833333	0.0	79.0667
13	1.66667	0.833333	77.4
14	0.416667	0.416667	79.0667

Una vez que se obtuvieron las lecturas de absorbancia de los inóculos, se realizaron de manera inmediata las diluciones adecuadas para obtener las concentraciones tanto de bacterias como de hongos y levaduras que indica el estándar internacional ISO 11930:2012, por lo tanto los valores de UFC/ml de los inóculos de los microorganismos ATCC a tiempo cero (T0) se indica a continuación.

Staphylococcus aureus (ATCC 29737) = (1.78×10^6)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) = (1.64×10^6)

Escherichia coli (ATCC 25922) = (1.82×10^6)

Candida albicans (ATCC 10231) = (4.41×10^5)

Aspergillus niger = (1.23×10^5)

En la tabla 3, se indica la variación logarítmica de la carga microbiana para los 30 días:

Tabla 3 Resultado de la actividad antimicrobiana. Fuente: elaboración propia.

COMPONENTES DE LA MEZCLA PRESERVANTE			SA	PA	EC	CA	AN
Aceite esencial	aceite	Agua	To: 6.25 log –T a 30 días	To: 6.22 log – T a 30 días	To: 6.26 log – T a 30 días	To: 5.64 log – T a 30 días	To: 5.09 log – T a 30 días
2.5	0	77.4	0	2.99	3	2	1.99
0	2.5	77.4	3	0	0	2.5	2.1
0	0	79.9	6.25	6.22	6.26	5.64	5.09
0.833333	1.66667	77.4	1	0	0	1.5	1
1.66667	0.833333	77.4	0	1.5	1	1	1
0.833333	0.833333	78.2333	0	0	0	0	0
0.833333	0.833333	78.2333	0	0	0	0	0
0.0	0.833333	79.0667	6.25	2.99	3	3.5	3
0.416667	1.66667	77.8167	2	0	0	2.5	2
1.66667	0.0	78.2333	1	6.22	6.26	3	2.99
1.66667	0.416667	77.8167	0	2.5	2	1.5	1.5
0.0	1.66667	78.2333	6.25	1	1	4	3.5
0.833333	0.0	79.0667	3	6.22	6.26	3.5	3
0.416667	0.416667	79.0667	3	3	3	3	3

Como se observa en la tabla 3 la mayor actividad antimicrobiana sobre las Bacterias Gram (+), Bacterias Gram (-), Hongos y Levaduras se logra en la mezcla donde la los componente poseen los siguientes valores aceite esencial 0.833333, aceite 0.833333, agua 78.2333; debido a que la actividad antimicrobiana posee valores de (0 log).

Ajuste del Modelo y Caracterización de la Mezcla.

Para estimar los coeficientes de los modelos estadísticos, se usó Statgraphics Centurion, el cual aplica el principio de mínimos cuadrados. Se estableció un modelo lineal y otro cubico completo para el experimento, pero se debe verificar si estos modelos explican correctamente las respuestas o si es suficiente con uno de menor grado.

Actividad antimicrobiana.

Para la actividad antimicrobiana se debió de elegir previamente el tipo de modelo según las opciones entre lineal, cuadrático, cubico especial y cubico completo; al analizar los resultados para determinar que se trabaja con un nivel de confianza del 95.0% se debe comprobar que el valor-P_1 (analice de la mezcla) sea menor que 0.05. De acuerdo con este criterio para este estudio de caso se seleccionó el modelo cubico completo que cumple con dicha condición como se muestra en la tabla 4 y la figura 3 para el SA similarmente sucede con PA, EC, CA, AN.

Tabla 4 ANOVA Efectos Estimados del Modelo Completo para actividad antimicrobiana SA (log); PA, EC, (log); CA, AN (log). Fuente: elaboración propia.

Fuente	Valor-P_1 (analice de la mezcla)		
	,SA	PA, EC	CA, AN
Lineal	0.0081	0.0074 0.0082	0.0012 0.0016

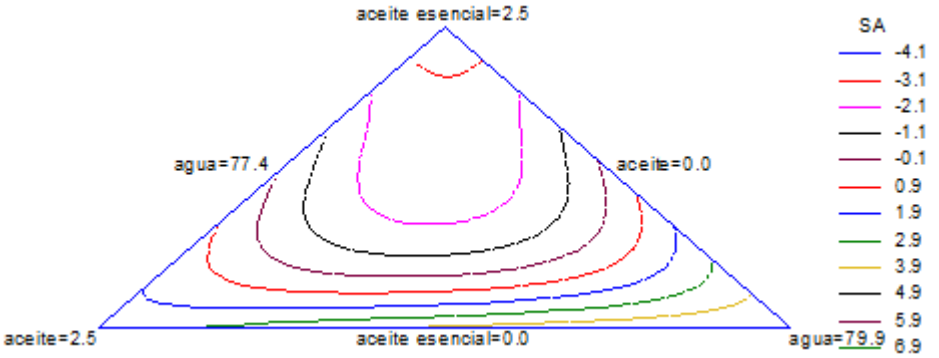

Figura 3 Grafico de contornos de la superficie de respuesta estimada para analice de la mezcla. Fuente: elaboración propia.

En la tabla 5 se tiene en cuenta; la Y *variable dependiente o variable de respuesta* actividad antimicrobiana, y a X *variable independiente o variable regresora*: Componentes del conservante, Selección de la Variable: actividad antimicrobiana. Lineal: Y = a + b*X

Tabla 5 Regresión Simple: SA (mm); PA, EC (mm); CA, AB (mm) vs. Componentes del conservante. Fuente: elaboración propia.

Bloques		Mínimos Cuadrados	Valor-P_2 (análisis de regresión lineal simple)

	Parámetro	Estimado. SA	Estimado. PA, EC	Estimado. CA, AN	Valor-P_2. SA	Valor-P_2. PA, EC	Valor-P_2. CA, AN
1 aceite esencial vegetal	Intercepto	4.89179	3.7375 3.74072	3.57638 3.09851	0.0001	0.0113 0.0145	0.0000 0.0000
	Pendiente	-2.94626	-0.114 -0.2156	- 0.927651 - 0.701217	**0.0160**	0.8954 0.8144	**0.0323** **0.0874**
2 aceite vegetal	Intercepto	3.73681	4.95403 4.89761	3.09812 2.91591	0.0144	0.0001 0.0002	0.0002 0.0001
	Pendiente	-0.215	-2.8671 -2.95164	- 0.353739 - 0.482086	0.8145	**0.0114** **0.0160**	0.4611 0.2599

Puesto que al analizar los valores de P_2 menor que 0.05 en la tabla 5, se evidencia que existe una relación estadísticamente significativa entre SA y aceite esencial; PA, EC y aceite; CA y aceite esencial con un nivel de confianza del 95.0%. La actividad antimicrobiana sobre el AN no llega a 0.05 aunque se acerca con el componente aceite esencial que es de 0.0874.

La ecuación del modelo cuadrático ajustado para la actividad antimicrobiana Y = a + b*X. Con respecto a la magnitud de los coeficientes reales estimados, se puede inferir que el componente aceite esencial el de mayor influencia sobre las Bacterias Gram (+), el componente aceite sobre las Bacterias Gram (-) y sobre los Hongos y Levadura el componentes aceite esencial es el de mayor influencia, puesto que en los valores P_2 en la tabla 5 es menor que 0.05 y el de AN se acerca a este valor. Existe una relación estadísticamente significativa entre SA y aceite esencial como se puede ver en la siguiente figura 4; similarmente sucede entre PA, EC y aceite; entre CA, AN y aceite esencial, con un nivel de confianza del 95.0%.

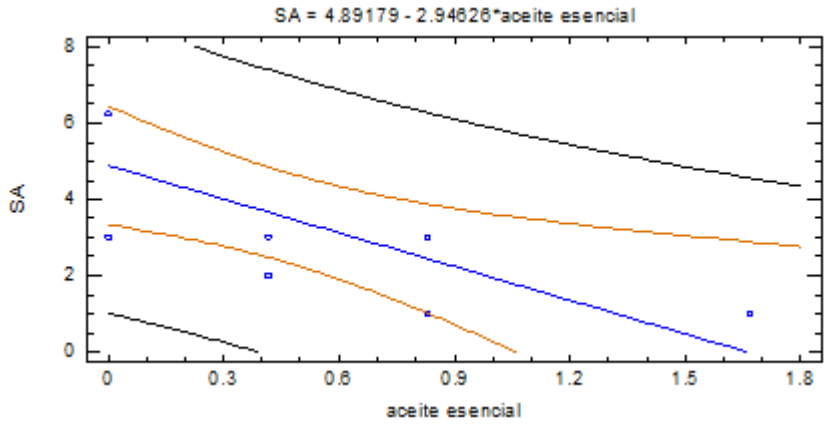

Figura 4 Grafico del modelo ajustado de regresión simple. Fuente: elaboración propia.

CONCLUSIONES

Se elaboró una estrategia que permitirá disminuir los costos experimentales utilizando el diseño de mezcla Simple Lattice, con el software Statgraphics, para tres componentes dos conservantes y el agua como disolvente; así como cinco respuestas dadas por la actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos. Para el estudio de caso como modelo más adecuado fue seleccionado el cúbico completo aleatorizado que permitió establecer la mezcla más eficiente para la actividad antimicrobiana. A partir del análisis de los resultados del experimento se ajustó el modelo de regresión simple y se caracterizó la mezcla para cada variable establecida, el cual determino que el componente aceite esencial es de mayor influencia sobre las Bacterias Gram (+), el componente aceite sobre las Bacterias Gram (-) y sobre los Hongos y Levadura el componentes aceite esencial, puesto que en los valores P es menor que 0.05 y el de AN se acerca a este valor, con un nivel de confianza del 95.0%. La mayor actividad antimicrobiana sobre las Bacterias Gram (+), Bacterias Gram (-), Hongos y Levaduras se logra en la corrida donde los componente poseen los siguientes valores aceite esencial 0.833333, aceite 0.833333, agua 78.2333.

Bibliografía.

ALFARO, C. S. C. (2019). *DISEÑO DE UNA BEBIDA FUNCIONAL CON APACIDAD ANTIOXIDANTE A BASE DE PULPA DE MANGO (Mangifera indica L.), NONI (Morinda citrifolia) Y AGUAYMANTO (Physalis peruviana L.).* (DOCTORA DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS), Universidad NacionalFederico Villarreal, LIMA – PERÚ.

Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M. É., & Miralles, S. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 43*(1), 237-245.

Anchatuña, M., & Enrique, L. (2014). *Formulación de un gel cosmecéutico antiacné a base de extracto de flores de caléndula (Caléndula officinalis) y propóleo.*

Bedoya Castaño, S. (2019). Reformulación de una pasta cerámica de materiales tipo aventino como plan de contingencia en caso de escasez de la materia prima.

Cabrales, R. A. *CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE DOS CANDIDATOS TERAPÉUTICOS PEPTÍDICOS EN PLASMA HUMANO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS: APLICACIÓN A ESTUDIOS DE FARMACOCINÉTICA.* (Doctor en Ciencias Farmacéuticas), Universidad de La Habana, La Habana.

Castillo, F. M. (2016). *Nuevo método de obtención del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna Heberbiovac HB ®.* (Doctor en Ciencias Farmacéuticas), UNIVERSIDAD DE LA HABANA, LA HABANA.

ECOCERT. (Mayo de 2012). NORMA QUE DEFINENLOS PRODUCTOS COSMÉTICOS ORGANICOS Y NATURALES. *Versión 2*. Obtenido de http://www.ecocert.com/sites/default/files/u3/Norma-Ecocert.pdf . L'ISLE-JOURDAIN -FRANCIA.

Fraguela Collar, A. (2002). *Analisis Matem´ atico Avanzado* (P. y. Educaci´on Ed.). Cuba.

García-Córdoba, F. (2005). *La investigación tecnológica: Investigar,idear e innovar en ingenierías y ciencias sociales* (Limusa ed.). México.

García, S. J. (2016). *DISEÑO DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL POLIPÉPTIDO ANTITUMORAL RECOMBINANTE P25 EXPRESADO EN ESCHERICHIA COLI.* (Doctor en Ciencias Farmacéuticas), UNIVERSIDAD DE LA HABANA, LA HABANA.

Humberto, G. P., & Román, d. l. V. S. (2008). *ANÁLISIS Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS* (Segunda ed.). México, D.F.

Mesa, P. J. M., Brossard, P. L. E., Guerrero, H. J. R., & Henry, I. E. (1998). Estrategia de utilización del diseño de experimentos. *TECNOLOGÍA QUÍMICA, 18*, 11.

Rispoli†, F., & Vishal Shah*. (2008). Optimization of the Media Ingredients for Cutinase Production from Colleotrichum lindemuthianum Using Mixture Design Experiments. *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers, 24*, 7. doi: 10.1021/bp070280n

Rodríguez, K. G., Ruiz, J. M., Salcedo, M. C., Jiménez, A. S., & Mckinley, J. R. (2020). Aplicación del Criterio D-Óptimo a la Fabricación del Bloque Samo# 4 para Proponer una Mezcla Bajo Estándares NTC4205-1. *Scientia et Technica, 25*(1), 45-64.

Siverio, M. D. (2014). *NUEVA ESTRATEGIA DE TAMIZAJE FARMACOLÓGICO PARA EL DESCUBRIMIENTO DE POTENCIALES FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS INTEGRANDO MODELOS IN SILICO E IN VIVO.* (Doctor en Ciencias Farmacéuticas), UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS, LAS VILLAS.