



PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO, ESTIMACIÓN DE EFICACIA EN MEZCLAS CONSERVANTES PARA FORMULACIONES COSMÉTICAS NATURALES Y ORGÁNICAS

Autores: Roberto Diéguez Rodríguez¹, Quirino Arias Cedeño², Maikel Diéguez Rodríguez³, Mijail Mijares Bullaín Galardis⁴

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 aplica un procedimiento para la implementación del control estadístico utilizando el sistema computacional Statistica 10.0 General AOV/AOCU con la herramienta estadística ANOVA anidada. Se realizó esta investigación con el objetivo estimar la diferencia entre los promedios de varios subgrupos cada uno localizado dentro de un grupo; donde la predicción de la actividad antimicrobiana posee valores de $(\log x = 0)$ y tiene una Equivalencia Numérica según estándar ISO 11930:2012 de 1000; y un Criterio de aceptación de eficacia preservante de A que es el máximo. Como investigación del Centro de Estudio Química Aplicada (CEQA) de la Universidad de Granma se expone el análisis de una mezcla de aceites de *Curcuma longa* y *Luffa cylindrica* en medio acuoso, donde para la extracción de aceite esencial *Curcuma longa* se utilizaron los siguientes equipos hidrodestilación (con agua y vapor) y un rotaevaporador; y para el aceite *Luffa cylindrica* equipo de Soxhlet. Se estimó que la mayor actividad antimicrobiana se logra en la combinación donde los componente poseen los siguientes valores: aceite esencial *Curcuma longa* 0.833333, aceite *Luffa cylindrica* 0.833333, agua 78.2333.

Palabras clave: Statistica; Análisis estadístico; ANOVA; conservante; Cosmético natural y orgánico.

INTRODUCCIÓN

La adición de conservantes en productos farmacéuticos y cosméticos es esencial para evitar la alteración y degradación por microorganismos durante su almacenamiento, además ayudan a proteger el producto contra la contaminación accidental por parte del consumidor durante su uso, siendo los conservantes sintéticos los más empleados. Sin embargo en los últimos años se ha incrementado el interés investigativo de varias especies vegetales debido a su alto contenido de agentes antimicrobianos tales como polifenoles(1).

La determinación de las condiciones óptimas se realiza con la utilización o no de modelos matemáticos, pudiendo estos últimos ser empírico o fenomenológicos. La utilización de uno u otro dependerá en gran medida del conocimiento teórico que se tenga del problema, los recursos económicos disponibles y el avance de las ciencias matemáticas y computacionales(2).

La primera vez que se aplicó estadística a la experimentación fue en 1920, cuando Ronald A. Fisher fue contratado en Rothamsted Experimental Station para realizar un minucioso análisis estadístico a los datos recolectados de las investigaciones en plantaciones de trigo. En este período Fisher desarrolló el análisis de varianza y el diseño factorial (3).

El análisis de la varianza (ANOVA, ANalysisOfVAriance, según la terminología inglesa) es uno de los aspectos más interesantes dentro del tema de las pruebas de hipótesis. Para ello, se calcula la varianza de las medias de los grupos, que permite analizar la variación en una variable de respuesta (variable continua aleatoria) medida en circunstancias definidas por factores discretos (variables de clasificación)(4).

Una extensión del análisis de varianza de una vía es el Análisis de Varianza Anidado (ANOVA anidada) cuando se tiene una variable de medición y dos o más variables nominales. Se divide cada grupo en subgrupos. En teoría, estos subgrupos se eligen al azar de un conjunto más amplio posible de los subgrupos. Un ANOVA anidada, tiene una hipótesis nula para cada nivel; en la misma, una hipótesis nula sería que los subgrupos dentro de cada grupo tienen promedios iguales, la segunda hipótesis nula sería que los grupos tienen las mismas medias(5).

La optimización de respuesta múltiple implica determinar un punto en la región experimental, en el cual las variables de respuestas presentan algunas características

deseadas, particularmente próximas a un valor específico y con varianza pequeña. En esto consiste la optimización de respuesta múltiple, donde todas las respuestas se consideran simultáneamente y es improbable que alcancen el óptimo en el mismo punto(6).

Las formulaciones que se proponen se ajustan a especificaciones, pero cualquier variación del valor nominal que se tiene como objetivo puede provocar rechazos o interacciones, bucles, lo largo del proceso.

La mayoría de las formulaciones cosméticas, debido a que contienen un elevado porcentaje de agua y a que muchas de las sustancias utilizadas en su fabricación pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos, son productos que se deterioran con el paso del tiempo. La presencia de microorganismos en los productos cosméticos puede producir cambios en el aspecto físico, color, olor y textura. En estas ocasiones, cuando el consumidor detecta signos visibles de alteración, reacciona rechazando el producto(7).

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el desarrollo de formulaciones cosméticas libres de los conservantes tradicionales químicos. Se pueden fabricar productos cosméticos sin conservantes y seguros microbiológicamente cuando sus condiciones de producción sean estériles y generalmente empacadas bajo la modalidad de monodosis. Sin embargo, bajo éste enfoque, no puede ser elaborados la mayoría de cosméticos, ya que son comercializados en envases para ser utilizados varias veces.

Por esta razón, el objetivo de esta investigación es diseñar un procedimiento, que tiene como finalidad, estimar estadísticamente la mejor combinación de aceite esencial de *Curcuma longa* y aceite *Luffa cylindrica*, en la que es más eficaz como conservante frente a los microorganismos ATCC indicados en el estándar internacional ISO 11930:2012, para lo cual se aplicará la herramienta estadística Anova Anidada seguido del Test Tukey Honestly Significant Difference (HSD).

MÉTODOS

El **material vegetal** seleccionado en el experimento se tuvo en cuenta las plantas *Cúrcuma longa L.* y *Luffa Cylíndrica L.*, atendiendo además se consideró la disponibilidad de estas plantas en la flora de nuestra localidad y estudios realizados que demuestran de su actividad antimicrobiana(8).

Taxonomía: Según desde el punto de vista botánico la curcuma se clasifica de la siguiente manera. Reino: *Plantea*; División: *Magnoliophyta*; Clase: *Liliopsida*; Subclase: *Zingiberidae*; Orden: *Zingiberales*; Familia: *Zingiberaceae*; Género: *Curcuma*; Especie: *Curcuma longa* L. Bibliografía Ficha técnica Catasu Guerra(9).

Taxonomía: Especie propagada en Cuba de forma silvestre. Se reportan 2 especie: *Luffa cylindrica* L. Roem y *Luffa acutángula* L Roxb. Reino: *Plantea*; División: *Magnoliophyta* (planta con flores); Clase: *Manoliopsida* (dicotiledóneas); Subclase: *Dilleniidae*; Orden: *Violales*; Familia: *Cucurbitaceae*; Género: *Luffa*. Establecido por Adanson; Especie: *Luffa cylindrica* L. Bibliografía Ficha técnica Catasu Guerra(10).

El material vegetal recolectado, 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.

Para la extracción del aceite esencial, de la *Cúrcuma longa* L. el método seleccionado fue el arrastre con vapor por el procedimiento descrito en la NRSP 311 del MINSAP donde se emplearon los siguientes equipos un Clavenger 97 constituido por un hidrodestilador y un condensador simple y se utilizó agua como líquido refrigerante haciendo uso de un recirculador modelo MLW fabricado en Alemania; mientras para la *Luffa Cylindrica* L, se utilizó la extracción con soxhlet empleando el n-heptano como solvente.

Metodología para conocer el análisis de varianza (ANOVA).

Según (11) el *análisis de varianza* (ANOVA) es la técnica central en el análisis de datos experimentales. La idea general de esta técnica es separar la variación total en las partes con las que contribuye cada fuente de variación en el experimento. En el caso del *diseño completamente al azar* (DCA) se separan la variabilidad debida a los tratamientos y la debida al error.

El ANOVA es útil cuando hay más de dos grupos que necesitan ser comparados, cuando hay mediciones repetidas en más de dos ocasiones, cuando los sujetos pueden variar en una o más de dos ocasiones, cuando los sujetos pueden variar en una o más características que afectan el resultado y se necesita ajustar su efecto o cuando se desea analizar simultáneamente el efecto de dos o más tratamientos diferentes(12).

La forma más simple es el llamado ANOVA de una vía o factor, cuando existe una sola variable independiente para clasificar a los sujetos y dos o más niveles (que definen los grupos) de ella. Las otras formas de ANOVA (de 2 o más factores o de medidas repetidas) son extensiones basadas en el mismo raciocinio(12).

Muchas veces se desea estudiar el efecto simultáneo de dos o más variables o factores. Cuando son dos los factores, (**ANOVA de 2 vías**). La varianza total en este caso también se divide en varianza ENTRE los grupos y la varianza DENTRO o residual. Sin embargo, la varianza DENTRO se parte en dos para dar cuenta del efecto separado o combinado de los factores independientes(12).

El trabajo se realizó mediante un "*análisis estadístico de diseños anidado*" que se utiliza cuando posee dos o más factores: Se dice que el factor *B* esta anidado en el factor *A* significa que los niveles del factor *B* no son los mismos en cada nivel del factor *A*. Es decir, hay una especie de relación *padre-hijo* entre los niveles del factor *A* (*padres*) y los niveles del factor *B* (*hijos*)(13).

1. Hay un solo factor, el cual no se encuentra anidado con ningún otro factor, sea este F_1 , que representa la primera jerarquía entre todos los factores que existen.
2. Existe un segundo factor F_2 , el cual se encuentra dentro de F_1 . Diremos F_2 es el factor que representa la segunda jerarquía entre todos los factores que existen.
3. El próximo factor en caso que exista (F_3), debe encontrarse anidado dentro del factor F_2 . Diremos F_3 es el factor que representa la tercera jerarquía entre todos los factores que existen.

En este sentido, los diseños anidados también se conocen como *diseños jerárquicos* "NESTED"(13).

En un ANOVA anidado de dos niveles mixto, los variatos pueden ser descompuestos en:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y en un ANOVA anidado de dos niveles modelo II, los variatos se descomponen en:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

α_i es un efecto fijo del tratamiento y A_i es una contribución aleatoria de variancia.

El *método de Tukey*, es conservador para comparar pares de medias de tratamientos, consiste en comparar las diferencias entre medias muestrales con el valor crítico dado por:

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(k, N - K)\sqrt{CM_E/n_i}$$

Donde CM_E es el cuadrado medio del error, n es el número de observaciones por tratamiento, k es el número de tratamientos, $N - k$ es igual a los grados de libertad para el error, α es el nivel de significancia prefijado y el estadístico $q_{\alpha}(k, N - k)$ son puntos porcentuales de la distribución del rango estudentizado, que se obtienen de la correspondiente tabla en el apéndice. Se declaran significativamente diferentes los pares de medias cuya diferencia muestral en valor absoluto sea mayor que T_{α} . A diferencia de los métodos LSD y Duncan, el método de Tukey trabaja con un error α muy cercano al declarado por el experimentador(11).

El MODELO ANOVA ANIDADO "NESTED" Y TEST DE TUKEY (HSD): buscan determinar diferencias entre medias de dos a más grupos (bloques), pero al mismo tiempo detectar si existen diferencias entre los datos debidas a algún tipo o tipos de factores que afecten interiormente a cada grupo (tratamientos). Estos valores son corroborados mediante un test a *posteriori* para la discriminación de cual o cuales grupos de datos son diferentes entre sí. El Test de Tukey (HSD) es el más utilizado para este análisis.

Para el análisis estadístico se importaron los resultados de los criterios de aceptación de la eficacia preservante del estándar internacional ISO 11930:2012, obtenidos de cada una de las concentraciones de los aceites a los microorganismos ATCC utilizados(1).

Adicionalmente se realizó una equivalencia de los criterios de aceptación de la eficacia preservante de una denominación alfabética a códigos numéricos, y de igual manera a los microorganismos ATCC utilizados se les asignó una denominación numérica, ya que es necesario para realizar el análisis estadístico en el programa estadístico valores del tipo numérico.

La Norma Internacional ISO 11930 reglamenta equivalencia numérica tanto para los criterios de aceptación de la eficacia preservante como para los microorganismos ATCC se hace referencias en los (Puntos 1 y 2).

1- Equivalencias numéricas para los criterios de aceptación de la eficacia preservante del estándar ISO 11930.

1.1- Criterio de aceptación de la eficacia preservante "A"; tiene una Equivalencia numérica "1000".

1.2- Criterio de aceptación de la eficacia preservante "B"; tiene una Equivalencia numérica "100".

1.3- Criterio de aceptación de la eficacia preservante "C"; tiene una Equivalencia numérica "10".

2- Equivalencias numéricas para los microorganismos ATCC estandarizados del estándar ISO 11930.

2.1- Microorganismo ATCC (*Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027); tiene una Equivalencia numérica "1".

2.2- Microorganismo ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538); tiene una Equivalencia numérica "2".

2.3- Microorganismo ATCC (*Escherichia coli* ATCC 8739); tiene una Equivalencia numérica "3".

2.4- Microorganismo ATCC (*Candida albicans* ATCC 10231); tiene una Equivalencia numérica "4".

2.5- Microorganismo ATCC (*Aspergillus niger*); tiene una Equivalencia numérica "5".

Software utilizado

- Programa Statistica 10.0 General AOV/ AOCV
- Programa Statistica 10.0 Tukey HSD All- Pairwise Comparisons Test.

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 cálculo de la reducción logarítmica se realiza utilizando la siguiente fórmula:

Ecuación #..... Cálculo de reducción logarítmica.

Red Log= Log [No] – Log [Nx]

Siendo:

No: número de microorganismos inoculados al To.

Nx: número de microorganismos supervivientes en cada tiempo de muestreo establecido.

Además, el estándar internacional ISO 11930:2012, proporciona los siguientes criterios para la evaluación de la eficacia del sistema de preservación(1):

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*.

Si al final de la prueba la muestra es de conformidad con el:

Criterio A: el riesgo microbiológico es aceptable. El producto cosmético se considera protegido contra la proliferación microbiana y no es necesario considerar otros factores que sean independientes de la formulación.

Criterio B: el riesgo microbiológico es aceptable, por lo que el nivel de protección es aceptable, si el análisis de riesgos demuestra la existencia de factores de control no relacionados con la formulación, tales como las características del embalaje, para reducir el riesgo microbiológico.

En la siguiente tabla se resume lo anteriormente descrito:

Tabla 1 criterio de aceptación de la eficacia preservante estándar internacional ISO 11930:2012

CRITERIO	MICROORGANISMO	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA ($R_x = \log N_0 - \log N_x$) requerida ^a		
		7 días	14 días	28 días
A	Bacterias	≥ 3	≥ 3 y NI ^b	≥ 3 y NI ^b
	<i>Candida albicans</i>	≥ 1	≥ 1 y NI ^b	≥ 1 y NI ^b
	<i>Aspergillus niger</i>	NI ^a	NI ^a	≥ 1 y NI ^b
B	Bacterias	No aplica	> 3	≥ 3 y NI ^b
	<i>Candida albicans</i>	No aplica	≥ 1	NI ^b
	<i>Aspergillus niger</i>	No aplica	NI ^a	NI ^a

Rx: Reducción logarítmica.

a: No se produce incremento en el recuento microbiano desde el momento de la inoculación al To.

b: No se produce incremento en el recuento microbiano con respecto al resultado anterior.

Si al final del estudio, la muestra no cumple ni el Criterio **A** ni el Criterio **B**, es indicativo de que el nivel de protección es no aceptable y el riesgo microbiológico es alto, por lo que, la evaluación microbiana se toma en cuenta considerando exclusivamente la estimación del riesgo microbiológico, por ejemplo si el producto será de una sola dosis y controlando de manera especial que la calidad microbiológica del producto esté garantizado mediante una adecuada producción con estricto cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. A este caso particular cuando no cumplan ninguno de los dos criterios, se le denominará exclusivamente para fines del análisis estadístico como criterio **C**.

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 Anexo 1(14).

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 porcentos 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.

Concentraciones de aceites de Curcuma longa(%) Luffa cylindrica(%)	Equivalencias Numéricas
Curcuma(%) = 2.5 Luffa(%) = 0	1
Curcuma(%) = 0 Luffa(%) = 2.5	2
Cur(%) = 0.0 Luff(%) = 0.0	3
Cur(%) = 0.833333 Luff(%) = 1.66667	4
Cur(%) = 1.66667 Luff(%) = 0.833333	5
Cur(%) = 0.833333 Luff(%) = 0.833333	6
Cur(%) = 0.833333 Luff(%) = 0.833333	7
Cur(%) = 0.0 Luff(%) = 0.833333	8
Cur(%) = 0.416667 Luff(%) = 1.66667	9
Cur(%) = 1.66667 Luff(%) = 0.0	10
Cur(%) = 1.66667 Luff(%) = 0.416667	11
Cur(%) = 0.0 Luff(%) = 1.66667	12
Cur(%) = 0.833333 Luff(%) = 0.0	13
Cur(%) = 0.416667 Luff(%) = 0.416667	14

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 inicial (T_0) del experimento, se indica a continuación.

Staphylococcus aureus (ATCC 29737) = $\log(1.78 \times 10^6) = 6.25$

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) = $\log(1.64 \times 10^6) = 6.22$

Escherichia coli (ATCC 25922) = $\log(1.82 \times 10^6) = 6.26$

Candida albicans (ATCC 10231) = $\log(4.41 \times 10^5) = 5.64$

Aspergillus niger = $\log(1.23 \times 10^5) = 5.09$

Tiempo final (T_f) = 30 días

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

Tabla 3 Resultado de la actividad antimicrobiana

	COMPONENTES DE LA MEZCLA PRESERVANTE			SA	PA	EC	CA	AN
	Aceite esencial	aceite	agua	$T_0:\log x=6.25$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=6.22$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=6.26$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=5.64$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=5.09$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$
1	2.5	0	77.4	0	2.99	3	2	1.99
2	0	2.5	77.4	3	0	0	2.5	2.1
3	0	0	79.9	6.25	6.22	6.26	5.64	5.09
4	0.833333	1.66667	77.4	1	0	0	1.5	1
5	1.66667	0.833333	77.4	0	1.5	1	1	1
6	0.833333	0.833333	78.2333	0	0	0	0	0

	COMPONENTES DE LA MEZCLA PRESERVANTE			SA	PA	EC	CA	AN
	Aceite esencial	aceite	agua	$T_0:\log x=6.25$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=6.22$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=6.26$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=5.64$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$	$T_0:\log x=5.09$ $T_f= 30$ días Dónde: $\log x=0$
7	0.833333	0.833333	78.2333	0	0	0	0	0
8	0.0	0.833333	79.0667	6.25	2.99	3	3.5	3
9	0.416667	1.66667	77.8167	2	0	0	2.5	2
10	1.66667	0.0	78.2333	1	6.22	6.26	3	2.99
11	1.66667	0.416667	77.8167	0	2.5	2	1.5	1.5
12	0.0	1.66667	78.2333	6.25	1	1	4	3.5
13	0.833333	0.0	79.0667	3	6.22	6.26	3.5	3
14	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 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 ($\log x = 0$).

Los datos utilizados para el estudio estadístico mediante análisis de varianza ANOVA ANIDADO "NESTED" y test de Tukey (HSD), se muestran a continuación, al igual que las equivalencias numéricas de la concentración de aceites asociada a los componentes de la mezcla preservante de la tabla 3 para cada corrida, indicadas tanto para los criterios de aceptación de la eficacia conservante, como para los microorganismos ATCC utilizados que referenciaron anteriormente en los (Puntos 1 y 2):

Tabla 4 datos utilizados para el análisis estadístico

Corrida	CEPA ATCC	CEPAS	EQUIVALENCIA NUMÉRICA PARA LA CONCENTRACIÓN DE ACEITES DE <i>Curcuma longa</i> (%) <i>Luffa cylindrica</i> (%)							CRITERIO							EQUIVALENCIA NUMÉRICA DE CRITERIO DE ACEPTACIÓN SEGÚN ESTÁNDAR ISO 11930:2012						
			I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII
SA	1	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	B	A	A	A	1000	100	10	100	1000	1000	1000	
PA	2	1	2	3	4	5	6	7	B	A	C	A	B	A	A	100	1000	10	1000	100	1000	1000	
EC	3	1	2	3	4	5	6	7	B	A	C	A	B	A	A	100	1000	10	1000	100	1000	1000	
CA	4	1	2	3	4	5	6	7	B	B	C	B	B	A	A	100	100	10	100	100	1000	1000	
AN	5	1	2	3	4	5	6	7	B	B	C	B	B	A	A	100	100	10	100	100	1000	1000	

Corrida	CEPA ATCC	CEPAS	EQUIVALENCIA NUMÉRICA PARA LA CONCENTRACIÓN DE ACEITES DE <i>Curcuma longa</i> (%) <i>Luffa cylindrica</i> (%)							CRITERIO							EQUIVALENCIA NUMÉRICA DE CRITERIO DE ACEPTACIÓN SEGÚN ESTÁNDAR ISO 11930:2012						
			VIII	IX	X	XI	XII	XIII	IVX	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	IVX	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	IVX
SA	1	8	9	10	11	12	13	14	C	B	B	A	C	B	B	10	100	100	1000	10	100	100	
PA	2	8	9	10	11	12	13	14	B	A	C	B	B	C	B	100	1000	10	100	100	10	100	
EC	3	8	9	10	11	12	13	14	B	A	C	B	B	C	B	100	1000	10	100	100	10	100	
CA	4	8	9	10	11	12	13	14	B	B	B	B	B	B	B	100	100	100	100	100	100	100	
AN	5	8	9	10	11	12	13	14	B	B	B	B	B	B	B	100	100	100	100	100	100	100	

Los resultados presentados en las siguientes tablas se obtienen de la aplicación de las pruebas estadísticas establecidas.

Tabla 5 resultados del análisis de varianza anova anidado "nested" de los criterios de aceptación según estándar iso 11930:2012 del aceite esencial de *curcuma longa* y aceite *luffa cylindrica* frente a las 14 combinaciones de concentraciones establecidas: y a los microorganismos ATCC utilizados.

EFECTOS	Resultados del análisis de la descomposición efectiva de la hipótesis				
	Degr. of Freedom	Equivalencia numérica de criterio de aceptación según estándar ISO 11930-2012 SS	Equivalencia numérica de criterio de aceptación según estándar ISO 11930-2012 MS	Equivalencia numérica de criterio de aceptación según estándar ISO 11930-2012 F	Equivalencia numérica de criterio de aceptación según estándar ISO 11930-2012 P
Intercepto	1	3082604	3082604	37.80930	0.000000
CEPAS ATCC	1	408240	408240	5.00723	0.029312
Concentración de aceites de C longa (%) L cylindrica (%)	13	6879099	529161	6.49037	0.000000
Error	55	4484160	81530		
Total	69	11771499			

DISCUSIÓN

El análisis estadístico ANOVA anidado, proporcionó como resultado que existe diferencia entre las concentraciones de aceite esencial de *Curcuma longa* y aceite *Luffa cylindrica* ensayadas y los microorganismos utilizados frente a los criterios establecidos en estándar ISO 11930:2012. Para poder discriminar cuál es la diferencia entre las concentraciones utilizadas de aceite esencial de *Curcuma longa* y aceite *Luffa cylindrica*, a fin de determinar cuál la combinación de concentraciones más efectiva como conservante frente a los criterios establecidos en el estándar internacional ISO 11930:2012, se realizó el Test de Tukey, el cual se indica a continuación:

El test evidenció que las combinaciones de concentración número 6 y 7 son las más efectivas como conservante para todos los microorganismo ATCC utilizados.

Adicional, se compara los criterios establecidos en estándar internacional ISO 11930:2012 para cada una de las cepas mediante el Test de Tukey, indicados en la siguiente figura:

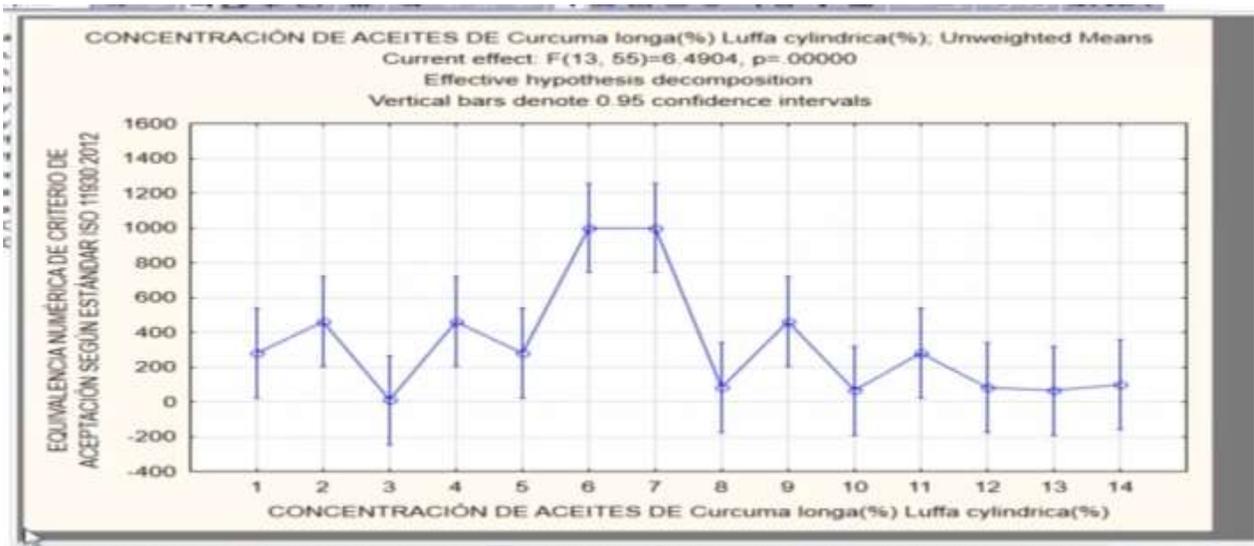


Figura 2 resultados del test de tukey de los criterios de aceptación de eficacia microbiana frente a los microorganismos ATCC utilizados.

Se evidencio que las combinación de concentraciones 6 y 7 son la que tiene mayor eficacia conservante frente a cada una de las cinco cepas utilizadas del estándar internacional ISO 11930:2012, como son: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027,

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger*.

CONCLUSIONES

- Se fundamenta la necesidad e importancia de implementar un procedimiento para estimar la eficacia estadística de combinaciones de mezclas naturales para su uso como preservante en una formulación cosmética natural y orgánica.
- La técnica de ANOVA anidada se puede utilizar para las situaciones de la presencia de los subgrupos dentro de los grupos, con el objetivo de determinar la diferencia estadística entre los promedios tanto de sub-grupos como de los grupos. Esta técnica tiene la ventaja de ahorrar el esfuerzo, ya que en lugar de realizar varios ANOVA's, el investigador se puede llegar a conclusiones deseadas realizando solamente un análisis de varianza denominado ANOVA anidado.
- En el caso estudiado 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) y esto tiene con una equivalencia numérica según estándar ISO 11930:2012 de 1000 y un Criterio de aceptación de eficacia preservante A que es el máximo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Cabrera García CE. Desarrollo de un sistema conservante con base de un extracto natural y tres aceites esenciales en la formulación de emulsiones cosméticas [Optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2020.
2. Dieguez Rodríguez R, Arias Cedeño Q, Dieguez Rodríguez M, Bullaín Galardis MM. Optimización mediante un diseño experimental de mezclas para conservar una formulación cosmética natural y orgánica. Revista Granmense de Desarrollo Local REDEL. 2021;Vol. 5 No4 (2021) octubre-diciembre:15.
3. Rodríguez KG, Ruiz JM, Salcedo MC, Jménez AS, Mckinley JR. Aplicación del Criterio D-Óptimo a la Fabricación del Bloque Samo# 4 para Proponer una Mezcla Bajo Estándares NTC4205-1. Scientia et technica. 2020;25(1):45-64.
4. Castro Veloz EJ. Evaluación de las tendencias de la contaminación del recurso hídrico de la parte media de la microcuenca del Río Cutuchi, en la provincia de Cotopaxi, periodo 2019-2020 [Obtención del Título de Ingeniera en Medio Ambiente]. LATACUNGA- ECUADOR: Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi UTC; 2020.

5. Álvarez Delgadillo A. Caracterización morfológica, genética y antidiabética de tres especies de plantas medicinales en el estado de Hidalgo, México [Doctorado en Ciencia en Biodiversidad y Conservación]. Hidalgo México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2019.
6. GONZALEZ CASIQUE C. Análisis de diseño de experimentos con respuesta múltiple que mejore las oportunidades de innovación [Maestría en Ingeniería Industrial]. Celaya México: Tecnológico nacional de México en Celaya; 2019.
7. Zurita Acosta N, López Pérez AM. Elaboración de Emulsiones Cosméticas con Ingredientes de Origen Natural. 2021.
8. Diéguez Rodríguez R. Diseño experimental de un conservante natural para formulaciones cosméticas orgánicas [Máster en Química Biológica]. Granma, Cuba: Universidad de Granma; 2021.
9. Catasús Guerra LJ. Ficha técnica: *Curcuma longa* L. In: Cupaynicú JB, editor. Guisa, Granma2019. p. 2.
10. Catasús Guerra LJ. Ficha técnica: *Luffa cylindrica* (L) M.Roem. In: Cupaynicú JB, editor. Guisa, Granma2019. p. 2.
11. Gutiérrez PH, delaVara SR. Análisis y diseño de experimentos. Segunda ed. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES SAdCV, editor. México, D.F.2008.
12. Dagnino S J. Análisis de varianza, Bioestadística y Epidemiología. Rev Chil Anest. 2014;43:5 (306-10).
13. Kuehl RO. Diseño de experimentos Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Segunda edición ed. México: México; 2001 Febrero. 679 p.
14. ECOCERT. Norma que definen los productos cosméticos orgánicos y naturales. L'ISLE-JOURDAIN -FRANCIA2003. p. 39.

Anexos

Anexo 1.

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

#	INGREDIENTES INCI	(%)	CANTIDAD para 750ml	FUNCIÓN/ COMPONENTE	ORIGEN DEL INGREDIENTE
FASE GRASA (FUNCIÓN)					
1	<i>Theobroma cacao</i> seed butter	12	90	Emoliente/Triglicerido-Manteca Vegetal	Natural, procedencia vegetal, con certificación orgánica.
2	Aceite de Coco	3	22.5	Emoliente/Triglicerido	De origen natural
EMULSIFICANTES (FUNCIÓN)					
3	Sorbitol	5	37.5	Emulsificante/No iónico	De origen natural
FASE ACUOSA (FUNCIÓN)					

4	Xanthan Gum	0.1	0.75	Espesante, Controlador de viscosidad	De origen natural
5	Aqua	77.4	580.5	Solvente	Origen natural
ADITIVOS (FUNCIÓN)					
6	<i>Curcuma longa</i> <i>Luffa cylindrical</i>	2.5 Máxima cantidad de la mezcla de aceite esencial y aceite vegetal de nuestra localidad	18.75	Preservante	Origen natural, categoría vegetal, con certificación orgánica.
	TOTAL	100	750		