

**DISEÑO DE UN PRODUCTO ANTIBACTERIAL PARA SUPERFICIES
PROCEDENTE DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Drimys granadensis* L.f
A NIVEL LABORATORIO**

**DANIELA CUERVO SALCEDO
JULIÁN ALEXANDER VANEGAS CAMPOS**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C**

2017

**DISEÑO DE UN PRODUCTO ANTIBACTERIAL PARA SUPERFICIES
PROCEDENTE DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Drimys granadensis* L.f
A NIVEL LABORATORIO**

**DANIELA CUERVO SALCEDO
JULIÁN ALEXANDER VANEGAS CAMPOS**

**Proyecto integral de grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

Director

**DIANA CAROLINA CORZO BARRAGAN
Ingeniera Agroindustrial**

Codirector

**FELIPE CORREA MAHECHA
Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C**

2017

Nota de aceptación

Elizabeth Torres
ORIENTADOR

Fernando Moreno
JURADO 1

Diana Morales
JURADO 2

Bogotá, D.C. Agosto de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro.

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos.

Dr. Luis Jaime Posada García Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados.

Ing. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García Peña

Decano Facultad de Ingeniería Química

Dr. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la universidad de América, Los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

Dedicado a:

*Dios... Por bendecirme, protegerme y guiar todos mis pasos durante la carrera.
Mi madre Aleyda Salcedo. A ti te debo todo lo bueno que hay en mí. Gracias por tu amor infinito. TE AMO.
Mi padre Luis Mario Cuervo. Por tus consejos y apoyo incondicional.
Mi hermana Isabella Cuervo. Por ser esa luz que le da alegría a mi vida.
Mi abuela Xiomara Briceño. Quien me enseñó el valor de la resiliencia en mi vida.
Mis abuelos: Mario Cuervo y Clara Villafañe...Por que juntos me han motivado a salir adelante.
Toda mi familia. Por apoyarme siempre en cualquier circunstancia.
Mis amigos y compañeros de estudio. Por las risas y los gratos momentos.*

Este trabajo lo dedico a cada una de las personas que durante mi carrera profesional aportaron algo en mi vida.

Gracias totales...

Daniela Cuervo Salcedo.

El presente trabajo lo dedico Dios, porque fue quien me guio durante esta etapa y me dio fuerzas para afrontar todas las adversidades.
A mis Padres Rafael Vanegas y Nubia Campos, por todo el apoyo que me han brindado, por su gran esfuerzo y el amor incondicional que siempre me ofrecen.
A mi hermano y a mi sobrino que siempre han sido una motivación en mi vida.
Por ultimo a Nataly Morales, gracias por tus consejos, comprensión y apoyo total durante todo este tiempo.

Gracias, este trabajo es para ustedes, los Amo...

Julián Vanegas Campos

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial a la Subdirección científica del Jardín Botánico de Bogotá *José Celestino Mutis*, pues dentro de sus instalaciones nos permitieron ejecutar este proyecto y se proporcionaron los equipos y materiales adecuados para su correcto desarrollo en todo momento. A nuestra directora, Diana Carolina Corzo, por guiar la metodología, ejecución y desarrollo del proyecto, y por toda su colaboración prestada. A la microbióloga Martha Liliana Pinzón, por toda su orientación en las pruebas con bacterias. A Ricardo Pacheco por su motivación y abrirnos las puertas en el grupo de investigación.

A Erika Andrea Plazas por su colaboración en el comienzo del proyecto y su guía metodológica en la fase de fraccionamiento. A Vanessa Penagos por proveer parte del material necesario en las pruebas de laboratorio. A David Castrillón por su colaboración en la imagen y el diseño visual del producto.

A la Fundación Universidad de América le agradecemos por la oportunidad que nos brindó de cursar nuestra carrera profesional. De manera especial, agradecemos al ingeniero Felipe Correa por el apoyo total ofrecido y su alto nivel de compromiso con el desarrollo de todo el proyecto. Para finalizar, agradecemos inmensamente a la ingeniera Elizabeth Torres por su orientación y sus observaciones, las cuales fueron esenciales para la adecuada realización de este documento.

Contenido

	pág.
INTRODUCCIÓN	28
1. MARCO TEÓRICO	30
1.1 BIOPROSPECCIÓN	30
1.2 FAMILIA <i>Winteraceae</i>	31
1.3 <i>Drimys granadensis</i> L.f	32
1.3.1 Usos.	34
1.3.2 Metabolitos secundarios.	34
1.4 DESINFECTANTES	36
1.4.1 Clases de desinfectantes.	36
1.4.3 Factores que influyen en la eficiencia de desinfección.	37
1.5 BACTERIAS GRAM POSITIVAS	38
1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .	39
1.5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	40
1.6 BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	41
1.6.1 <i>Escherichia coli</i> .	41
1.6.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	42
1.7 DISEÑO DE PRODUCTO	43
1.7.1 Concepción de la idea.	43
1.7.2 Formulación y manufactura del producto.	45
2. METODOLOGÍA	47
2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	49
2.1.1 Recolección y adecuación de material vegetal.	49
2.1.2 Maceración en frío.	49
2.2 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO	51
2.3 PRUEBAS ANTIBACTERIANAS	51
2.3.1 Aislamiento de las bacterias.	52
2.3.2 Determinación de la CMI.	52
2.4 MARCHA FITOQUÍMICA	54
2.4.1 Flavonoides.	57
2.4.2 Taninos	58
2.4.3 Saponinas.	59
2.4.4 Alcaloides.	60
2.4.5 Cardiotónicos.	61
2.4.6. Quinonas.	62
2.5 FORMULACIÓN DEL DESINFECTANTE	63
2.6 PRUEBA DE ESTABILIDAD A TIEMPO REAL	65

2.6.1 Pruebas organolépticas.	65
2.6.2 Pruebas comparativas <i>in vitro</i> .	66
2.6.3 Pruebas comparativas <i>in vivo</i> .	67
2.7 DISEÑO DE PROCESO Y COSTOS	68
3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN	69
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL	69
3.2. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	71
3.3. FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS	73
3.4 PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA	74
3.5 MARCHA FITOQUÍMICA	76
4. FORMULACIÓN DEL PRODUCTO Y ANÁLISIS	85
4.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO	85
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL: PRE-FORMULACIÓN	86
4.3 DESARROLLO DEL PRODUCTO A NIVEL LABORATORIO.	87
4.4 ESTABILIDAD DE PRE-FORMULACIONES	90
4.5 RESULTADO PRUEBAS COMPARATIVAS	94
4.5.1 Resultado prueba <i>in vitro</i> .	96
4.5.2 Resultado prueba <i>in vivo</i> .	98
4.6 PROPUESTA DE DISEÑO DEL PROCESO A NIVEL PILOTO	105
4.6.1. Descripción del producto.	105
4.6.2. Diagrama de bloques BFD.	107
4.6.3 Diagrama de proceso PFD.	108
5. COSTOS	122
5.1 EVALUACION FINANCIERA	123
6. CONCLUSIONES	131
7. RECOMENDACIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	134
ANEXOS	142

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Taxonomía de <i>Drimys granadensis</i>	32
Tabla 2. Diferencia de los metabolitos secundarios en <i>D. granadensis</i> .	35
Tabla 3. Espectros de actividad, sinergismos y antagonismos de desinfectantes	37
Tabla 4. Cepas bacterianas para evaluar poder inhibitorio.	51
Tabla 5. Influencia de pH y concentración de extracto en la formulación	64
Tabla 6. Superficies más comunes	68
Tabla 7. Peso recolectado según fecha de salida	70
Tabla 8. Características físicas de los extractos etanólicos.	71
Tabla 9. Peso de extracto crudo seco por cada fecha de recolección.	71
Tabla 10. Resultado de extracciones con diferentes proporciones.	71
Tabla 11. Diseño de experimentos para el rendimiento	71
Tabla 12. Tabla diferencia de promedios entre tratamientos.	73
Tabla 13. Rendimiento de extractos fraccionados en hojas	73
Tabla 14. Resultado de TLC placa 1.	77
Tabla 15. Resultados de TLC placa 2	77
Tabla 16. Resultados de TLC placa 3	78
Tabla 17. Resultados TLC placa 4	79
Tabla 18. Resultados TLC placa 5	79
Tabla 19. Comparación de metabolitos secundarios	83
Tabla 20. Pre-formulaciones para el diseño de experimentos.	86
Tabla 21. Formulación del diseño de experimentos	87
Tabla 22. Pre-formulación - Tratamiento 1.	88
Tabla 23. Pre-formulación – Tratamiento 2.	88
Tabla 24. Pre-formulación - Tratamiento 3.	88
Tabla 25. Resultados pruebas organolépticas	91
Tabla 26. Formulación del producto comercial 1.	95
Tabla 27. Medida de halos de inhibición.	96
Tabla 28. Resultado de halos de inhibición para los diferentes tratamientos.	97
Tabla 29. Resultados de prueba de superficies para el tratamiento 1.	99
Tabla 30. Resultados de prueba de superficies para el tratamiento 2.	99
Tabla 31. Resultados de prueba de superficies para el tratamiento 3.	100
Tabla 32. Resultados de prueba de superficies para la el producto comercial 1	100
Tabla 33. Resultados de prueba de superficies para el producto comercial 2.	101
Tabla 34. Resultados de prueba de superficies para el Blanco.	101
Tabla 35. Características principales del producto terminado.	107

Tabla 36. Balance de masa en el horno	110
Tabla 37. Balance de masa en el molino.	110
Tabla 38. Balance de masa en el tanque de maceración	111
Tabla 39. Balance de masa en el filtro de prensa.	111
Tabla 40. Balance de masa en el rotaevaporador	112
Tabla 41. Balance de masa en el secador.	112
Tabla 42. Balance de masa en el tanque de fraccionamiento de hexano.	113
Tabla 43. Balance de masa en el filtro de prensa (hexano).	113
Tabla 44. Balance de masa en el rotaevaporador (hexano)	114
Tabla 45. Balance de masa en el tanque de fraccionamiento de cloroformo.	114
Tabla 46. Balance de masa en el filtro de prensa (cloroformo).	115
Tabla 47. Balance de masa en el rotaevaporador (cloroformo).	115
Tabla 48. Balance de masa en el tanque de fraccionamiento de acetona.	116
Tabla 49. Balance de masa en el filtro de prensa (Acetona).	116
Tabla 50. Balance de masa en el rotaevaporador (acetona).	117
Tabla 51. Balance de masa en el secador (fracción)	117
Tabla 52. Balance de masa en el tanque pre-mezclado.	118
Tabla 53. Balance de masa en el tanque de mezcla principal.	119
Tabla 54. Balance global del proceso.	120
Tabla 55. Costo mensual de materias primas.	125
Tabla 56. Costo mensual de insumos.	125
Tabla 57. Costos mensuales de mano de obra.	126
Tabla 58. Costos mensuales de embalaje.	126
Tabla 59. Costos de inversión (equipos).	127
Tabla 60. Flujo general de fondos (pesos colombianos).	127
Tabla 61. Flujo de caja libre proyectado (pesos colombianos).	128
Tabla 62. Resumen de evaluación del proyecto.	128
Tabla 63. Tabla de amortización del crédito (pesos colombianos).	129
Tabla 64. Flujo de caja libre proyectado con financiación (pesos colombianos).	129
Tabla 65. Resumen de evaluación del proyecto con financiación.	129

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág.
Ilustración 1. Superficie abaxial de la hoja de <i>Drimys granadensis</i> .	33
Ilustración 2. Especie <i>Drimys granadensis</i> con sus flores y frutos.	33
Ilustración 3. Morfología de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Ilustración 4. Morfología de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	40
Ilustración 5. Morfología de <i>Escherichia coli</i> .	42
Ilustración 6. Morfología de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
Ilustración 7. Estructura de cajas para CMI.	53
Ilustración 8. Prueba de halo de inhibición	66
Ilustración 9. Hojas recolectadas y seleccionados	69
Ilustración 10. Proceso de maceración	70
Ilustración 11. Resultados de la prueba "MIC test".	75
Ilustración 12. Placa con revelador Cloruro férrico.	78
Ilustración 13. Placa sumergida en vainillina-ácido sulfúrico.	79
Ilustración 14. Resultado prueba Shinoda.	80
Ilustración 15. Resultado prueba Gelatina-sal.	80
Ilustración 16. Resultado prueba de Espuma	81
Ilustración 17. Resultado prueba Dragendorff.	81
Ilustración 18. Resultado prueba Baljet.	82
Ilustración 19. Resultado prueba de Reducción con Zn/HCl	82
Ilustración 20. Secuencia de mezclado.	89
Ilustración 21. Pre-formulaciones en el día cero.	90
Ilustración 22. Almacenamiento de pre-formulaciones en condiciones reales.	90
Ilustración 23. Resultado de halos de inhibición.	98
Ilustración 24. Placas con la tinción de Gram.	102
Ilustración 25. Tinción de gram en superficie 1.	103
Ilustración 26. Tinción de gram en superficie 2	103
Ilustración 27. Tinción de gram en superficie 3.	104
Ilustración 28. Recipiente para empacar el producto	106
Ilustración 29. Etiqueta del producto terminado.	106

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Lugares donde crecen especies nativas de la familia Winteraceae.	31
Figura 2. Compuestos volátiles representativos de <i>Drimys granadensis</i>	35
Figura 3. Esquema de la pared celular en una bacteria Gram positiva	39
Figura 4. Esquema de la pared celular en una bacteria Gram negativa.	41
Figura 5. Fases para el desarrollo del proyecto.	47
Figura 6. Esquema de Fase I	48
Figura 7. Proceso de extracciones sucesivas	50
Figura 8. Proceso de aislamiento por estría cruzada	52
Figura 9. Fases de cromatografía por capa fina (TLC)	54
Figura 10. Procedimiento cualitativo de flavonoides	57
Figura 11. Procedimiento cualitativo de Taninos	58
Figura 12. Procedimiento cualitativo de saponinas	59
Figura 13. Procedimiento cualitativo de alcaloides	60
Figura 14. Procedimiento cualitativo de cardiotónicos	61
Figura 15. Procedimiento cualitativo de quinonas	62
Figura 16. Proceso de manufactura del producto	64
Figura 17. Secuencia de mezclado con tiempos definidos.	89
Figura 18. Diagrama de bloques de proceso.	107
Figura 19. Diagrama PFD del proceso	109
Figura 20. Balance por equipo: Horno de secado.	110
Figura 21. Balance por equipo: Molino pulverizador.	110
Figura 22. Balance por equipo: Tanque de maceración.	111
Figura 23. Balance por equipo: Filtro de sólidos.	111
Figura 24. Balance por equipo: Rotaevaporador.	112
Figura 25. Balance por equipo: Secador.	112
Figura 26. Balance por equipo: Tanque de fraccionamiento (hexano).	113
Figura 27. Balance por equipo: Filtro de bolsa (hexano).	113
Figura 28. Balance por equipo: Rotaevaporador (hexano).	114
Figura 29. Balance por equipo: Tanque de fraccionamiento (cloroformo).	114
Figura 30. Balance por equipo: Filtro de bolsa (cloroformo).	115
Figura 31. Balance por equipo: Rotaevaporador (cloroformo).	115
Figura 32. Balance por equipo: Tanque de fraccionamiento (acetona).	116
Figura 33. Balance por equipo: Filtro de bolsa (acetona).	116
Figura 34. Balance por equipo: Rotaevaporador (acetona).	117
Figura 35. Balance por equipo: Secador de la fracción.	117

Figura 36. Balance por equipo: Tanque pre-mezclado.	118
Figura 37. Balance por equipo: Tanque mezclado principal	118
Figura 38. Balance global de proceso.	119
Figura 39. Tiempos de cada operación por lote.	121
Figura 40. Área de macro localización de la planta piloto.	122

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Determinación del porcentaje de humedad en la muestra	69
Ecuación 2. Rendimiento de extracto.	71
Ecuación 3. Estimador prueba de Tukey	73
Ecuación 4. Rendimiento del fraccionamiento.	74
Ecuación 5. Conversión de tasa EA – PV.	124
Ecuación 6. Depreciación en línea recta.	124
Ecuación 7. Valor presente neto VPN.	128
Ecuación 8. Tasa interna de retorno TIR.	128

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Porcentajes de extracción vs. Réplicas.	72
Gráfica 2. Porcentajes de rendimiento de fracciones.	74
Gráfica 3. CMI de cada fracción por bacteria.	75
Gráfica 4. Variación del pH tratamiento 1.	91
Gráfica 5. Variación de pH tratamiento 2.	92
Gráfica 6. Variación del pH tratamiento 3.	92
Gráfica 7. Diagrama de caja y bigotes para el tratamiento 1.	93
Gráfica 8. Diagrama de caja y bigotes para el tratamiento 2.	93
Gráfica 9. Diagrama de caja y bigotes para el tratamiento 3.	94
Gráfica 10. Formulación final de Driminator.	106

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Equipos	143
Anexo B. Información de recolecta	146
Anexo C. Reactivos y materias primas	147
Anexo D. Fichas técnicas de reactivos	149
Anexo E. Cotizaciones de equipos	155
Anexo F. Preparación de reactivos	157
Anexo G. Balances de materia PFD	158
Anexo H. Tabla de distribución de Fisher	161
Anexo I. Tabla de prueba Tukey	162

ABREVIATURAS

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

ASTM: American Society of Testing Materials

ATCC: American Type Culture Collection

BFD: Diagrama de bloques (Basic flow Diagram)

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

PFD: Diagrama de procesos (Process flow diagram)

PG: Propilenglicol

TEA: Trietanolamina

TIR: Tasa interna de retorno

TLC: Cromatografía en capa delgada (Thin-Layer Chromatography)

UFC: Unidad formadora de colonia

VPN: Valor presente neto

GLOSARIO

ACEITE ESENCIAL: mezclas de varias sustancias sintetizadas por las plantas y que se caracterizan por su compleja composición química y su carácter volátil y fuertemente aromático.

ADITIVO: sustancia que se agrega en la formulación de un producto para obtenerlo con las características deseadas.

AGENTE HUMECTANTE: aditivo con características higroscópicas, poseen la propiedad de absorber agua del ambiente y así aumenta la dispersión de un líquido sobre una superficie.

AGENTE QUELANTE: aditivo secuestrante que atrapa iones metálicos formando complejos moleculares. Comúnmente se incorpora a la formulación como seguro contra la contaminación con metales pesados con el fin de evitar la degradación pronta del ingrediente activo.

AGENTE TENSIOACTIVO O SURFACTANTE: aditivo químico, que ejerce su efecto en la superficie de contacto entre dos fases (interfase), mediante la modificación de su tensión superficial, dándole propiedades características a la formulación.

ALCALOIDES: metabolitos secundarios resultado de reacciones químicas naturales procedentes de aminoácidos. Son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico y se encuentran en las plantas superiores como sales de un ácido orgánico.

ANTIBACTERIAL: producto destinado hacia el sector de la limpieza e higiene, puede ser definido como un biocida, que en términos generales describe a un agente químico, usualmente de alto espectro que inactiva microorganismos, este se puede clasificar como antiséptico o desinfectante, siendo la principal diferencia el destino de aplicación: sobre tejidos vivos o superficies (material inanimado) respectivamente¹.

BACTERIAS: microorganismos unicelulares que no tienen núcleo ni orgánulos metabólicos específicos, las bacterias se identifican, en parte por su estructura, existen tres formas de bacterias: Esféricas (cocos), bacilares (bacilos) o espirales o curvas (formas espiraladas).

¹ SÁNCHEZ, Leonardo., SAENZ, Eliana. Antisépticos y desinfectantes. Dermatología peruana. 2005. Vol: 15 N°2.

BIOPROSPECCIÓN: rama de la ciencia dedicada a la búsqueda de propiedades medicinales, nutricionales, e industriales, farmacológicas y biotecnológicas en materia viva.

CATÁLOGO ATCC: es la entidad encargada del reconocimiento y la certificación de las cepas bacterianas, asegurando pureza y calidad en los medios de cultivo.

CARDIOTÓNICOS: también conocidos como aglicones cardiotónicos, son compuestos estructuralmente constituidos por el sistema anular esteroidal con los grupos metilo C18 y C19. Su nombre es debido a presentar actividad estimulante sobre el músculo cardíaco.

CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA CCD: técnica analítica que tiene como objetivo el análisis de una mezcla de componentes. Se emplea para la selección de un eluyente.

CITOTOXICIDAD: propiedad que poseen ciertas sustancias en una célula de ser tóxico o nocivo para el ser humano.

COADYUVANTE: sustancia que potencia el efecto de un producto. Para un desinfectante, ayuda a mejorar su efectividad, aumentando su actividad antibacteriana, alargando su vida útil, mejorando la afinidad entre aditivos - ingrediente activo y mejorando el contacto del producto con la superficie a tratar.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA: mínima concentración de sustancia inhibitoria, que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). La determinación de la CMI puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test.

CONTENIDO NETO: cantidad de producto en un preempacado declarado en el rotulado por el empacador, exceptuando la envoltura y cualquier otro material empacado con el producto.

CLORANFENICOL: antibiótico de alto espectro, comúnmente usado como control positivo en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

DESINFECTANTE: agente químico que se aplica sobre superficies o materiales inertes o inanimados, para destruir los microorganismos presentes en dicha superficie y prevenir infecciones.

Drimys granadensis: mejor conocida como “ají de paramo” o “palo de ají, perteneciente a la familia *Winteraceae*, son árboles primitivos presentes principalmente en Suramérica y Centroamérica, en Colombia sobre las tres

cordilleras entre 1700 y 3700 m; es conocida por sus propiedades medicinales, que datan desde el siglo XVI⁶.

EFFECTIVIDAD: con respecto a las pruebas *in vitro*, esta se mide de acuerdo al tamaño de Halo de inhibición formado para cada uno de los tratamientos. Entre mayor sea su diámetro, el producto evaluado será más efectivo.

ELUCIÓN: extracción, mediante un líquido apropiado, de una sustancia que se encuentra absorbida en un medio sólido.

ELUENTE: disolvente utilizado con el fin de efectuar la separación por elución.

ESTABILIDAD DEL PRODUCTO: propiedad de mantener invariables las características organolépticas y funcionales de un producto con respecto al paso del tiempo y de las condiciones ambientales.

ESTEROIDES: compuesto orgánico de 17 átomos de carbono. Son lípidos simples, no saponificables (no se derivan de ácidos grasos) que se encargan del metabolismo de carbohidratos, proteínas y otros lípidos, sin embargo, se distinguen por su función hormonal en el ser humano.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD A TIEMPO REAL: estudio de estabilidad diseñado y realizado en las condiciones de almacenamiento pre-establecidas, durante el tiempo total del período de eficacia propuesto, en su envase original.

ETIQUETA: rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve o adherida al envase o empaque.²

EXTRACCIÓN: transferencia selectiva de compuestos desde una mezcla sólida o líquida hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico).

EXTRACTO BLANDO: tipo de extracto vegetal que se caracteriza por tener una consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas, son poco estables y resultan difíciles de manipular.

EXTRACTO CRUDO: extracto vegetal obtenido luego de la metodología de extracción, al cual no se le ha eliminado el solvente utilizado.

EXTRACTO SECO: extracto vegetal concentrado al cual se ha sometido a un proceso de eliminación del solvente utilizado.

² NTC 5465 Requisitos para el rotulado o etiquetado de productos de aseo y limpieza

EXTRACTO VEGETAL: producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes.

FITOQUÍMICA: disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales³.

FLAVONOIDES: pigmentos naturales presentes en metabolitos secundarios de las plantas. Sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina. Caracterizados por ser polifenólicos con 15 átomos de carbono y solubles en agua.

FUNCIONALIDAD: es una característica que define si un producto es útil para el propósito con el cual fue creado.

GRUPO DE MOLÉCULAS: (Objetivos) se refiere a los metabolitos secundarios presentes en el extracto vegetal.

HALO DE INHIBICIÓN: zona alrededor de un disco de antibiótico en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada para determinar la potencia del antibiótico frente a la bacteria.

HUMEDAD: cantidad de agua, vapor de agua o cualquier otro líquido que está presente en la superficie, en el interior de un cuerpo, en el aire o en el extracto vegetal.

INGREDIENTE ACTIVO: sustancia o mezcla de varias con actividad biológica que tienen la capacidad de interactuar con nuestro organismo y sus distintos sistemas.

MACERACIÓN: proceso de extracción sólido-líquido. Es la operación por la cual se hace actuar un disolvente sobre el material que se desea extraer, a temperatura ambiente. La agitación continua del recipiente de maceración favorece la extracción.

MARCHA FITOQUÍMICA: método cualitativo que permite evidenciar la presencia de ciertos metabolitos secundarios como flavonoides, quinonas, entre otros, en un extracto vegetal específico. Este procedimiento no permite cuantificar la cantidad de aquellos ni los compuestos químicos específicos.

METABOLITOS SECUNDARIOS: compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan⁴.

³ Diccionario de términos ambientales [en línea]

< <http://www.ambientum.com/diccionario/listado/diccionario.asp?letra=ff> > [citado el 2/10/2016]

⁴ ROCA, W., MROGINSKI, L. Cultivo de Tejidos en Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia,1991.

MÉTODOS CUALITATIVOS: procedimientos que permiten caracterizar una muestra y/o distinguir composiciones, mas no medir numéricamente el valor de sus variables.

MÉTODOS CUANTITATIVOS: procedimientos que permiten medir con valores numéricos alguna variable. En la prueba antibacteriana es aquel que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).

MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN: procedimiento que, por medio de halos de inhibición, permite clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente.

PRUEBA FITOQUÍMICA PRELIMINAR: es la prueba química de caracterización consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas.

PRUEBA IN VITRO: es un conjunto de pruebas desarrolladas en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos.

PRUEBA IN VIVO: tipo de experimentación por oposición a aquella que se hace in vitro, es decir se desarrolla en el lugar de aplicación.

QUINONAS: metabolito secundario que se caracteriza por estar conformado por dicetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles.

SAPONINAS: son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), tienen la propiedad de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua, formando una espuma abundante.

SESQUITERPENOS: compuestos de 15 carbonos ($C_{15}(H)$) basados en 3 unidades de isopreno.

SOLUCIÓN STOCK: solución de mayor concentración también llamada solución madre, a partir de la cual se pueden hacer diluciones sucesivas hasta alcanzar la concentración deseada.

TANINOS: metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos. Abundan en las cortezas de los robles. Son productos de excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas contra parásitos. Químicamente son polímeros de polifenoles.

TIEMPO DE CONTACTO: es el tiempo que toma el desinfectante en unirse con el microorganismo, atravesar su pared celular y llegar al sitio específico, donde el desinfectante actúa.

TINCIÓN DE GRAM: tinción desarrollada por el doctor Christian Gram en 1884, y permite de acuerdo con la estructura y el grosor de la pared bacteriana agrupar a estos microorganismos⁵.

VEHÍCULO: sustancias que se emplean en las formulaciones para diluir el complejo total hasta un volumen o peso determinado.

⁵ RODRIGUEZ, Evelyn. *et al.* BACTERIOLOGIA GENERAL Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 2005. p 63.

RESUMEN

Se desarrolló un producto desinfectante de superficies para uso doméstico, a partir de una fracción medianamente polar de la especie proveniente del páramo altoandino: *Drimys granadensis*, con el fin de proponer una alternativa de origen orgánico a diferencia de los productos sintetizados químicamente. Para esto, se fraccionó el extracto vegetal crudo con cuatro solventes de polaridad creciente: Hexano, Cloroformo, Acetona y Metanol, para a cada uno se determinó sus propiedades antibacterianas y su concentración mínima inhibitoria en 4 cepas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, dando como resultado que la fracción de acetona fue la de mayor efectividad, con una CMI de 15 mg/ml; teniendo en cuenta este resultado, se realizó una marcha fitoquímica a través de cromatografía en capa delgada y uso de agentes reveladores, identificando alta presencia de Taninos y Cardiotónicos.

A continuación, se evaluó la estabilidad y las características organolépticas de 3 pre-formulaciones, variando el pH de cada una y, posteriormente, se les realizó pruebas comparativas *in vitro* e *in vivo* contra dos productos desinfectantes comerciales; según los resultados se encontró que el tratamiento con un pH 4, fue el más estable y efectivo, razón por la cual, se decidió emplear esta composición como la formulación del producto final.

Finalmente, se propuso un diseño de procesos preliminar a nivel planta piloto, para la obtención de 200 L mensuales del desinfectante, tomando en cuenta los costos asociados a esta propuesta. Con un VPN de \$ -42.774.842 millones y un valor de TIR -6.10% se llegó a la conclusión de que no es rentable la producción en un periodo de 3 meses.

Palabras claves: *Drimys granadensis*, desinfectante, extracto vegetal, aditivos, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas.

ABSTRACT

A surface disinfectant for domestic use, was developed from a partially polar fraction of the Andean Paramo specie: *Drimys granadensis*. The purpose of this project is to propose an organic alternative to the chemical synthesized products. To do so, the vegetal extract was fractionized with four increasing polar solvents: hexane, chloroform, acetone and methanol. For each one of them, the antibacterial properties and the minimum inhibitory concentration were evaluated, in four bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, The results established that the acetone fraction presented the greater effectiveness, with a MIC of 15 mg/ml. According to the previous results, a phytochemical screening was developed through Thin-Layer Chromatography and detecting reagents, identifying Tannins and Cardiotonics, mostly.

Subsequently, the stability and the organoleptic characteristics of 3 pre-formulations were evaluated, varying the pH value for each one. Afterwards, comparative *in vitro* and *in vivo* tests were evaluated, with two commercial products; corresponding to the results, the formulation with pH 4, was the most stable and effective, which is the reason why it is decided to be the final composition of the product.

Finally, a preliminary, process desing was proposed to a Pilot scale production, to obtain 200 liters of the disinfectant, each month, involving the associated costs. With a Net present value of \$-42.774.842 million and an internal rate of return of - 6.10%, the production of the disinfectant is not profitable.in three months period.

Key words: *Drimys granadensis*, disinfectant, vegetal extract, additives, gram positive bacteria, gram negative bacteria.

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento responsable de las especies vegetales en Colombia, es un eje fundamental para la conservación de la biodiversidad en el país y, paralelamente, a la innovación en el mercado de artículos de origen natural en diversos sectores industriales. Esta alternativa procedente de materias primas orgánicas, podrían ofrecer una solución a la problemática ambiental que se vive actualmente, debido a la mala disposición de los productos sintetizados químicamente, los cuales en su gran mayoría terminan en fuentes hídricas, perturbando el equilibrio en ecosistemas acuíferos.

A partir de esto, se ha demostrado que la producción y el uso habitual de desinfectantes sintetizados químicamente a base de alcohol, cloro, fenoles, entre otros, trae efectos ambientales negativos hacia fuentes hídricas, suelo y aire (en el caso de aerosoles) y a su vez, problemas de salud humana⁶. Investigaciones como la realizada en el 2011 por Ramos y Alonso, se reporta que actualmente existen cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos con susceptibilidad disminuida a diferentes desinfectantes⁷, lo cual ha desencadenado un problema de salud pública, el cual se le da un manejo desde la perspectiva de diferentes instituciones del país.

El Jardín Botánico de Bogotá *José Celestino Mutis* es una de las entidades que contribuye a dar parte de la solución a esta problemática, abordando dichos temas dentro de las instalaciones de la subdirección científica, mediante el programa de investigación en Especies y Propagación, el cual se fundamenta en dos ejes temáticos: Sistema integrado y Biosprospección; el principal enfoque de la línea de Bioprospcción, es caracterizar extractos vegetales de diferentes especies nativas altoandinas, para evaluar sus potenciales actividades biológicas. Entre estos, la especie *Drimys granadensis* L.f, mejor conocida como “canelo de páramo”, ha demostrado tener moléculas con propiedades bactericidas y alta citotoxicidad en sus extractos vegetales. Con base en esto, se quiere aprovechar sus características para la formulación de un producto desinfectante de superficies, el cual no sólo será una alternativa en términos de los desinfectantes sintetizados químicamente, también se impulsará indirectamente al uso y conservación de especies nativas colombianas, enriqueciendo la biodiversidad en el país.

⁶ US PATENT. Disinfectant Formulation. Inventor: DAIGLE, F., *et. al.*, Estados Unidos, Patente de investigación. US 9,609,864 B2. 04 de Abril 2017.

⁷ RAMOS, Yusibeska y ALONSO, Guillermina, Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 31. P. 130 – 137.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un producto antibacteriano procedente del extracto de las hojas de *Drimys granadensis* a nivel laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar el grupo de moléculas con mayor potencial bactericida, presentes en el extracto vegetal crudo de la especie.
2. Especificar la formulación del desinfectante partiendo de un diseño experimental.
3. Evaluar la efectividad y la funcionalidad del desinfectante antibacterial comparado frente un producto comercial.
4. Proponer un diseño preliminar del proceso de obtención del desinfectante a nivel planta piloto.
5. Estimar los costos asociados a la propuesta de diseño y a las especificaciones técnicas.

1. MARCO TEÓRICO

Con el objetivo de dar inicio a la investigación propuesta, es importante tener en cuenta los referentes teóricos en que se basa el proyecto. La formulación de un producto abarca conceptos desde las características de la especie a utilizar, hasta su proceso de manufactura y su diseño conceptual de proceso; teniendo esto en cuenta, se resaltan los conceptos que se explican a continuación.

1.1 BIOPROSPECCIÓN

El término Bioprospección, es comprendido principalmente como la “investigación realizada para identificar especies, variedades, genes y productos con usos actuales o potenciales por parte de la humanidad. Juega un papel fundamental para el uso y protección racional de la biodiversidad”⁸. De igual manera, es entendido como la “búsqueda intensa de metabolitos novedosos a partir de fuentes naturales, tradicionalmente de microorganismos, pero también de plantas y animales”⁹. Esta rama de la ciencia enfocada en el aprovechamiento de las distintas propiedades que ofrece la materia orgánica renovable, ha adquirido una gran importancia en países ricos en diversidad biológica, como es el caso de Colombia¹⁰, donde la bioprospección se considera una estrategia para aumentar las capacidades de realizar actividades científicas y tecnológicas, contribuyendo con procesos de desarrollo dentro del país; según Duarte y Velho¹¹, la adecuada capacidad científica y tecnológica instalada es necesaria, pues esto servirá como cimiento para abordar este tema; en Colombia existen capacidades básicas que impulsan el desarrollo en este campo de la ciencia, sin embargo, se requiere una mayor motivación por medio de acciones políticas y formación de grupos de investigación avalados por la comunidad científica y tecnológica.

El establecer grupos de investigación tiene como objetivo planear y ejecutar proyectos en que se requiera una investigación científica y que comprenda la generación de nuevo conocimiento teórico y experimental, hasta llevarlo al ámbito aplicado a problemas de la vida cotidiana. Según la plataforma ScienTI del Instituto Colombiano para el desarrollo de la ciencia y la tecnología (COLCIENCIAS)¹², se encuentran registrados 618 grupos de investigación en áreas como Ciencias químicas, Ciencias biológicas, Ciencias de la tierra y

⁸ Sittenfeld, A., Gámez, R. 1993. Biodiversity prospecting by INBio. En Reid, W. V., Laird, S. A., Meyer, C. A., Gámez, R., Sittenfeld, A., Janzen, D. H. (Eds). Biodiversity prospecting: using genetic resources for sustainable development. Washington. World Resources Institute. P 69-98

⁹ Melgarejo, L. M., Sánchez, J., Chaparro, A., Newmark, F., Santos-Acevedo, M., Burbano, C. y Reyes, C. 2002. Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia. Serie de Documentos Generales INVEMAR No.10. Cargraphics. Bogotá, 334p.

¹⁰ CARRIZOSA POSADA, Santiago. Bioprospección y El Acceso a Los Recursos Genéticos: Una Guía Práctica. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2000.

¹¹ DUARTE TORRES, Oscar y VELHO, Léa. Capacidades científicas y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección. En: Revista Iberoamericana De Ciencia Tecnología y Sociedad. vol. 4, no. 12, p. 55-68

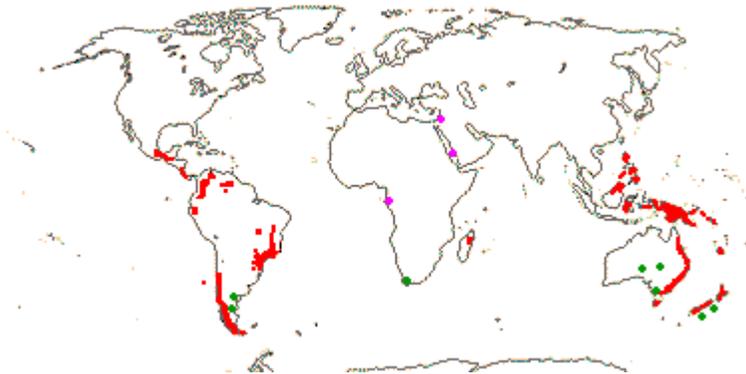
¹² Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología. COLCIENCIAS. [En línea]: Plataforma ScienTI. < <http://scienti.colciencias.gov.co:8083/ciencia-war/BusquedaGrupoXArea.do> > [Consulta: 26 de Enero de 2017]

medioambientales y otras Ciencias Naturales, dentro de las cuales se encuentra el tema de bioprospección; existen diversas instituciones que promueven el desarrollo en temas de esta índole, el presente trabajo se basa en la propuesta hecha por el Jardín Botánico de Bogotá *José Celestino Mutis*, específicamente en el trabajo desarrollado por la línea de investigación en **Bioprospección**, el cual aborda el manejo y aprovechamiento de extractos vegetales con potencial de uso farmacéutico, cosmético, alimenticio o de limpieza, como estrategia de conservación de especies vegetales, actualmente enfatizado en el páramo andino, encontrando especies con alto potencial, una de ellas es *Drimys granadensis* L.f, la cual será objeto de estudio principal en esta investigación.

1.2 FAMILIA *Winteraceae*

Familia que contiene de 4 a 7 géneros y entre 60 y 90 especies de plantas diferentes, la mayoría de especies nativas de origen asiático y australiano¹³. Se estima que esta familia viene existiendo entre 75 a 45 millones de años y también se encuentran la región de Centro América, Sur América y Madagascar¹⁴ como se observa en la figura 1.

Figura 1. Lugares donde crecen especies nativas de la familia Winteraceae.



Fuente: Missouri Botanical Garden Website¹⁵.

Fenotípicamente, la familia *Winteraceae* se reconoce por estar compuesta de árboles y arbustos aromáticos, que crecen entre 10 cm y 18 metros de altura y contienen hojas alternas con puntos verdes claros, flores y frutos pequeños y su rasgo distintivo es su aroma fragante.¹⁶

¹³ Enciclopedia Britannica. Winteraceae Plant Family. [En línea] <<https://global.britannica.com/plant/Winteraceae>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

¹⁴ Missouri Botanical Garden. Angiosperm Phylogeny Website. [En Línea]: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/canellalesweb.htm#Winteraceae>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

¹⁵ *Ibid.*

¹⁶ John Hutchinson (1973). The Families of Flowering Plants. Oxford at the Clarendon Press [En Línea] <<https://www.abebooks.co.uk/servlet/BookDetailsPL?bi=19127546811&searchurl=tn%3Dthe%2Bfamilies%2Bof%2Bflowering%2Bplants%26sortby%3D17%26an%3Dhutchinson%2Bj>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

Entre los géneros que contiene la familia, lo más estudiados son: *Pseudowintera*, *Takhtajania*, *Tasmannia*, *Zygogynum* y *Drimys*¹⁷, siendo el último el objeto de estudio para la investigación.

Las plantas que se catalogan dentro del género *Drimys* se encuentran en América, empezando por el sur de México hasta acabar en la parte sur de Argentina. Son plantas primitivas que crecen en zonas húmedas y climas entre templado y frío. Las especies representativas para este género son: *D. brasiliensis*, *D. winteri* y *D. granadensis*.

1.3 *Drimys granadensis* L.f

Comúnmente conocida como “Canelo de páramo” o “Palo de ají”, en la tabla 1 se encuentra la taxonomía de la especie.

Tabla 1. Taxonomía de *Drimys granadensis*

Taxonomía	
Reino	Plantae
Clase	Angiospermas
Orden	Canellales
Familia	<i>Winteraceae</i>
Género	<i>Drimys</i>
Especie	<i>Drimys granadensis</i>

Fuente: Base de datos Theplantlist.com¹⁸

Es un árbol de hasta 20 metros de altura y un diámetro de 40 cm, el cual se encuentra en los bosques montanos de Sur y Centro América, en países como México, Costa Rica, Ecuador, Chile, Argentina y en Colombia en zonas frías de Antioquia, Cundinamarca, Caldas, Cauca y Boyacá¹⁹, incluyendo los bosques de montaña alta en el páramo andino donde crece a una altura entre los 1600 y 3200 msnm.

En Colombia, la planta crece a unas condiciones climáticas entre los 6 y 18°C, un promedio anual de lluvias de 2000mm con fuerte invierno en los meses de Abril, Mayo, Julio, Agosto y Noviembre²⁰.

¹⁷ Royal Botanic Gardens KEW. Vascular Plant Families and Genera. List of genera in family Winteraceae. [En línea]: < <http://data.kew.org/cgi-bin/vpfg1992/genlist.pl?WINTERACEAE> > [Consulta: 26 de Enero de 2017]

¹⁸ The Plant List. A working list of all plants species. *Drimys granadensis*. En línea. [Consultado: 05 de Octubre de 2016] <http://www.theplantlist.org/tp1.1/search?q=drimys+granadensis>

¹⁹ DEL VALLE A, J. 1972. Introducción a la Dendrología de Colombia. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia, p. 351.

²⁰ Alcaldía de Boyacá. Esquema de ordenamiento territorial Pachavita – Boyacá (2003/2012). Físico – Biótico. Zonas de vida. p. 73.

Se caracteriza por tener tronco recto y cilíndrico con una corteza externa color gris, hojas simples color verde oscuro de forma elíptica, simétrica, con una relación de 3:1 con medidas de aproximadamente 5 – 12 centímetros y 1 – 5.5 de largo y ancho respectivamente²¹; su cara abaxial (inferior o envés) es color blanco mostrando presencia de bastoncillos de cera²² como se puede observar en la ilustración 1. Paralelamente, es una especie angiosperma, la cual engendra flores bisexuales, blancas, con gran cantidad de pétalos y frutos que se caracterizan por ser bayas o folículos con semillas; en la ilustración 2 se muestra un ejemplar de sus flores y frutos. Un rasgo distintivo de *D. granadensis* es su aroma fuerte y sabor picante (de ahí su nombre común), especialmente en sus hojas y tallos.

Ilustración 1. Superficie abaxial de la hoja de *Drimys granadensis*.



Fuente: Base de datos Tropicos.org²³

Ilustración 2. Especie *Drimys granadensis* con sus flores y frutos.



Fuente: Base de datos PlantSystematics.org²⁴

²¹ Tropicos.org., Missouri Botanical Garden, <http://www.tropicos.org/Name/34200005> [Consulta: Lunes, 03 de Octubre de 2016]

²² CASTELLANOS, Salvador Acosta y VILELA, Alejandra E. Anatomía foliar y morfología del polen de *Drimys granadensis* var. mexicana (winteraceae: magnoliales). En: Polibotánica. no. 8, p. 1-12

²³ HAMMEL, Barry, *Drimys granadensis* L. f., 2009, <http://www.tropicos.org/ImageFullView.aspx?imageid=21424&projectid=3> [Consulta: Sábado, 01 de Octubre de 2016]

1.3.1 Usos. La especie *Drimys granadensis* L.f, siendo del género más representativo en su familia, tiene como característica principal sus propiedades medicinales, que datan desde el siglo XVI²⁵, con base a esto, se ha utilizado la corteza y hojas de esta planta en la medicina tradicional de Costa Rica como analgésico y en infusión para combatir el dolor de estómago y como diurético²⁶; en países como Chile y Brasil, se ha utilizado para combatir el sarna, la constipación y la diarrea.

La madera de su tronco ha tenido usos en carpintería, cajas, construcciones, muebles, paneles, pulpa y papel²⁷.

A partir de la investigación y de métodos de extracción de sus aceites esenciales, los cuales poseen metabolitos secundarios que, mediante pruebas de laboratorio se ha demostrado que tiene propiedades pesticidas y desinfectantes²⁸.

1.3.2 Metabolitos secundarios. A partir de las aplicaciones naturistas mencionadas anteriormente, autores como José F. Ciccio²⁹ de la Universidad de Costa Rica, efectuó estudios para conocer la composición química de *D. granadensis* que crece en Costa Rica en el año 1996; en su investigación separó e identificó mediante la técnica de hidrodestilación 42 compuestos representantes del 91.4% del aceite esencial, del cual los hidrocarburos monoterpénicos constituyen un 45,8%; por otro lado, se encontró que los monoterpenos oxigenados representan el 25.7% y los hidrocarburos sesquiterpénicos un 16.8% del aceite, del cual es Germacreno D es el constituyente mayoritario con un 10.2%³⁰.

En el año 2011, GAVIRIA, Mauricio, *et al.*, de la Universidad de los Andes realizaron la separación de componentes en el aceite esencial de *D. granadensis* y compararon los resultados obtenidos de José Ciccio (1996). En la especie colombiana se pudieron separar por medio de la técnica de hidrodestilación, una totalidad de 88 compuestos, de los cuales se identificaron 85, representando el 98.6% del aceite esencial total, donde hay en abundancia Sesquiterpenos oxigenados en una proporción de 37.6%, seguido por Sesquiterpenos hidrocarbonados con 36.1% Diterpenos en un 11.1%. Los compuestos

²⁴ MICHELANGELI, Fabian A., Leaf abaxial surface, http://www.plantsystematics.org/imgs/fm18/r/Winteraceae_Drimys_granadensis%20%20_28894.html [Consulta: Sábado, 01 de Octubre de 2016]

²⁵ Organización para la Educación y Protección Ambiental - Canelo de páramo - *Drimys granadensis*. http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=460&Itemid=30 [Consulta: Miércoles, 31 de agosto de 2016].

²⁶ STANDLEY, P.C. 1937. Flora of Costa Rica. Citado por CICCIO, José F. Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). vol. 1, no. 1, p. 29

²⁷ *Ibid.*, p. 30.

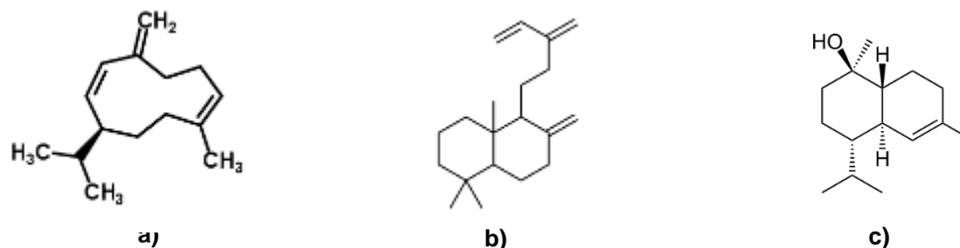
²⁸ *Ibid.*, p. 29.

²⁹ CICCIO, José F. Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). vol. 1, no. 1, p. 29

³⁰ *Ibid.*, p.

mayoritarios se pueden observar en la figura 2 siendo: a) Germacreno D (14.7%), b) Esclareno (9.5%) y c) α -cadinol (7.3%)³¹.

Figura 2. Compuestos volátiles representativos de *Drimys granadensis*



El estudio concluyó que la especie que se siembra en el páramo andino colombiano difiere considerablemente en la composición con respecto a la especie costarricense, debido a que, aunque hubo similitudes en cuanto los metabolitos secundarios, la cantidad de cada uno es diferente, como se puede apreciar en la tabla 2, esto puede ser debido a atributos genéticos y a la variedad bio-geográfica en la composición del suelo, condiciones climáticas y demás, en cada país.

Tabla 2. Diferencia de los metabolitos secundarios en *D. granadensis*.

Metabolito secundario	Variedad costarricense	Variedad colombiana
Monoterpenos hidrocarbonados	45.8%	10.6%
Monoterpenos oxigenados	25.7%	2.1 %
Sesquiterpenos hidrocarbonados	16.8%	36.1%
Sesquiterpenos oxigenados	1.5%	37.6%

Fuente: CICCÍO, J y GAVIRIA, M.^{32,33}

El estudio de Gaviria *et al.*, también demostró que el extracto de *D. granadensis* mostró inhibición de crecimiento bacteriano en 8 cepas distintas, tres Gram negativas (*Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aureginosa* y *Escherichia coli*) y cinco Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (dos tipos distintos), *Bacillus cereus* y *Staphylococcus epidermidis*). Teniendo resultados superiores para este último grupo de bacterias. Esta propiedad hace del extracto de esta especie una buena alternativa para diseñar productos antibacteriales³⁴.

³¹ GAVIRIA, M., et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Drimys granadensis* L.F leaves from Colombia. vol. 8, no. 1, p. 533

³² CICCÍO, José F. Op. cit., p. 29.

³³ GAVIRIA, M., et. al., Op. cit. p. 534.

³⁴ *Ibid.*

No obstante, la autora DUEÑAS, J.³⁵ determinó que *D. granadensis* posee un alto nivel de toxicidad en su extracto vegetal, a partir de un ensayo de toxicidad, empleando un método de cuantificación de la tasa de mortalidad de *Artemia salina*, en presencia de diferentes concentraciones del extracto, en el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Se realizó un estudio comparativo de *D. granadensis* con dos especies más: *Valeryana triphylla* y *Lippia turbinata*, dando como resultado que la dosis letal media de *D. granadensis* fue muy superior a las demás, descartando la especie para la elaboración de productos destinados a aplicación humana. Sin embargo, esta alta toxicidad es una característica idónea para posibles usos en productos para superficies y derivados³⁶.

1.4 DESINFECTANTES

Según la RAE, desinfectar quiere decir “quitar a algo la infección o la propiedad de causarla, destruyendo los gérmenes nocivos o evitando su desarrollo”³⁷ y como su palabra lo indica, los desinfectantes son agentes químicos, físicos o biológicos, cuyo objetivo es destruir la mayoría de microorganismos patógenos presentes para disminuir los riesgos de contaminación, infecciones y de enfermedades. Existen diversas clases de desinfectantes y difiere en el tipo de moléculas que prevalece en su composición química, a su vez, existen distintos niveles que dependen de la potencia del producto, la cual se puede ver afectada por factores internos y externos que influye en su eficacia.

1.4.1 Clases de desinfectantes. Actualmente, en el mercado se comercializan desinfectantes para superficies sintetizados por vía química, los más comunes son el hipoclorito sódico, ácido peracético, peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), alcohol etílico (etanol), alcohol isopropílico (isopropanol), Aldehídos, compuestos de amonio, compuestos fenólicos, Yodo, entre otros³⁸; la actividad bactericida, los sinergismos y antagonismos de cada uno de ellos se puede observar en la tabla 3.

³⁵ DUEÑAS, J.T., Desarrollo de un producto bioactivo partiendo de extractos vegetales de especies alto andinas. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. 2017. p. 36

³⁶ *Ibid.*, p. 51.

³⁷ Real academia española (2016) Diccionario de la lengua española [Consulta: Lunes, 03 de Octubre de 2016]

³⁸ INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO, NTP 429: Desinfectantes: Características y Usos Más Corrientes. España, 1999. p. 1-4

Tabla 3. Espectros de actividad, sinergismos y antagonismos de desinfectantes

Desinfectantes	Microorganismos		Antagonismos	Sinergismos
	Bacterias Gram +	Bacterias Gram -		
Aldehídos	+++	+++	Amoniaco	Humedad > 50%
Compuestos clorados	+++	+++	Materia orgánica, Tiosulfatos, Sulfuros, Sales ferrosas	
Compuestos yodados	+++	+++	Materia orgánica, Compuestos de Hg, Tiosulfato de sodio	Jabones, Amonio cuaternario
Compuestos de amonio cuaternario	+++	+	Materia orgánica	Cresol
Fenoles	+++	±	Materia orgánica, Amonio cuaternario, Ciertos jabones, Alcohol para el hexaclorofeno	Sales de sodio y potasio, sales metálicas

Fuente: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, España.

1.4.2 Niveles de desinfección. La potencia del desinfectante depende fundamentalmente del grado de destrucción de microorganismos requerido, se proponen tres niveles, según en lo que basaron su trabajo de grado los autores Flamenco, J y Guevara G³⁹, en el año 2011:

- **Nivel alto:** Exterminación de todas las formas bacterianas vegetativas, hongos, virus y algunas endoesporas bacterianas.
- **Nivel intermedio:** Elimina todas las formas bacterianas vegetativas y hongos, pero pueden sobrevivir virus no lipídicos y las micobacterias.
- **Nivel bajo:** Extermina bacterias vegetativas, virus lipídicos, pero no elimina todas las formas fúngicas, micobacterias, virus no lipídicos ni esporas.

1.4.3 Factores que influyen en la eficiencia de desinfección. Una vez se tenga seleccionado el nivel en que se requiere formular el desinfectante, se debe tener especial cuidado con los factores que pueden alterar la potencia del producto, debido a que estos podrían causar deficiencias en el producto si no se tienen en cuenta.⁴⁰

³⁹ FLAMENCO, José W. y GUEVARA, Glenda I. Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana. vol. 1, no. 1, p. 26

⁴⁰ SÁNCHEZ, L y SAENZ, E. Op. cit. p. 2.

1.4.3.1 pH. Afecta el enlace iónico de un desinfectante con la pared celular de una bacteria; si un desinfectante se encuentra en un pH óptimo, se garantiza que una mayor cantidad de moléculas de desinfectante se adhieran a un mayor número de microorganismos, de lo contrario, el producto pierde efectividad. A su vez, muchos desinfectantes son más estables en un rango de pH determinado.⁴¹

1.4.3.2 Naturaleza del microorganismo. La efectividad de un desinfectante difiere según el tipo de microorganismo a exterminar, debido a que en cada uno, varía su resistencia en diferentes tipos de desinfectante. Esta resistencia se debe principalmente a las propiedades genéticas naturales del microorganismo (como la composición en su membrana celular) o a agentes externos como la resistencia a antibióticos por el uso frecuente de estos⁴².

1.4.3.3 Tiempo de contacto y concentración del agente. Estas dos variables van de la mano, pues una variación en la concentración del ingrediente activo, modifica el tiempo en que se debe dejar actuar el producto para lograr su óptimo efecto germicida⁴³.

1.4.3.4 Temperatura. Esta variable afecta la tasa de reacción. La mayoría de los desinfectantes actúan más efectiva y rápidamente a una mayor temperatura, sin embargo, por practicidad, muchos de ellos se desarrollan para ser usados a condiciones ambientales normales, como es el caso de los de uso doméstico⁴⁴.

1.4.3.5 Presencia de materiales extraños. Se debe garantizar que la superficie a desinfectar se encuentre limpia y no contenga material orgánico, pues se vería afectada negativamente la potencia antibacteriana⁴⁵; esto se debe a que la suciedad interfiere en el contacto del producto con la superficie, lo cual dificulta la absorción del desinfectante en la célula del microorganismo.⁴⁶

1.5 BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Se distinguen por teñirse de color azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, característica que se debe a la estructura química en su envoltura celular: tienen una pared celular compuesta de peptidoglicano, delgada y con múltiples capas, exterior a la membrana celular⁴⁷, como se puede observar en la figura 3.

⁴¹ COOPER, MS., 2000. Citado por SANDLE T. Pharmaceutical Microbiology. Ch. 15 Cleaning and disinfection. 2016. p. 189.

⁴² COOPER, MS. Op. cit. p. 188.

⁴³ SÁNCHEZ, L y SAENZ, E. Op. cit. p. 2

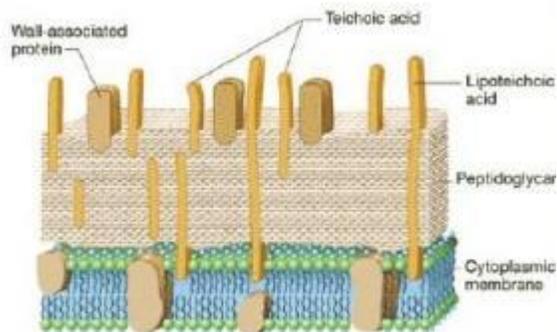
⁴⁴ COOPER, MS. Op. cit. p. 189.

⁴⁵ SÁNCHEZ, L y SAENZ, E. Op. cit. p. 3

⁴⁶ COOPER, MS. Op. cit. p. 189.

⁴⁷ RICHARD, Harvey A. Microbiology. 2 ed. New Jersey, United States: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 438

Figura 3. Esquema de la pared celular en una bacteria Gram positiva



Fuente: Slide Share – Salud y medicina online⁴⁸

Hay diversos tipos de cepas bacterianas de tipo gram positivas, existen algunas que causan beneficios para el ser humano, como es el caso de las bacterias ácido lácticas, que son bacilos no esporulados anaeróbicos y son responsables de la fermentación en alimentos como leche, carne y vegetales, para obtener productos como yogurt, quesos, embutidos, entre otros, además de su uso como probióticos⁴⁹.

Paralelamente, existen cepas bacterianas presentes en la vida cotidiana, con las cuales se debe tener especial cuidado, pues pueden representar riesgo para la salud humana si se expone una persona a esta. Con este tipo de microorganismos se va a desarrollar el producto desinfectante, objeto de la presente investigación.

1.5.1 *Staphylococcus aureus*. Su género está formado por cocos agrupados en forma de pares, tetraédricas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son inmóviles, no esporuladas y no poseen cápsula. Se caracteriza por ser una bacteria anaerobia facultativa, la cual se considera como patógena con gran potencial de causar graves infecciones y enfermedades tanto en seres humanos como en animales. Al estar expuesto a contaminación por *S. aureus*, se corre el riesgo desde infecciones en la piel y tejidos blandos hasta graves enfermedades que amenazan con la vida. Su mayor impacto sobre la salud es la creciente resistencia a múltiples antibióticos, entre estos la meticilina y la penicilina⁵⁰. *Staphylococcus aureus* tiene la mayor resistencia de los organismos estipulados por el gobierno para la evaluación de desinfectantes⁵¹. En la ilustración 3 se puede ver su morfología mediante micrografía electrónica por barrido.

⁴⁸ ANGULO, M.A., Presentación "Infecciones en cirugía". Septiembre 2011. En línea. [Consultado: 16 de abril de 2017] <<https://es.slideshare.net/chentu/infecciones-en-cirurgia>>

⁴⁹ RAMÍREZ, J., et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. En: Revista Fuente Año. vol. 2, no. 7

⁵⁰ Cervantes-García, E, et al. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio Vol. 61, n 1. 2014 p. 28.

⁵¹ US PATENT. Antimicrobial composition formulated with essential oils. Inventor: DEATH, S., DEATH, J. Estados Unidos, Patente de investigación. WO 2001084936 A1. 15 de Noviembre de 2001.

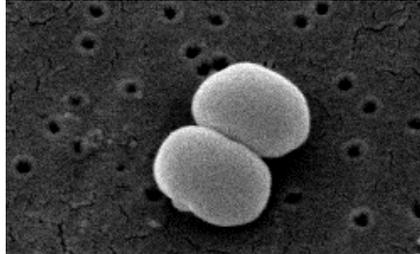
Ilustración 3. Morfología de *Staphylococcus aureus*



Fuente: CDC/ James Archer. U.S. Centers for Disease Control and Prevention - Medical Illustrator⁵²

1.5.2 *Staphylococcus epidermidis*. Esta cepa comparte las características del género con *S. aureus*, en cuanto a su morfología y a su propiedad anaerobia facultativa, lo que la diferencia de *S. aureus* es su estructura en la pared celular. Esta bacteria hace parte de la flora normal de la piel, sin embargo, con respecto a su patogenicidad, *S. epidermidis* produce macromoléculas extracelulares que incrementan su adhesión a la superficie en cuerpos extraños, produciendo flebitis y fiebre. El riesgo de infección radica en su resistencia a antibióticos como la metilicina⁵³. En la ilustración 4 se puede observar su morfología mediante escaneado electrónico.

Ilustración 4. Morfología de *Staphylococcus epidermidis*



Fuente: CDC/ Segrid McAllister - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), #259.⁵⁴

⁵² U.S. Centers for Disease Control and Prevention - Medical Illustrator. 2013. En línea. [Consultado: 29 de abril de 2017] <<https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>>

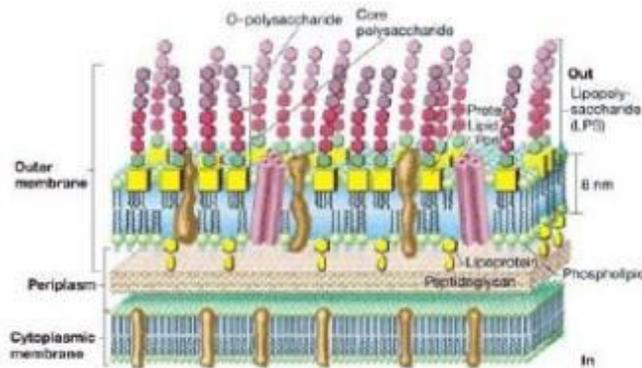
⁵³ Universidad de la República, Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2da Edición. 2006 p 266.

⁵⁴ Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL). 2016. En línea. [Consultado: 29 de abril de 2017] <<https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>>

1.6 BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Tipo de células bacterianas que durante la Tinción de Gram no retienen el colorante en sus paredes celulares. Las paredes de las bacterias Gram negativas son delgadas pero complejas como se observa en la figura 4; tiene cerca de 10 nm de espesor, que consiste en una capa de lipopolisacáridos al exterior de la capa de peptidoglucano⁵⁵.

Figura 4. Esquema de la pared celular en una bacteria Gram negativa.



Fuente: Slide Share – Salud y medicina online⁵⁶

1.6.1 *Escherichia coli*. Es un bacilo anaerobio facultativo que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal en los seres humanos.⁵⁷ De acuerdo con el EMPRES: Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales, las “*E. coli* patógenas se distinguen [...] por causar enfermedades mediante mecanismos genéticamente controlados, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huéspedes, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos”. En los últimos años se ha registrado el aumento de brotes de *E. coli*, esto se debe a su capacidad de adaptación a nuevos entornos, la cual representa un grave riesgo para la salud humana debido a que se encuentra en alimentos y agua de extraña procedencia⁵⁸. En la ilustración 5 se puede observar su morfología.

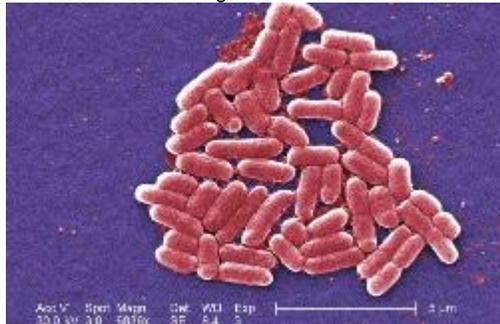
⁵⁵ Cammack, R, et al., Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. 2 Edición. 2008.

⁵⁶ ANGULO, M.A., Op. cit.

⁵⁷ Rodríguez-Angeles, M. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. Vol. 44 n 5. 2002 p 464.

⁵⁸ FAO- División de Producción y Sanidad Animal. EMPRES: Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales.

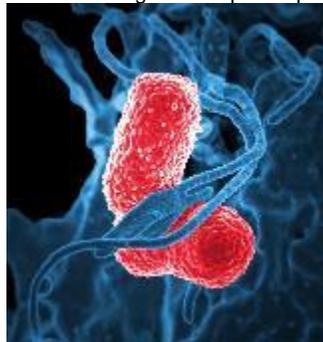
Ilustración 5. Morfología de *Escherichia coli*.



Fuente: National Escherichia, Shigella, Vibrio Reference Unit at CDC ⁵⁹

1.6.2 *Klebsiella pneumoniae*. Son bacilos gram negativos como se observa en la ilustración 6. Sus condiciones óptimas para crecer son en agar nutritivo a 37°C, pH de 7.0 a una presión osmótica de 1 atm⁶⁰. Pueden asimilar y fermentar lactosa mientras produce gas. Se considera una bacteria nociva para el ser humano, debido a que el sistema inmunitario es incapaz de eliminarla y las infecciones ocurren normalmente en entornos sanitarios. Causa graves enfermedades, incluyendo neumonía, infecciones del torrente sanguíneo y meningitis; se ha demostrado que esta cepa bacteriana ha desarrollado resistencia a los carbapemas, un antibiótico de tipo betalactámico.

Ilustración 6. Morfología de *Klebsiella pneumoniae*



Fuente: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)⁶¹

⁵⁹ Haney, J. CDC/ National Escherichia, Shigella, Vibrio Reference Unit at CDC. En línea. [Consultado: 05 de Enero de 2017] <<http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20electron%20microscopy.html>>

⁶⁰ FUNG, C.P., et al., *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. Emerging Infectious Diseases. Vol 19, No. 8. 2012. p. 1322.

⁶¹ DORWARD, D. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). 2014. Public Health Image Library. En línea. [Consultado: 15 de Abril de 2017] < <https://phil.cdc.gov/Phil/details.asp>>

1.7 DISEÑO DE PRODUCTO

Se puede definir como el proceso de idear y establecer los pasos necesarios para el desarrollo y fabricación de un nuevo producto, procedimiento en el cual se requiere un grupo interdisciplinario que consiste en conocimientos de ciencias básicas como la biología, química, que cubra todos los aspectos, partiendo desde la identificación de una necesidad, hasta su manufactura, comercialización y satisfacción del cliente mediante una buena calidad.⁶²

La buena planificación del desarrollo de un producto determina que este sirva para lo que fue concebido y al mismo tiempo tenga un significado para el usuario⁶³. Durante este proceso se describe una extensa variedad de diseños, abarcando desde el sector industrial hasta el sector tecnológico y científico.

1.7.1 Concepción de la idea. Antes de pensar en diseñar un producto, se debe tener en cuenta que su eficacia y funcionalidad dependerá de la mezcla y las proporciones de los componentes en su formulación, razón por la cual es de vital importancia encontrar la mejor mezcla dependiendo del enfoque y al sector específico al que se quiera suplir la necesidad⁶⁴.

Sin embargo, la formulación del producto que proviene de la concepción de la idea, debe tomar en cuenta la normatividad legal establecida por entidades como el INVIMA, el Ministerio de Salud y Protección Social, el Instituto Nacional de Salud, entre otros, en Colombia. Para el caso de productos de aseo y limpieza, más puntualmente, para desinfectantes, se encuentran algunas de las reglamentaciones estipuladas en cuanto a su fabricación, empaque, disposición de residuos, registro sanitario, comercialización, entre otros:

- Artículos 101 – 104 “De los agentes químicos y biológicos” de la Ley 9 de 1979.⁶⁵
- Decreto 1843 de 1991 “Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII Y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguidas”.⁶⁶
- Decreto 1545 de 1998 “Por el cual se reglamentan parcialmente los Regímenes Sanitarios, de Control de Calidad y de Vigilancia de los Productos

⁶² Wagner, G., et. al. Product design and Engineering. Formulation of Gel and Pastes. Vol 1. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2013. p. 1.

⁶³ CHIVA, Ricardo y CAMISÓN, Cesar. Aprendizaje organizativo y sistemas complejos con capacidad de adaptación: implicaciones en la gestión del diseño de producto. 2002. Universitat Jaume p.184.

⁶⁴ Gómez Payán, M., *et al.* Uso de la metodología del diseño por mezclas en el sector agrícola. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. CULCyT, 2015, p. 202.

⁶⁵ Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA. Normatividad Institucional. Documentos INVIMA. Leyes. En línea. [Consultado en: 02 de Junio de 2017]. <<https://www.invima.gov.co/leyes-en-normatividad-institucional.html>>

⁶⁶ *Ibid.*, Decretos. En línea. [Consultado en: 02 de Junio de 2017]. <<https://www.invima.gov.co/decretos-en-plaguicidas-de-uso-domestico.html>>

de Aseo, Higiene y Limpieza de Uso Doméstico y se dictan otras disposiciones”.⁶⁷

- Decisión 706 de 2008 “Armonización de legislaciones en materia de productos de higiene doméstica y productos absorbentes de higiene personal”
- Decisión 721 de 2009 “Reglamento técnico Andino relativo a los Requisitos y Guía de Inspección para el funcionamiento de establecimientos que fabrican productos de Higiene doméstica y Productos Absorbentes de Higiene Personal”.

A su vez, se debe considerar que el producto no atente contra la integridad del cuerpo de las personas, como lo establece la resolución 2715 de 2014, en la cual “se establecen las sustancias que deben ser objeto de registro de control de venta al menudeo, con base en los criterios de clasificación que se definen”; se define que las sustancias que pertenezcan a la categoría 1 de la “Categoría corrosiva cutánea”, es decir, con un pH inferior a 2 o mayor a 11.5, se consideran con efectos irritantes y peligrosos para la piel⁶⁸. Entre estas sustancias se encuentran el ácido sulfúrico solución acuosa al >15%, el ácido clorhídrico solución acuosa al >33% y el hidróxido de sodio solución acuosa >5%⁶⁹.

En cuanto a los protocolos, las entidades como la Farmacopea americana y europea, la AOAC internacional, la FAO y la ASTM son las encargadas de establecer los procedimientos de evaluación de desinfectantes de uso doméstico a nivel internacional, mientras que en Colombia, se rigen por las normas ICONTEC, entre esas normas se encuentran:

- NTC 3416 “Desinfectantes, ambientadores y productos similares. Limpiadores líquidos para vidrio”.
- NTC 2718 “Desinfectantes, ambientadores y productos similares. Insecticidas para uso Doméstico”.
- NTC 3478 “Productos químicos. Plaguicidas de uso doméstico. Rotulado”.
- NTC 5150 “Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad Bactericida básica. Método de prueba y requisitos (Fase 1)”.

Teniendo en cuenta este marco legal y los procedimientos estándar, se puede pasar a la fase de formulación y manufactura del producto, en caso que se desee comercializar en Colombia.

⁶⁷ Secretaría Distrital de Salud. En línea. [Consultado en: 02 de Junio de 2017]. <http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/decreto_1545_1998.pdf>

⁶⁸ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo INSHT. Reglamento CLP. Clasificación de mezclas: peligros para la salud. NTP 974 de 2013. España. p. 3.

⁶⁹ Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 2715 de 2014. En línea. [Consultado en: 02 de Junio de 2017] <<https://www.invima.gov.co/images/pdf/%C3%81cidos-%C3%A1calis/Resoluci%C3%B3n%202715%20de%202014%20sustancias%20objeto%20de%20registro%20de%20control.pdf>>

1.7.2 Formulación y manufactura del producto. Para diseñar mezclas se trabaja con factores experimentales, los cuales en este caso se tratan de ingredientes con un determinado número de componentes, donde la variable respuesta depende de la composición final del producto o del aporte relativo de las proporciones en los aditivos, los cuales cumplen diversas funciones⁷⁰.

Los principales aditivos que hacen parte de la formulación son los denominados coadyuvantes, los cuales aumentan el desempeño del producto trabajando en sinergia con el ingrediente activo⁷¹. El desarrollo de un desinfectante para superficies incluye diferentes formulaciones en las cuales los aditivos cambian para darle diferentes consistencias al producto deseado⁷², de los cuales se destaca:

- **Surfactantes:** Se incorporan en este tipo de productos, principalmente para ayudar a la dispersión o emulsificación del extracto en el vehículo acuoso; además de esto, estos agentes forman espuma, haciendo que el tiempo de contacto entre el producto y la superficie aumente, potenciando el efecto bactericida.⁷³
- **Agente humectante:** Su función es mantener el producto hidratado. Al mismo tiempo, la adición de este aditivo garantiza que el producto tendrá una penetración más profunda entre cavidades y ranuras de la superficie a desinfectar.⁷⁴
- **Agente regulador de pH:** Teniendo en cuenta que esta es una variable trascendental en cuanto al desempeño del producto, se debe establecer un valor de pH en el cuál, se demuestre una efectividad óptima para reforzar su acción bactericida⁷⁵.
- **Agente quelante:** Se agrega en la formulación, debido a que cumple un papel fundamental en cuanto a la vida útil del producto, protegiendo el ingrediente activo contra la acción degradante por metales pesados presentes en sustancias como el regulado de pH y el surfactante. Igualmente, actúa contra contaminantes minerales presentes en el agua utilizada para hacer diluciones y en la superficie objetivo.⁷⁶

Adicional a esto, se debe tener en cuenta el aspecto sensorial y físico del producto, por lo que es muy importante adicionar colorantes y fragancias que

⁷⁰ Gómez Payán, M., *et al. loc. cit.*

⁷¹ DAIGLE, F., *et. al.*, Op. Cit. p. 1.

⁷² Bröckel, U., Meier, W., Wagner, G. Product design and Engineering. Formulation of Gels and Pastes. Wiley-VCH, 2013. p. 1.

⁷³ DAIGLE, F., *et. al.*, Op. Cit (patente) 6 p.

⁷⁴ DAIGLE, F., *et. al.*, *Ibid*, 6 p.

⁷⁵ COOPER, MS. Op. cit. p. 189.

⁷⁶ DAIGLE, F., *et. al.*, *Ibid*, 6 p.

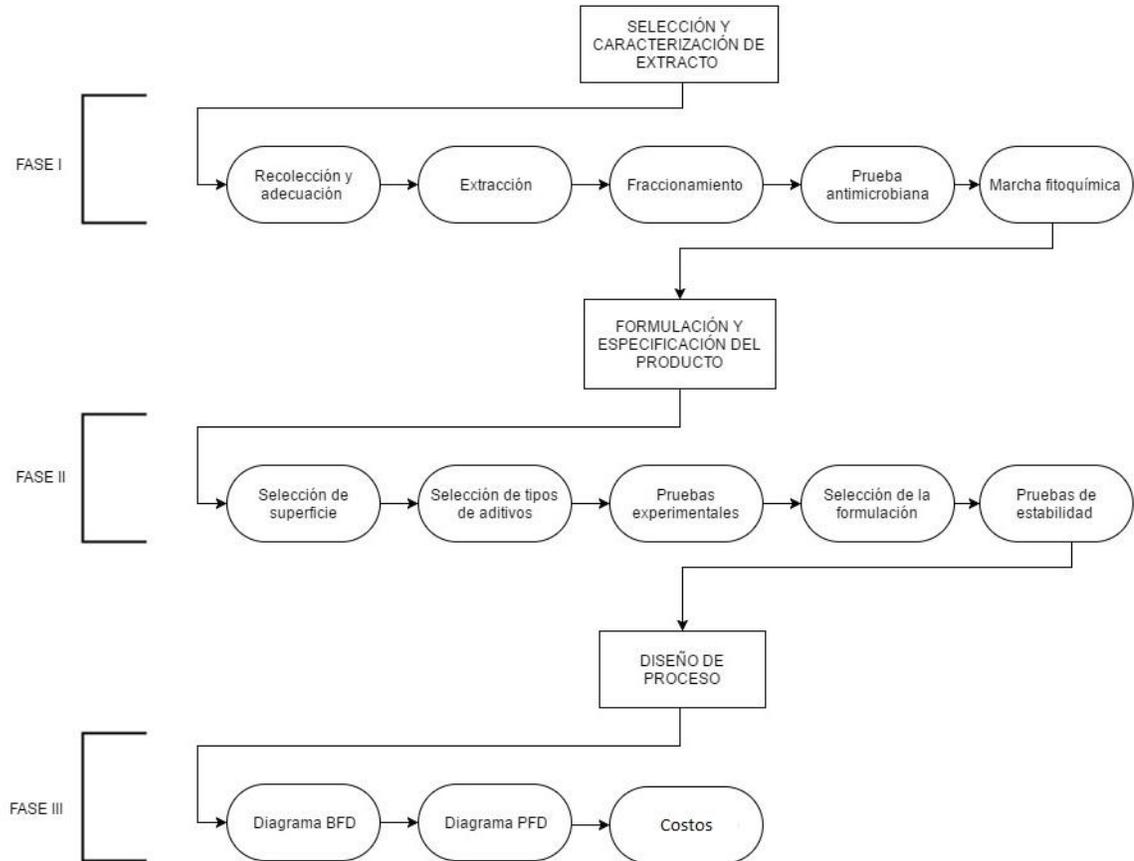
mejoren la apariencia del producto⁷⁷. Una vez establecidos los referentes teóricos que soportan el desarrollo del proyecto, se pasa a describir la metodología que se adapta a estos conceptos y son fundamentados en protocolos estandarizados, los cuales serán clave para llevar a cabo de manera correcta el diseño del producto desinfectante propuesto.

⁷⁷ DAIGLE, F., et. al., Ibid, 6 p.

2. METODOLOGÍA

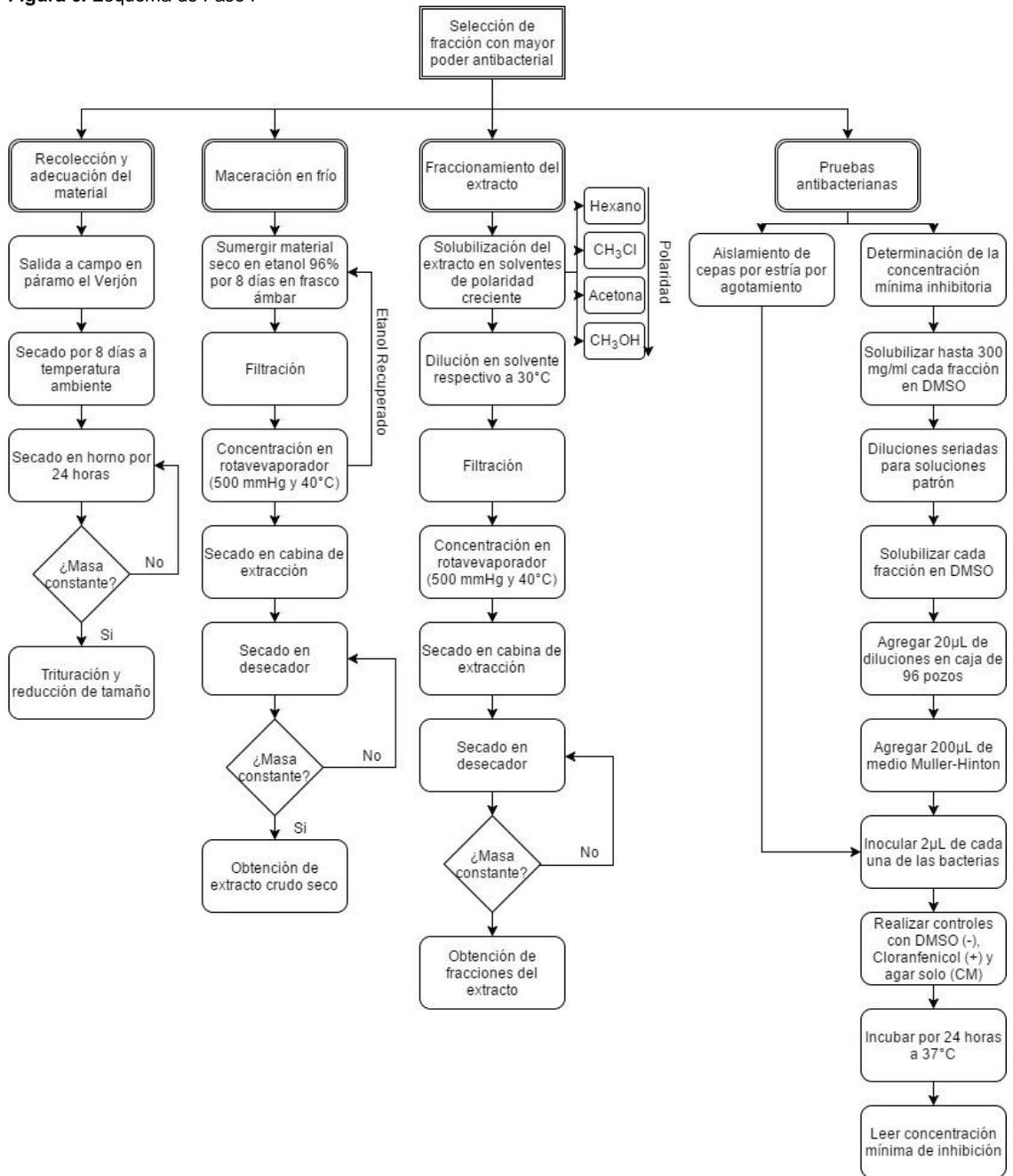
Para el desarrollo secuencial del proyecto, se propuso dividir en 3 fases principales como se muestra en la figura 5: Inicialmente la fase de identificación, fraccionamiento y caracterización de extracto crudo; una segunda fase de formulación y especificación del producto terminado, y finalmente la fase de diseño del proceso junto con la estimación de costos.

Figura 5. Fases para el desarrollo del proyecto.



La finalidad de la fase 1 es determinar la fracción del extracto etanólico con mejor actividad antibacteriana, para lograrlo, se requieren actividades previas, las cuales se muestran de manera esquemática en la figura 6 y cada uno de los pasos correspondientes se explica a continuación.

Figura 6. Esquema de Fase I



2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

2.1.1 Recolección y adecuación de material vegetal. Se colectan hojas, tallos y raíces de la especie, en el páramo el Verjón, el cual queda ubicado a 18 kilómetros de la ciudad de Bogotá, a la espalda del cerro de Monserrate. Para cada material recolectado, se deben registrar los siguientes atributos⁷⁸:

- Localidad: Procedencia geográfica descrita hasta el mayor nivel de detalle posible.
- Coordenadas geográficas: Latitud y longitud del lugar de registro.
- Altitud: Altura sobre el nivel del mar en el punto donde se hizo el registro.
- Fecha: Día, mes y año en formato DD/MM/AAAA
- Número de colección: Número asignado con base en las colecciones del colector principal
- Familia y género: Determinación taxonómica.

La información de recolecta de *D. granadensis* se encuentra en el ANEXO B.

Para almacenar el material vegetal, se utilizan bolsas plásticas transparentes de 30x40 cm, y en estas se depositan las muestras de cada órgano recolectado para evitar que se deterioren las muestras⁷⁹.

Previo a la obtención del extracto crudo, se debe pre-seleccionar hojas que no tengan manchas, hongos o rasgaduras; seguidamente, someter a secado a temperatura ambiente durante 8 días; al culminar el tiempo de secado, se recomienda pesar el material y posteriormente introducirlo en un horno a 40°C por 24 horas, repetir sucesivamente, hasta obtener una masa constante que garantice que todo el material está seco. Posteriormente, realizar una reducción de tamaño del material vegetal, mediante una trituración en licuadora, con la finalidad de aumentar el área de contacto entre el material vegetal y el solvente.⁸⁰

2.1.2 Maceración en frío. Adaptando la metodología propuesta por Sanabria, A. (1997)⁸¹, los extractos etanólicos de hojas de la especie *D. granadensis* se obtienen por maceración con etanol del 96%, empleando 3 relaciones diferentes de material vegetal seco vs. Volumen de etanol: 1/10, 1/20 y 1/40. Para un mayor rendimiento, se llevan a cabo extracciones sucesivas hasta ver un cambio de color significativo en el etanol, lo cual señala una óptima extracción de los compuestos solubles como se indica en la figura 7. Se deja macerar el material vegetal por 24

⁷⁸ Álvarez, Mauricio, et al., Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Programa de Inventarios de Biodiversidad. Grupo de Exploración y monitoreo ambiental (GEMA). 2004 p. 78, 79.

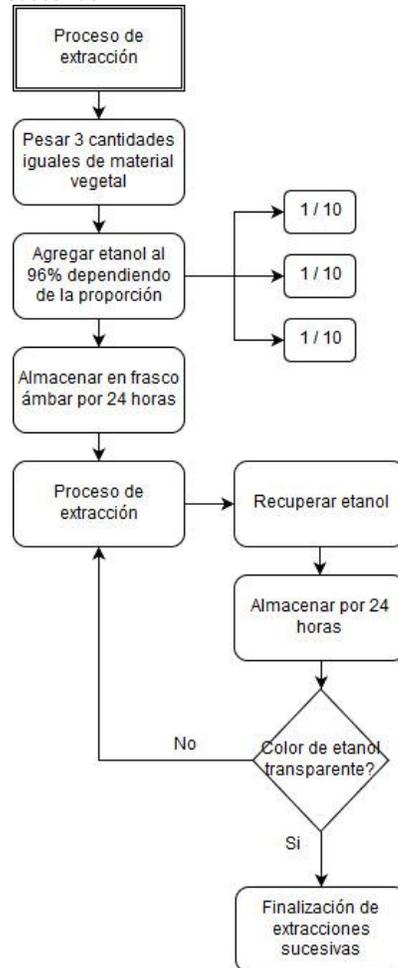
⁷⁹ Ibid., p. 79.

⁸⁰ Sanabria-G, A, et al., Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Revista Colciencias Química Farmacéutica No. 26, 1997, p 15.

⁸¹ Ibid., p. 16.

horas en un frasco ámbar tapado y sin contacto con la luz. Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de filtrado utilizando papel filtro, del cual se obtiene el extracto diluido en el etanol, para seguidamente realizar una concentración del extracto utilizando un rotaevaporador que trabaja a presión reducida de 500 mmHg, hasta que aparentemente el etanol haya sido eliminado. Finalmente, el extracto obtenido se deja en cabina de extracción y posteriormente en desecador para retirar lo que quede de etanol y humedad respectivamente, completando así su concentración.

Figura 7. Proceso de extracciones sucesivas



2.2 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO

Con el fin de identificar el grupo de moléculas que posee actividad biológica en el extracto se desarrolla un fraccionamiento del extracto crudo por medio de solventes de polaridad creciente⁸². Los extractos etanólicos de las hojas, se fraccionaron empleando una metodología de extracción sólido-líquido en frío⁸³, empleando cuatro solventes: hexano, cloroformo, acetona y metanol, (Las fichas de seguridad de cada uno de los solventes se encuentra en ANEXO D).

Para fraccionar el extracto seco, se sigue las instrucciones dadas por la Química Erika Andrea Plazas⁸⁴ y la Ingeniera Agroindustrial Diana Carolina Corzo⁸⁵, quienes recomendaron la elección de los solventes, de acuerdo con los perfiles obtenidos en una prueba por TLC previa del extracto total. Con base en esto, se pone el extracto en contacto con el solvente, en calentamiento a temperatura inferior a 30°C y agitación constante, en la plancha de calentamiento, durante 20 minutos. Posteriormente se filtra y concentra la solución obtenida a presión reducida de 500 mmHg. Según la miscibilidad del extracto, se agregan los solventes en distintas cantidades, hasta observar que el remanente no es soluble, lo cual implica el fraccionamiento efectivo del extracto.

2.3 PRUEBAS ANTIBACTERIANAS

Las pruebas de susceptibilidad antibacteriana son de gran importancia para la presente investigación, debido que proveen la información necesaria para conocer la actividad biológica de la especie. Para ello es necesario probar la efectividad de cada una de las fracciones en las bacterias certificadas por el catálogo ATCC que se muestra en la tabla 4, determinando su concentración mínima inhibitoria.

Tabla 4. Cepas bacterianas para evaluar poder inhibitorio.

Bacteria	ATCC	Clasificación
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	300053	Gram negativa
<i>Escherichia coli</i>	25922	Gram negativa
<i>Staphylococcus aureus</i> *	25923	Gram positiva
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1228	Gram positiva

⁸² RONDINA, R., et. al., Fraccionamiento de extractos vegetales por Extracción Líquido/Sólido Utilizando un Soporte Diatómico Inerte. Acta Farmacéutica Bonaerense. Vol. 10. No. 1. 1991. p. 49 – 53.

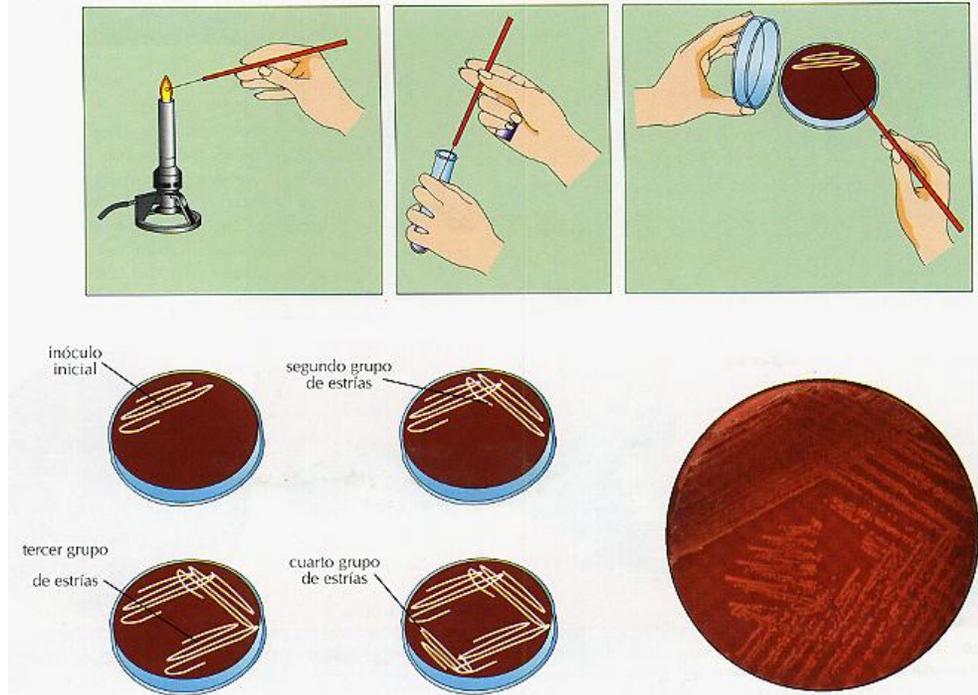
⁸³ Lizcano-R, A y Vergara-G, J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Microbiología Industrial. Bogotá, 2008.

⁸⁴ ENTREVISTA con Erika Andrea Plazas, PhD. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 06 de Febrero de 2017.

⁸⁵ CORZO, D.C., Solventes para fraccionamiento. [correo electrónico] Mensaje enviado a: Daniela Cuervo y Julián Vanegas. 07 de Marzo de 2017. [citado en 02 de Junio de 2017] Comunicación personal.

2.3.1 Aislamiento de las bacterias. Sembrar las bacterias provenientes de caldos nutritivos en cajas petri con agar Mueller-Hinton solidificado. Con el fin de formar unidades de colonias, se realizaron aislamientos por medio de la técnica de agotamiento por estría cruzada en placa, empleando asas redondas y esparciendo la bacteria sobre el agar⁸⁶ como se explica en la figura 8.

Figura 8. Proceso de aislamiento por estría cruzada



Fuente: Universidad de Salamanca. Aula Virtual.⁸⁷

2.3.2 Determinación de la CMI. Se adapta el método “*spot culture growth Inhibition SPOTi*”⁸⁸, el cual sigue el protocolo del “*MIC Test*”⁸⁹, cuyo procedimiento se describe a continuación:

- a. Solubilizar las fracciones de extracto en DMSO hasta formar una solución stock de cada una de concentración de 300mg/ml.
- b. Realizar seis diluciones seriadas de las soluciones stock en una placa de 24 pozos, empezando con 100µL en el primer pozo y agregando la mitad del volumen en el siguiente.

⁸⁶ Alarcón, L.R y Olivas, E. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. Departamento de ciencias básicas de ICB. Academia de Microbiología y Parasitología. 2004, p. 17.

⁸⁷ Imagen tomada de: http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/document/uni_02/56/cap309.htm. [Consultado: 02 de Junio de 2017]

⁸⁸ Rizi, K, et al., Development of a rapid reliable and quantitative method – “SPOTi” for testing antifungal efficacy. Journal of Microbiological Methods. 2015, p 37.

⁸⁹ MICROCHEM Laboratory. Minimum Inhibitory Concentration Test (MIC). En línea. [Consultado: 24 de abril de 2017]. < <http://microchemlab.com/test/minimum-inhibitory-concentration-test-mic-0>>

- c. Completar en cada pozo un volumen de 1000µL con medio de cultivo Muller-Hinton hasta conseguir concentraciones finales evaluadas: 30, 15, 7.5, 3.8, 1.9 y 0.9 mg/mL; este proceso se realiza por triplicado como se observa en la ilustración 7.
- d. Al momento en que se gelatiniza el medio, se inocula cada pozo con una alícuota de 2µL de la solución bacteriana en el centro de cada pozo. Las placas se sellan e incuban durante 24 horas a 37°C.

El inóculo de la bacteria es preparado en solución salina a una concentración microbiana de aproximadamente 1.5×10^6 UFC/ml, comparando con el tubo 0,5 de la escala turbidimétrica de Mcfarland.

Se debe observar la inhibición del crecimiento a las diferentes concentraciones, tomando como CMI la concentración más baja a la cual se observó la inhibición del crecimiento del microorganismo. Se realizan cuatro controles para asegurar la efectividad del método:

- **Control negativo (-):** Se añadió 100 µL de DMSO, se completó a 1000µL de medio de cultivo y 2µL de bacteria. El objetivo de este control es asegurar que el solvente no afecta negativamente el crecimiento de la bacteria y toda acción bactericida sea por efectos del extracto.
- **Control positivo (+):** Se añadió 100µL de antibiótico Cloranfenicol, 900µL de medio de cultivo y 2µL de bacteria. Al estar en presencia de antibiótico, se asegura que la bacteria no crezca y se pueda comparar con las concentraciones de extracto donde hay inhibición del crecimiento.
- **Control del medio (CM):** Se agregó únicamente 1000µL de medio de cultivo, sin inóculo de bacteria, con el fin de garantizar que el agar no esté contaminado por agentes externos.
- **Control de crecimiento (CC):** Se agregar 1000 µL de agar y 2 µL de bacteria, con el fin de garantizar que la bacteria crece en condiciones normales, no está contaminada y se puede comparar el crecimiento de ésta con el de los extractos.

Ilustración 7. Estructura de cajas para CMI.

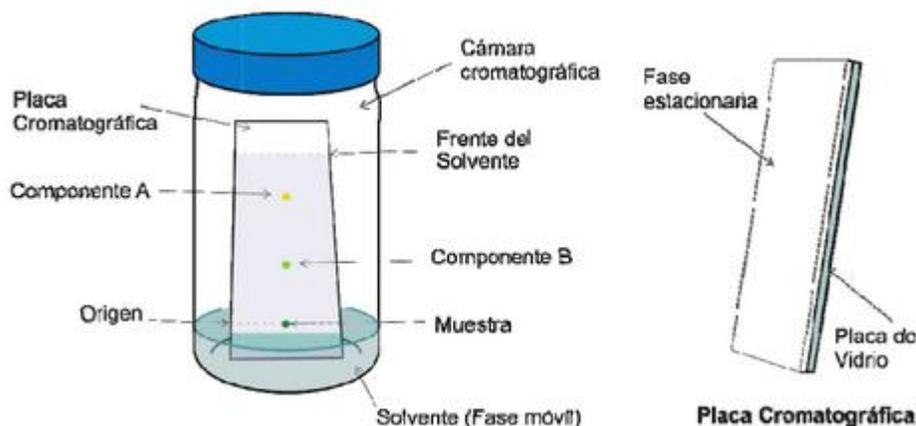


2.4 MARCHA FITOQUÍMICA

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas antibacterianas, se llevan a cabo métodos cualitativos para la identificación de posibles metabolitos secundarios presentes en la fracción con mayor actividad bactericida de *Drimys granadensis*. De acuerdo a esto, se emplea el método de separación por cromatografía en capa fina (TLC), el cual consta de un sistema de dos fases (ver figura 9):

- Fase sólida o estacionaria: se constituye por una capa delgada absorbente (usualmente hecha de sílica gel), la cual es fijada a una placa de vidrio, aluminio o plástico que actúa como soporte⁹⁰. En este caso, se utiliza una placa de sílica gel Z193291-1PAK marca Sigma – Aldrich®.
- Fase móvil o eluyente: es un líquido o solvente que transita a través de la fase estacionaria⁹¹.

Figura 9. Fases de cromatografía por capa fina (TLC)



Fuente: Anderson, F. y Martínez, P.N., Experimentos de Química Orgánica con enfoques en ciencias de la vida. 2013.

Para analizar el extracto, se aplica una gota de la muestra cerca del borde inferior de la columna de la fase estacionaria, dejando una mancha circular, la cual se deja secar por unos segundos. A esa mancha se le llamará “punto de siembra”. Seguidamente, se sumerge la placa en la cámara y se tapa. En ese momento, el solvente se absorbe y asciende a través de la fase sólida por capilaridad⁹², arrastrando consigo los componentes por polaridad creciente o decreciente, dependiendo del solvente empleado como eluyente. A medida que se va llevando a cabo el procedimiento, la separación de la muestra dejará diferentes marcas como se observa en la figura 9. Antes de que la fase móvil llegue al final de la placa,

⁹⁰ Anderson, F. y Martínez, P.N., Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Universidad del Quindío. 2013, p. 101 – 102.

⁹¹ Ibid., p- 101.

⁹² Walton, H.F. y Reyes, J., Análisis Químico e instrumental moderno. Barcelona, España. 2005, p. 323.

esta se retira y se marca con un lápiz la posición del punto de siembra y de la altura a la que llega el eluyente, esta distancia será la que recorrió el disolvente durante la separación.

Según Bilbao, M.R., algunos de los solventes utilizados para TLC en polaridad decreciente son: agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, tolueno, éter de petróleo y hexano⁹³. De acuerdo con Spangenberg, B., los solventes tienen dos funciones en la cromatografía: son los encargados del desplazamiento de la muestra y de crear la separación entre componentes. Para disolver una sustancia se requiere una integración de esta en el solvente, lo cual se logra a través del incremento de la energía de solvatación y la entropía del solvente⁹⁴. Se sugiere que, al mezclar dos solventes miscibles entre sí, se obtiene un comportamiento donde ambas sustancias pierden su estructura individual, favoreciendo una partición de un solvente en el otro, y dependiendo de la efectividad de la sustancia, puede favorecer a su función en el proceso de TLC⁹⁵.

En la presente investigación, se decidió que para separar los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo y en la fracción con mayor poder antibacterial de *Drimys granadensis*, se emplea una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 7:3 respectivamente, método empleado por MARTIN, J.J., *et. al.*,⁹⁶ de la Universidad de Filipinas, Diliman, y recomendado por la química Doris Gutiérrez de la Universidad Nacional de Colombia⁹⁷.

La ventaja de TLC es la simplicidad en la cualificación de la separación: los componentes de colores se pueden ver a simple vista y aquellos que absorben luz por debajo de los 400 nm se agrega un tinte fluorescente en la placa. Por otro lado, al iluminar la placa con una lámpara de 256 nm y 366 nm, revelará componentes con fluorescencia nativa. Bajo estas condiciones, todos los metabolitos secundarios se pueden observar normalmente, sin embargo, si los métodos anteriores no son suficientes, la exposición de la placa a vapores de yodo, enriquece la fase estacionaria y facilita el reconocimiento de estas sustancias⁹⁸. En este orden de ideas, el TLC se caracteriza por ser un método abierto, es decir, su placa es accesible y facilita la aplicación de agentes reveladores, cuya función es detectar y resaltar componentes que no se distinguen muy bien a simple vista por medio de reacciones químicas⁹⁹. La aplicación de estas sustancias se hace mediante spray, esparciendo el revelador en platos de

⁹³ Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar. Química de Productos Naturales. Universidad del Quindío. Facultad de ciencias básicas y tecnológicas. Programa de Química de Productos Vegetales. 1997, p. 173.

⁹⁴ Spangenberg, B. Quantitative thin-layer chromatography, chapter 4: The mobile phase in adsorption and partition chromatography. p. 81, 82. 2011.

⁹⁵ *Ibid.*

⁹⁶ MARTIN, J.J., *et. al.*, TLC profiles and antibacterial activity of *Glinus oppositifolius* L. Aug. DC. (Molluginaceae) leaf and stem extracts against bacterial pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2015. Vol. 5. No. 7. p. 571.

⁹⁷ ENTREVISTA con Doris Feney Gutiérrez, Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Bogotá, 06 de Abril de 2017.

⁹⁸ Spangenberg, B. Op. cit. Chapter 7: Specific Staining Reactions. p. 155.

⁹⁹ *Ibid.*, p. 157.

10 x 10 cm o 10 x 20 cm; aunque existen aproximadamente 300 agentes reveladores¹⁰⁰, son suficiente 5 de ellos para obtener el 70% de todas las aplicaciones en una cromatografía¹⁰¹ en la presente investigación se emplean tres de los más usados para cumplir el objetivo de la identificación cualitativa (Para ver la preparación de los reactivos, ver ANEXO F), se utiliza:

- Vainillina: Es considerado el revelador de aldehído más importante. Se empleó en conjunto con ácido sulfúrico y ácido fosfórico. La vainillina-ácido sulfúrico se utiliza para detectar esteroides, aceites esenciales, terpenos, carotenoides, fenoles, flavonoides, ácidos grasos, entre otros. La vainillina-ácido fosfórico se usa en específico para detectar esteroides y triterpenos, con el fin de revelar el núcleo esteroideal de cardiotónicos¹⁰².
- Cloruro férrico: El agente revelador. La placa se sumerge 1 segundo en esta solución y seguidamente, se calienta a 110°C por 10 minutos. Mediante esta prueba se reconocen fenoles, especialmente flavonoides, formando zonas de color rojo, verde o azul-violeta y taninos con coloración azul.¹⁰³
- Reactivo Liberman-Bouchard: Este agente revelador se enfoca en reaccionar para determinar la presencia de esteroides y/o triterpenoides libres. Se humedece la placa mediante aspersion con este reactivo y se observa si hay aparición de manchas con tonalidades del rojo, verde o azul, que indica positivo¹⁰⁴.

¹⁰⁰ *Ibíd.*, p. 168.

¹⁰¹ *Ibíd.*, p. 170.

¹⁰² Carvajal, L., et. al., Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesiana* Krukoff). *Revista Colombia Forestal* Vol. 12. 2009. p. 165.

¹⁰³ *Ibíd.*, p. 189.

¹⁰⁴ Carvajal, L., et. al., *Op. cit.* p. 164.

Para corroborar los resultados obtenidos empleando el método TLC, se llevó a cabo procedimientos descritos por Sanabria, A¹⁰⁵, citados por Bilbao, M.R., para la identificación por medio de agentes reveladores en las posteriores pruebas.

2.4.1 Flavonoides. Se determina la posible presencia de flavonoides a través de la prueba Shinoda, cuyos pasos se describen en la figura 10.

Figura 10. Procedimiento cualitativo de flavonoides



Fuente: Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar¹⁰⁶

En este procedimiento se recomienda usar un patrón de hesperidina para comparar su color. También se debe tener en cuenta que la coloración puede cambiar ocasionalmente a azul o verde, dependiendo del tipo de flavonoide presente en la muestra¹⁰⁷.

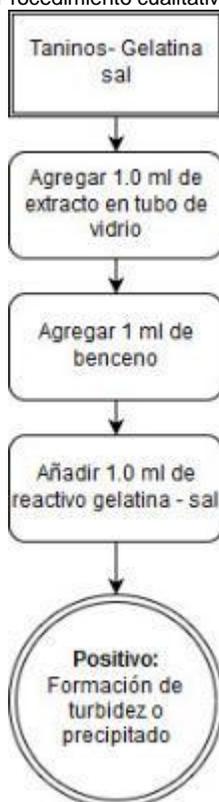
¹⁰⁵ Sanabria-G, A, et al., Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas Op. cit. p 16-18.

¹⁰⁶ Bilbao, M.R., Op. cit., p. 36

¹⁰⁷ *Ibíd.*, p. 36.

2.4.2 Taninos. Existen dos grandes grupos de taninos: los hidrolizables, los cuales se caracterizan por “liberar compuestos fenólicos individuales y la unidad de carbohidrato”¹⁰⁸ mediante hidrólisis, y los condensables, que, por el contrario, “incrementan su grado de polimerización, produciendo sustancias amorfas insolubles, frecuentemente rojas, llamadas Flobafenos”¹⁰⁹. Para reconocer cada uno de estos tipos de taninos, se implementaron dos pruebas: Cloruro férrico para reconocer presencia de los compuestos fenólicos (Por TLC) y Gelatina-sal, para identificar la presencia de taninos condensables en la muestra (observar figura 11).

Figura 11. Procedimiento cualitativo de Taninos



Fuente: Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar¹¹⁰

Se recomienda usar solución de ácido tánico al 10% como patrón en la prueba Gelatina-sal para comparar sus resultados.

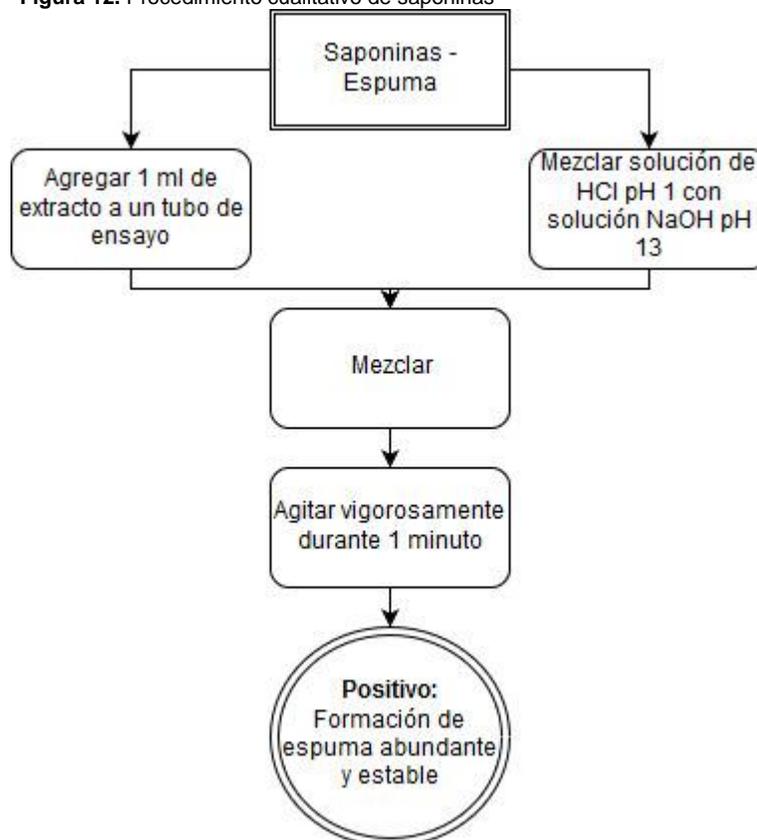
¹⁰⁸ Bilbao, M.R., Op. cit. p. 32

¹⁰⁹ Ibíd.

¹¹⁰ Ibíd., p. 33 – 35.

2.4.3 Saponinas. Se realizó la prueba de espuma para determinar presencia de saponinas en el extracto, como se observa en la figura 12.

Figura 12. Procedimiento cualitativo de saponinas



Fuente: Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar¹¹¹

El efecto de las saponinas es disminuir la tensión superficial del agua, produciendo espuma de 2 cm de altura que se sostiene hasta media hora¹¹².

¹¹¹ *Ibíd.*, p. 74.

¹¹² *Ibíd.*, p. 74.

2.4.4 Alkaloides. Para la prueba de alcaloides, se empleó el método con reactivo Dragendorff, el cual usa como mecanismo de detección, pruebas de precipitación en medio ácido, utilizando para ello, sales de metales pesados como el ioduro de potasio¹¹³. El procedimiento se especifica en la figura 13.

Figura 13. Procedimiento cualitativo de alcaloides



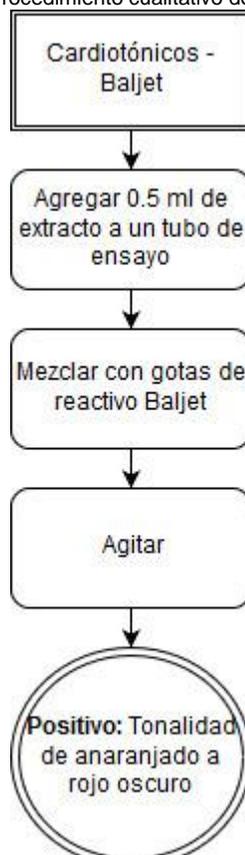
Fuente: Carvajal, L., et. al., Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesiana* Krukoff)¹¹⁴.

¹¹³ Carvajal, L., et. al., Op. cit. p. 165.

¹¹⁴ *Ibíd.*, p. 165.

2.4.5 Cardiotónicos. Estos compuestos tienen características estructurales parecidas a las saponinas¹¹⁵, para determinar la presencia de estas moléculas, se llevó a cabo el procedimiento con reactivo Baljet, el cual se describe en la figura 14.

Figura 14. Procedimiento cualitativo de cardiotónicos



Fuente: Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar¹¹⁶

¹¹⁵ *Ibíd.*, p. 165.

¹¹⁶ Bilbao, M.R., *Op. cit.* p. 67

2.4.6. Quinonas. Para la determinación de estos metabolitos se emplea la prueba de reducción con Zn y ácido clorhídrico, como se observa en la figura 15.

Figura 15. Procedimiento cualitativo de quinonas



Fuente: Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar¹¹⁷

¹¹⁷Ibíd., p. 42.

2.5 FORMULACIÓN DEL DESINFECTANTE

Como primer paso para definir la formulación del producto, es necesario establecer a qué tipo de superficie va dirigido y cuál es la necesidad identificada. Según lo definido en el paso anterior, se pasa a especificar las sustancias y aditivos que se mezclan con el extracto, por medio de investigación a partir de productos comerciales similares al que se desea desarrollar, mediante fuentes de información como US Patent y Knovel. Paralelo a esto, se investigan los ingredientes que se emplean en productos comerciales que se venden en almacenes de cadena como el Éxito, Jumbo, Homecenter, entre otros, con el fin de realizar una comparación posterior entre la efectividad con respecto al producto, cuyo ingrediente activo o agente desinfectante es la fracción de extracto con mejor poder antibacterial, definido en las pruebas de inhibición previas.

Con el fin de determinar una formulación eficiente, se propone un diseño de experimentos factorial 1^3 con tres réplicas, para un total de 9 pre-formulaciones (Ver tabla 5), donde se evalúa como factor el nivel de pH del producto, al ser la variable directamente responsable de la adherencia de los microorganismos a las moléculas de desinfectante¹¹⁸. Se fijaron como constantes:

- Concentración de ingrediente activo: Debe estar por encima de la concentración mínima inhibitoria para evitar que se pierda la efectividad del producto a través del tiempo.
- Tiempo de contacto: De acuerdo con el estudio hecho por Alba, N. y Araujo, F¹¹⁹., los tiempos para los desinfectantes, en general, deben ser superiores a 5 minutos para eliminar la carga microbiana presente en la superficie. De acuerdo a la técnica de Coeficiente fenólico de la AOAC¹²⁰, se especifica que el tiempo para calcular este coeficiente es a los 10 minutos, razón por la cual se decide definir este, como tiempo de contacto.
- Temperatura: Para efectos prácticos, se decide fijar esta variable como la temperatura ambiente en la ciudad de Bogotá, la cual, según predicciones climáticas de la empresa AccuWeather¹²¹ está en 18°C.
- Presencia de material extraño: No hay presencia de este tipo de materiales, debido a que se realiza una limpieza previa en el área de desinfección.
- Tipo de aditivos: se deciden con base en las comparaciones con productos similares.

¹¹⁸ COOPER, MS., Op. cit. p. 189.

¹¹⁹ ALBA, N.E. y ARAUJO, F.L., Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de Fitoterapéuticos en laboratorios Pronabell LTDA. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 2008. p. 72

¹²⁰ AOAC International (2000) citado por ALBA, N.E. y ARAUJO, F.L., Op.cit., p. 47.

¹²¹ AccuWeather, Inc. Colombia Tiempo meteorológico. Pronóstico mensual. En línea. [Consultado el 27 de mayo de 2017] < <http://www.accuweather.com/es/co/bogota/107487/january-weather/107487>>

Tabla 5. Influencia de pH y concentración de extracto en la formulación

Experimento			
		Réplicas	
pH	pH ₁ - C _x	pH ₁ - C _x	pH ₁ - C _x
	pH ₂ - C _x	pH ₂ - C _x	pH ₂ - C _x
	pH ₃ - C _x	pH ₃ - C _x	pH ₃ - C _x

Se realizan tres ensayos, siguiendo el procedimiento descrito en la figura 16. Una vez se completan las pre-formulaciones, se debe evaluar para cada una, las características organolépticas descritas en la sección 2.6.1. Se realizan tres réplicas experimentales conformadas por 3 repeticiones internas. Usando estadística descriptiva y una prueba de Tukey, se determina la diferencia significativa entre los tratamientos, y se escoge la mejor alternativa.

Figura 16. Proceso de manufactura del producto



A partir de la definición de variables y el diseño de experimentos, se obtiene como variable respuesta una mejor efectividad en el producto. Teniendo en cuenta el pH óptimo y la cantidad de regulador que se debe incluir en la formulación, se cuantifica la concentración de cada uno de los otros aditivos, para que el producto aumente su valor en cuanto a funcionalidad y estabilidad.¹²²

¹²² FLAMENCO, José W. y GUEVARA, Glenda I. Op. cit., p. 205.

2.6 PRUEBA DE ESTABILIDAD A TIEMPO REAL

Una vez preparadas las nueve pre-formulaciones descritas en la sección 2.5, se envasan en recipientes de polietileno de alta densidad y se almacenan en la intemperie, a temperatura ambiente, con exposición a la luz artificial y natural en anaquel, bajo estas condiciones se presentan cambios bruscos de temperatura e incidencia directa del sol, por lo cual se espera una mayor degradación en la apariencia del producto, que si se almacenara a temperatura constante y en oscuridad¹²³; para monitorear la estabilidad a tiempo real del producto, se adapta el método seguido por Restrepo, M., *et. al.*,¹²⁴ se hace un seguimiento diario durante 15 días a los cambios de pH mediante un pHmetro marca Spectrum modelo SoilStick, en los nueve frascos y se llevan a cabo pruebas organolépticas visuales.

2.6.1 Pruebas organolépticas. Se evalúa cualitativamente la apariencia física del producto en el día 0 (es decir, el mismo día de su elaboración) y en el día 15, bajo las mismas condiciones que la sección 2.6. Se hacen mediciones especificadas a continuación, con el fin de seleccionar la pre-formulación más agradable y llamativa.

- **Color:** Llenar 2 tubos de ensayo: uno con el desinfectante a examinar y otro con una solución con todos los ingredientes (a excepción del extracto) como blanco. Ubicar ambos tubos sobre una fuente de luz blanca y observar los tubos desde arriba en posición vertical, sobre la fuente de luz¹²⁵. Comparar el color en ambos tubos.
- **Transparencia:** Agregar 10.0 ml del desinfectante en beaker de capacidad adecuada y observar a la luz natural¹²⁶.
- **Partículas extrañas:** Verter 10.0 ml del producto en un beaker de capacidad adecuada, posteriormente, agitar vigorosamente la solución y observar si la solución contiene partículas extrañas suspendidas¹²⁷.

¹²³ RESTREPO, M., *et. al.*, Sustitución de tartazina por betacaroteno en la elaboración de bebidas no alcohólicas. Revista Lasallista de Investigación – Vol. 3, No. 2. 2007. p. 11.

¹²⁴ *Ibid.*, p. 8

¹²⁵ FLAMENCO, José W. y GUEVARA, Glenda I. *Op. cit.*, p. 62

¹²⁶ *Ibid.*, p. 62.

¹²⁷ *Ibid.*, p. 62.

2.6.2 Pruebas comparativas *in vitro*. Una vez se obtiene las pre-formulaciones a una concentración fija, se mide la efectividad del producto en 3 valores diferentes de pH, como se indica en la sección 2.5. Para la prueba *in vitro*, se adapta la metodología “AOAC Use Dilution test”¹²⁸ de la Farmacopea Americana, para realizar la prueba de difusión de disco de Kirby- Bauer¹²⁹, la cual consiste en:

- a. Sembrar 100 µl de una cepa bacteriana en una superficie seca de agar Mueller-Hinton en caja de Petri, mediante la técnica de siembra masiva. Se debe asegurar que la bacteria esté de manera uniforme en toda el área.
- b. Dejar la tapa abierta de 3 a 5 minutos, para retirar exceso de humedad en la superficie, antes de disponer los discos.
- c. Se disponen 3 discos hechos en papel de filtro de 6mm de diámetro, equidistantes en la caja de Petri.
- d. Agregar 10µl del producto que se desee evaluar, en cada uno de los discos.
- e. Las placas se cierran con vinipel, se invierten y se colocan en una incubadora a 35°C dentro de los 15 minutos después de aplicar los discos.
- f. Esperar 24 horas. Se examina la caja y se mide el diámetro de halos de inhibición con una regla. Si se sembró de manera correcta, las zonas de inhibición se evidenciarán como círculos uniformes alrededor de los discos, como se observa en la ilustración 8.

El halo de inhibición representa la efectividad del producto, dependiendo del diámetro del halo que se forme; entre más grande, más efectivo será el desinfectante.

Ilustración 8. Prueba de halo de inhibición



¹²⁸ Association of analytical communities (AOAC) International, Citado por Microchem Laboratory. Use Dilution Test (AOAC 955.14; 955.15; 964.02). En línea. [Consultado: 24 de Abril de 2017] <<http://microchemlab.com/test/aoac-use-dilution-test-aoac-95514-95515-96402>>

¹²⁹ HUDZICKI, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. 2009. En línea. [Consultado el 27 de Abril de 2017] <<http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189>>

2.6.3 Pruebas comparativas *in vivo*. Para probar la eficacia del producto en una superficie, se lleva a cabo el método de hisopo especificado en la “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y bebidas”¹³⁰ para la toma de muestras y se adapta el método “Hard Surface Time-Kill” que se encuentra en la ASTM E1153-14¹³¹. El método consiste en:

- a. Delimitar un área de 100 cm² en una mesa de un material específico (los materiales más comunes por la farmacopea americana¹³² se pueden observar en la tabla 6) que se encuentre “contaminada”.
- b. Humedecer hisopo de algodón en solución salina 0.85% y presionar en paredes del tubo para retirar exceso.
- c. Con el hisopo húmedo, frotar 4 veces en la superficie delimitada, con un ángulo de 30°, cada una en dirección opuesta a la anterior. Se repite este procedimiento en 6 áreas delimitadas, usando hisopos y tubos con solución salina diferentes.
- d. Colocar simultáneamente, los hisopos en sus respectivos tubos durante 2 minutos; retirar y desechar los hisopos.
- e. Agregar 300µl del producto a evaluar en las mismas superficies delimitadas y dejar actuar por 10 minutos.
- f. Usando otros hisopos, repetir el procedimiento de toma de muestra en los literales C y D.
- g. Cultivar por siembra masiva en cajas de Petri con agar nutritivo, cada una de las muestras tomadas antes y después de la aplicación del desinfectante.
- h. Cerrar las cajas y colocar en incubadora a 35°C por 24 horas.
- i. Cuantificar la concentración de microorganismos mediante conteo de UFC y comparar la disminución en las colonias que se formaron.

¹³⁰ Normas Legales. Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y bebidas. Perú. 2007. p. 4.

¹³¹ ASTM E1153-14, Standard Test Method for Efficacy of Sanitizers Recommended for Inanimate, Hard, Nonporous Non-Food Contact Surfaces, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014. En línea. [Consultado el 27 de abril de 2017] < <https://www.astm.org/Standards/E1153.htm> >

¹³² US Pharmacopeial Convention. USP 31 <1072> Disinfectants and antiseptics. Disinfectant Challenge Testing. En línea. [Consultado: 24 de Abril de 2017] <http://www.uspbpep.com/usp31/v31261/usp31nf26s1_c1072.asp>

Tabla 6. Superficies más comunes

Material	Aplicación
Acero inoxidable	Superficies de trabajo
Vidrio	Ventanas y recipientes
Plástico, vinilo	Cortinas
Plástico, policarbonato	Revestimiento de aislamiento
Plexiglas (Polimetilmetacrilato)	Escudos
Yeso reforzado con Epoxi	Paredes y techos
Plástico reforzado con fibra de vidrio	Revestimiento de pared
Azulejos de terrazo	Pisos

Fuente: US Pharmacopeia online¹³³

2.7 DISEÑO DE PROCESO Y COSTOS

Con base en los resultados obtenidos a nivel laboratorio, se evalúa la viabilidad del proceso de obtención del producto por medio de una propuesta de diseño preliminar, la cual se establece a partir de la elaboración de un diagrama BFD, a través del programa Microsoft® Visio 2013, que defina la secuencia y las operaciones unitarias en cada fase del proceso; seguidamente, se elabora un diagrama PFD en el programa Microsoft® Visio 2013, definiendo equipos y corrientes con sus respectivos balances de masa, desde la recepción de las hojas, hasta obtener el producto terminado, envasado y etiquetado.

Anexo a esto, se evaluarán los costos de la propuesta preliminar, teniendo en cuenta costos de materia prima, aditivos, inversión de equipos nuevos, corrientes de servicio, y dándole un valor de utilidad al producto terminado para calcular el costo neto del proceso.

¹³³ Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 30. Vol. 1. <1072> Desinfectantes y antisépticos. 2007. p. 558.

3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN

Esta sección hace referencia a la fase inicial de la metodología; comprende todo el acondicionamiento de la materia prima (hojas de *Drimys granadensis*) y la selección e identificación de metabolitos secundarios con la mejor actividad antibacterial. Esta fase preliminar será la base para la formulación del producto.

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

El material recolectado en campo se caracteriza de acuerdo al protocolo de muestreo descrito en la sección 2.1.1 de la metodología, en el cual se recogen hojas con los registros especificados en el ANEXO B.

Una vez cumplido el protocolo de la recolección, se pasa a seleccionar hojas sanas, es decir, que no tengan hongos, huecos o manchas (ver ilustración 9).

Ilustración 9. Hojas recolectadas y seleccionadas



La tabla 7 muestra el peso de las hojas recolectadas, según la fecha de salida de campo. Paralelamente, se determina la humedad en la muestra, a través del método de masa constante (ver ecuación 1).

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de humedad en la muestra

$$\%Humedad = \frac{Peso\ total - Peso\ seco}{Peso\ total} \times 100\%$$

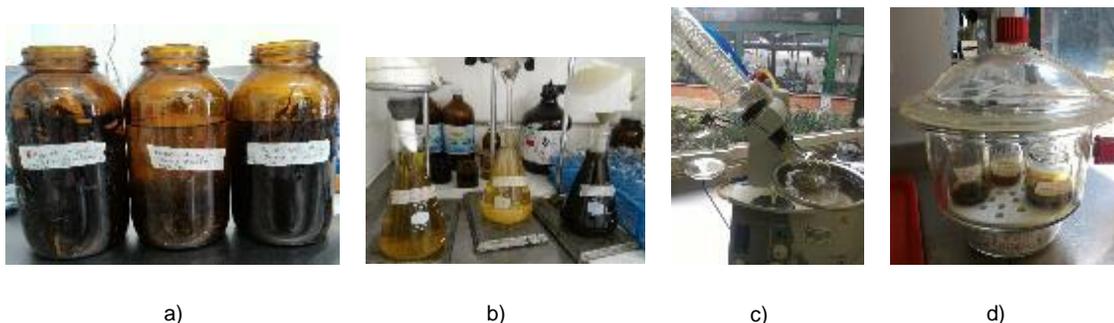
Tabla 7. Peso recolectado según fecha de salida

Fecha	Peso de hojas (g)		
	Dic-2016*	Feb-2017	Mar-2017
Peso total	-	499.500	139.903
Peso seco	86.012	225.075	62.378
Humedad (%)	-	45.06%	55.41%
Humedad promedio (%)	50.24%		

*El mes de diciembre se recibió el material seco, razón por la cual no se cuenta con registro de peso total y por lo tanto, no es posible calcular la humedad en esa muestra.

Se debe tener en cuenta que la humedad varía según las condiciones climáticas en el momento de la recolección, la temporada de lluvias y la hora exacta del muestreo. Para efectos prácticos, se decide promediar los valores de humedad para obtener un valor aproximado, el cual fue de 50.24%. Este alto valor de humedad en la muestra, refleja la importancia del método gravimétrico de masa constante, debido a que se obtiene una gran cantidad de agua, la cual puede confundirse con el peso de la hoja seca, y dar valores erróneos de rendimientos. Una vez se seca todo el material, pasa al proceso de maceración en etanol al 96%, el cual se muestra en su desarrollo a través de la ilustración 10.

Ilustración 10. Proceso de maceración



Donde:

- a) Material sumergido en etanol al 96% y almacenado en frascos ámbar.
- b) Filtrado previo a la concentración del extracto
- c) Proceso de concentración en rotaevaporador Heidolph
- d) Extracción en cabina LEX C-4 y proceso de secado en desecador Vakuumfest

El extracto etanólico obtenido se caracteriza de manera física, con el fin de conocer parámetros básicos del material tratado; aquellas propiedades se presentan en la tabla 8. Paralelamente, se divide en 3 partes iguales el peso de hojas secas para cada una de las recolecciones, y estas, se disponen en diferentes frascos ámbar. Se agrega la cantidad de etanol al 96% que requiere para su maceración y extracción, obteniendo los resultados que arroja la tabla 9 para peso seco de extracto.

Tabla 8. Características físicas de los extractos etanólicos.

Propiedades	
Tipo de extracto	Blando
Olor	Herbal
Color	Verde oscuro
Textura	Blanda

Tabla 9. Peso de extracto crudo seco por cada fecha de recolección.

Fecha recolección	Peso 1/10 (g)	Peso 1/20 (g)	Peso 1/40 (g)
Dic-2016	6.789	6.542	6.855
Feb-2017	17.766	17.121	17.938
Mar-2017	5.057	4.911	4.867

Nota: Las proporciones que se muestran con los pesos obedecen a cantidad de material vegetal vs. Volumen de etanol.

3.2. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Una vez caracterizado el material vegetal, se desarrolla el procedimiento descrito en la metodología, sección 2.1.2. Para calcular los rendimientos de extracción de *D. granadensis*, por cada proporción evaluada, de acuerdo con la ecuación 2.

Ecuación 2. Rendimiento de extracto.

$$\%R = \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{Peso del material vegetal seco}} \times 100$$

Se obtienen los resultados mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Resultado de extracciones con diferentes proporciones.

R (m/v)	OBSERVACIONES			Total	Promedio
	1	2	3		
1/10	24.32	23.62	23.41	71.35	23.78%
1/20	23.68	22.82	23.91	70.41	23.47%
1/40	21.20	20.32	20.68	62.2	20.73%

Para evaluar el efecto que tiene la relación m/v en el rendimiento de extracción, se propone un diseño de experimento de 1 factor con 3 niveles, que se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Diseño de experimentos para el rendimiento

Factor	Relación (Peso hoja seca vs. Volumen etanol)
Niveles	1/10 , 1,20, 1/40
Variable respuesta	Rendimiento de extracción (%)
Número de réplicas	3

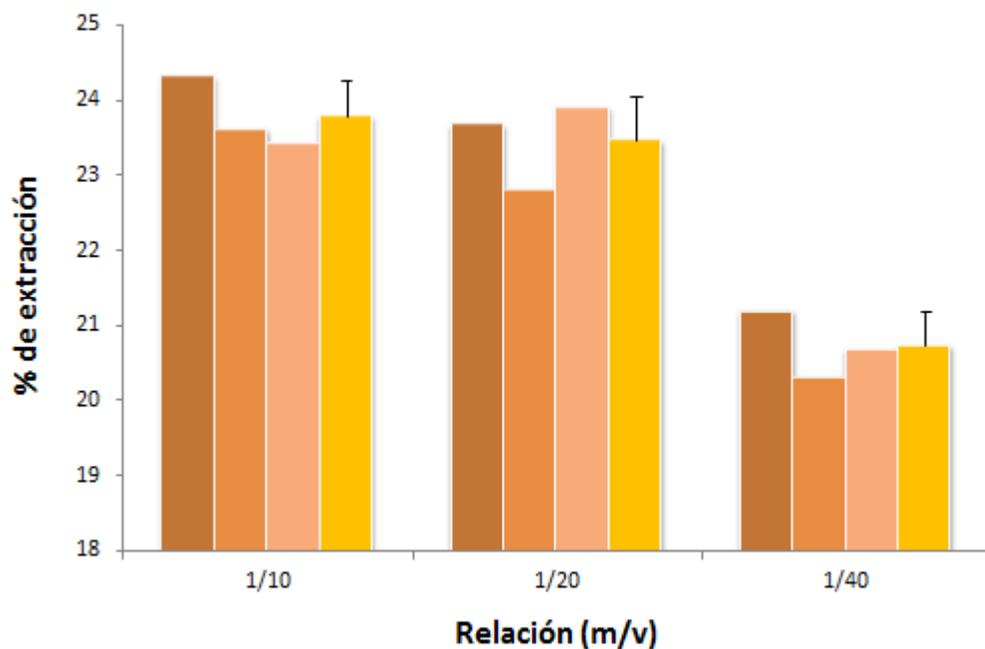
Con el fin de determinar el efecto que tiene la relación m/v en el rendimiento de extracción, se plantean la hipótesis nula y alterna respectivamente:

H₀: El promedio de rendimiento de extracción en las tres relaciones m/v es igual, con un 95 % de confiabilidad.

H₁: En al menos una relación m/v el promedio de rendimiento de extracción es distinto, con 95% de confiabilidad.

Con los pesos de extracto seco, se determina el porcentaje de extracción en cada una de las proporciones mediante la ecuación 2 y se obtiene los resultados mostrados en la Gráfica 1.

Gráfica 1. Porcentajes de extracción vs. Réplicas.



Nota: La desviación estándar para cada uno de las proporciones es 1/10: 0.48; 1/20: 0.57; 1/40: 0.44.

Se hace un análisis de varianza ANOVA con la información suministrada en la gráfica 1.

Teniendo en cuenta los grados de libertad obtenidos en el análisis de varianza, se compara el valor calculado de $F = 33.65$ frente a 5.14, valor extraído de la tabla de distribución de Fisher (Ver anexo E).

Debido a que el F calculado es mayor que el F que se lee en tablas, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que, en al menos una relación m/v, hay diferencia significativa en el rendimiento.

Con el fin de determinar cuál de los promedios de extracción es el que marca la diferencia, se desarrolla la prueba de Tukey (Ver tabla 12), prueba seleccionada

por tener en cuenta los tamaños de muestras iguales y, además de esto, efectúa un control sobre el error global del experimento por lo cual es preferida por muchos experimentadores¹³⁴. Con $\alpha = 0,005$ y $f = 6$ grados de libertad para el error, en la tabla del apéndice F se obtiene $q_{0,05}(3,6) = 4,34$. Por lo tanto, por la ecuación 3.

Ecuación 3. Estimador prueba de Tukey

$$T_{0,05} = q_{0,05}(3,6) \sqrt{\frac{MS_E}{n}} = 4,34 \sqrt{\frac{0,251}{3}} = 1,2$$

Este estimador T permite comparar cualquier par de promedios de los tratamientos, aquellos que difieran en valor absoluto por más de 1,26 implica que el par de promedios correspondientes son significativamente diferentes.

Tabla 12. Tabla diferencia de promedios entre tratamientos.

Relación (m/v)	Promedio	1/10	1/20	1/40
		23,78	23,47	20,73
1/40	20,73	3,05 *	2,74*	-
1/20	23,47	0,31	-	
1/10	23,78	-		

Los valores con asterisco mostrados en la tabla 12, representan la diferencia significativa que tiene el promedio de rendimiento de extracción de la relación 1/40 con respecto a las relaciones 1/10 y 1/20 respectivamente, siendo la primera la de más bajos resultados.

3.3. FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.2, se obtuvieron 12 fracciones secas, 4 por cada réplica en el método. Los pesos de las fracciones se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13. Rendimiento de extractos fraccionados en hojas

	Extracto total	Hexano	Cloroformo	Acetona	Metanol
Peso 1 (g)	6,789	0,816	3,292	1,158	1,048
Peso 2 (g)	6,542	0,736	2,827	1,277	1,008
Peso 3 (g)	6,855	0,957	3,156	1,607	0,907

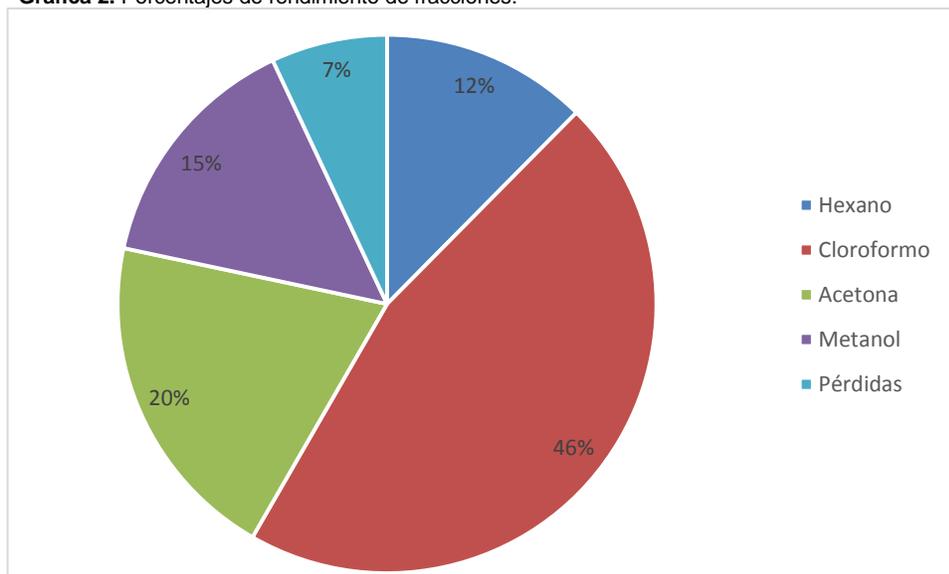
Aplicando la ecuación 4 para determinar los rendimientos respectivos, se observan los resultados en la gráfica 2.

¹³⁴ Montgomery, D.C., Diseño y Análisis de Experimentos. México, D.F: Limusa wiley, 2004. p. 102

Ecuación 4. Rendimiento del fraccionamiento.

$$\%R = \frac{\text{Peso del extracto obtenido}}{\text{Peso del extracto Etanolico}} \times 100\%$$

Gráfica 2. Porcentajes de rendimiento de fracciones.



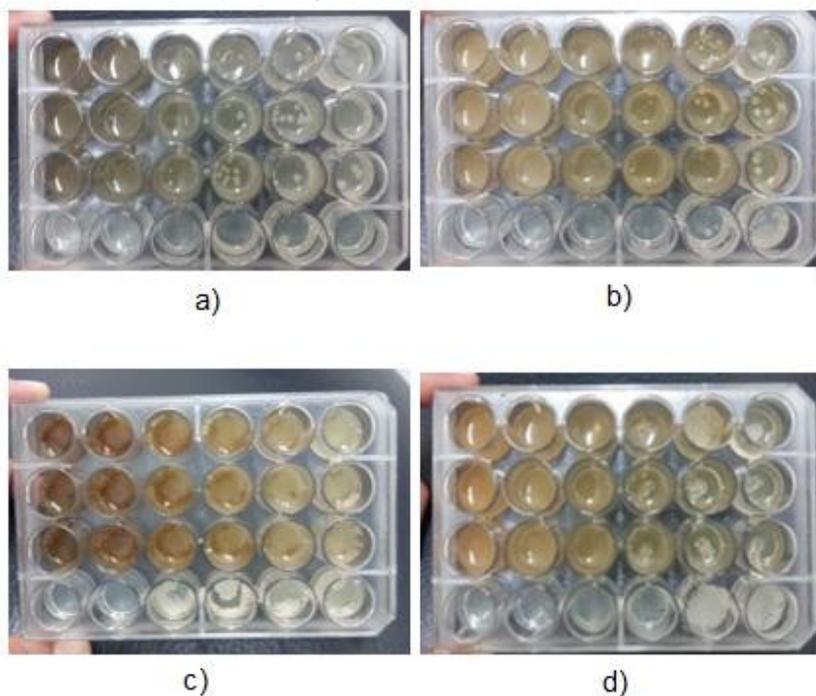
De acuerdo a los resultados, la fracción de cloroformo es la de mayor rendimiento, con un valor de 46%, quiere decir que casi la mitad de las moléculas presentes en el extracto vegetal tienen tendencia a ser de tipo medianamente-apolares. Esto no implica necesariamente que la fracción de cloroformo sea la indicada para formular el producto, debido a que no existe una relación directa entre la actividad bactericida (lo cual se pasará a evaluar en la siguiente sección) y el rendimiento de la fracción. La fracción de acetona es la que le sigue en rendimiento con un 20%, seguido de metanol y hexano con 15% y 12% respectivamente.

Teniendo en cuenta que el extracto seco tiene características de alta viscosidad y su manejo es difícil, se obtuvo también un porcentaje de pérdidas, el cual se atribuye al extracto que queda adherido en materiales como espátula, papel filtro, algodón, guantes, entre otros. Estas pérdidas representan un 7% del extracto crudo total obtenido.

3.4 PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA

Se prosigue al ensayo de actividad antibacteriana a través del método "MIC Test" descrito en la sección 2.3.2. Una vez se siembra la bacteria y se incubaba a una temperatura de 37°C por 24 horas, se observa el crecimiento en ciertas concentraciones dependiendo de la eficacia de la fracción en el microorganismo evaluado como se observa en la ilustración 11.

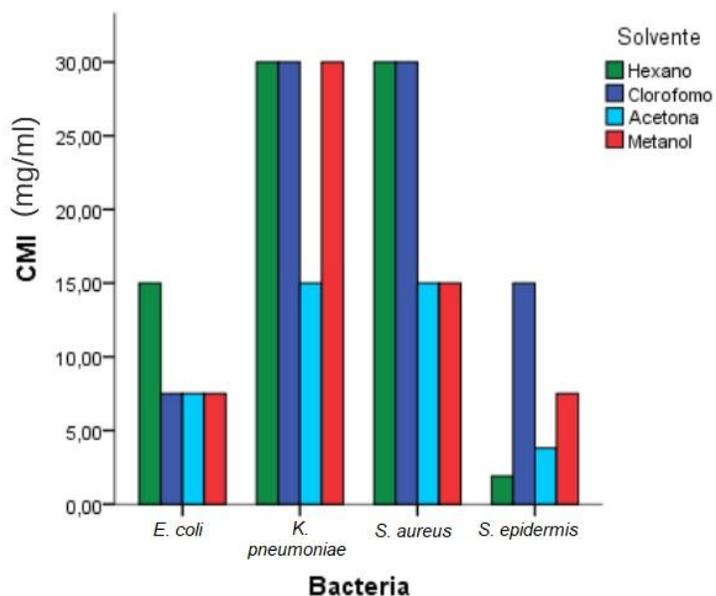
Ilustración 11. Resultados de la prueba "MIC test".



Dónde: a) Fracción de hexano. b) Fracción de acetona. c) Fracción de clorofomo y d) Fracción de metanol.

Como variable respuesta al experimento, se tiene presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. Según esto, en la gráfica 3 se puede observar de manera más clara y completa los resultados de la concentración mínima de inhibición por cada una de las cepas bacterianas evaluadas.

Gráfica 3. CMI de cada fracción por bacteria.



Según la sección 1072 de la Farmacopea Americana¹³⁵, *E. coli* y *S. aureus* son dos de los 3 microorganismos desafiantes (más resistentes) y la efectividad de la prueba consiste en inhibir su crecimiento. A partir de los resultados mostrados en la gráfica 3, se puede decir que la prueba fue efectiva en las fracciones de acetona y metanol, pues hubo inhibición del crecimiento en estas dos cepas. La fracción de hexano fue muy eficaz contra *S. epidermis*, sin embargo, no hubo inhibición del crecimiento de *S. aureus* en ninguna concentración, al igual que la fracción de cloroformo, razón por la cual, se descartan estas fracciones para la formulación del producto.

Comparando las fracciones restantes, la fracción de acetona es la que obtuvo una mejor efectividad en cuanto a la inhibición del crecimiento: Inhibe el crecimiento de *S. epidermis* a partir de una CMI de 3.8 mg/ml, mientras que la de metanol en 7.5 mg/ml; con respecto a *E. coli* y *K. pneumoniae*, acetona tiene una CMI de 7.5 mg/ml, lo cual fue similar a metanol en cuanto a *E. coli*, pero si hubo una gran diferencia en *K. pneumoni*, donde la CMI de metanol fue de 30 mg/ml; finalmente, *S. aureus* se inhibe a partir de una CMI de 15 mg/ml en ambas cepas.

Haciendo un análisis entre la actividad antibacteriana y el rendimiento, se decide escoger la fracción de acetona para la formulación del producto; a pesar de no ser la de mayor cantidad, es la segunda luego del cloroformo y muestra una efectividad muy superior al resto de fracciones en cuánto a su actividad bactericida. Teniendo en cuenta que los compuestos medianamente polares de *D. granadensis* son los más eficaces, se pasa a identificar el tipo de moléculas presentes en esta fracción mediante la marcha fitoquímica.

3.5 MARCHA FITOQUÍMICA

Los resultados obtenidos a partir de la cromatografía en capa fina para la fracción de acetona, se pueden observar en las tablas de la 14 a la 18. En todas las placas se observa un comportamiento similar en la separación de los componentes, a pesar de que en unas placas se haya obtenido una mejor separación que en otras. Los resultados se comparan con los datos mostrados en el estudio de DUEÑAS, J.T.¹³⁶ en el 2017, en el cual, se identificaron metabolitos secundarios del extracto total crudo de *D. granadensis*. Mediante esta comparación se quiere identificar cuáles son los metabolitos secundarios directamente responsables de la actividad antibacteriana.

Placa 1: La separación de los metabolitos secundarios presentes fue muy notoria. Su característica principal es que existen componentes que no se pueden ver a simple vista, se requiere luz UV para poderlos detectar. En la tabla 14 se ve de manera clara estos puntos y los cambios de colores en los que se pueden

¹³⁵ Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 30. Op. cit., p. 558.

¹³⁶ DUEÑAS, J. Op. cit. p. 30 – 32.

observar con luz visible. Con el UV a 365 nm, la gran mayoría de los puntos presenta fluorescencia, lo cual es característico de compuestos aromáticos que usualmente componen a los flavonoides¹³⁷.

Tabla 14. Resultado de TLC placa 1.

Puntos	Color	UV	Vista normal	Vista UV 365 nm
1	café	Rojo		
2	amarillo	Amarillo		
3	amarillo oscuro	Verde fluorescente		
4	verde grisáceo	Verde fluorescente		
5	amarillo opaco	Verde fluorescente		
6	verde grisáceo	Verde fluorescente		
7	gris azul	Verde fluorescente		
8*	No visible	azul violeta		
9*	No visible	azul violeta		
10*	No visible	azul violeta		
11*	No visible	azul violeta		
12	amarillo	Verde fluorescente		

* Los compuestos del 8 al 11, absorben la radiación UV, su revelado se evidenció por medio de una cámara ultravioleta.

Placa 2: En este caso, se ve una disminución notoria en la separación de los metabolitos, sin embargo, el orden de los colores se mantiene de manera muy similar. Para este caso, se sumergió la placa resultante en reactivo vainillina - ácido fosfórico; en la tabla 15 se puede notar que los colores se tornaron violeta - rosa y el punto de siembra cambió de su color café a un marrón. De manera similar a la placa 1, el compuesto amarillo se encuentra muy retirado de los demás.

Tabla 15. Resultados de TLC placa 2

Puntos	Color	Vista con revelador
1	café	
2	verde opaco	
3	amarillo	
4	verde grisaseo	
5	amarillo opaco	
6	verde grisaseo	
7	gris	
8	amarillo	

¹³⁷ HAVSTEEN, B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics. 2002. Vol. 96. p. 82.

Placa 3: La coloración inicial fue muy similar, aunque la separación no fue muy notoria. Se formó una delgada capa que distribuye los colores como se indica en la tabla 16. En este caso se decidió sumergir la placa en cloruro férrico como se observa en la ilustración 12.

Ilustración 12. Placa con revelador Cloruro férrico.



Se observa claramente que el punto de siembra cambia a un color verde grisáceo muy oscuro.

Tabla 16. Resultados de TLC placa 3

Puntos	Color	Vista con revelador
1	café	
2	amarillo opaco	
3	amarillo	
4	verde grisáceo	
5	amarillo opaco	
6	verde grisáceo	
7	gris	
8	amarillo	

Placa 4: La coloración inicial tiene un orden muy similar al de las anteriores placas, sin embargo su separación no fue muy efectiva y sólo se alcanzan a distinguir algunos colores combinados, como se muestra en la tabla 17. Esta placa fue sumergida en revelador vainillina – ácido sulfúrico como se observa en la 13. Se observa un cambio drástico de color en toda la placa.

Ilustración 13. Placa sumergida en vainillina-ácido sulfúrico.



Tabla 17. Resultados TLC placa 4

Puntos	Color	Vista con revelador
1	café	
2	amarillo verde	
3	grisáceo	
4	verde opaco	
5	amarillo	

Placa 5: La separación de componentes fue muy efectiva, en cuanto a que se pueden distinguir de manera clara cada uno de los colores a través de la fase estacionaria. En este caso, se puso la placa en contacto con vapor de solución de amoníaco, luego al horno con una temperatura de 110°C, y finalmente a exposición de lámpara UV a 256 nm. Como se indica en la tabla 18, la exposición de esta placa en la radiación no demostró cambios de color ni fluorescencia en los componentes, así que se descarta la presencia de cumarinas y flavonoides

Tabla 18. Resultados TLC placa 5

Puntos	Color	Vista con revelador	Vista con UV 254 nm
1	café		
2	amarillo		
3	verde		
4	amarillo verde		
5	grisaseo		
6	gris		
7	amarillo		

Una vez se concluye la primera identificación por TLC, se realizan las pruebas con tubos para reiterar los resultados y tener una mayor certeza de la presencia de los metabolitos secundarios más relevantes.

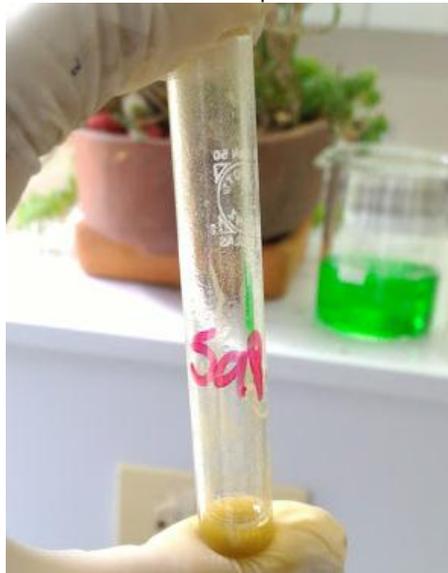
Flavonoides: Como se observa en la ilustración 14, el agregar los agentes reveladores para la fracción de acetona dio como resultado una coloración muy rosa, lo cual es un indicador positivo para la prueba shinoda y se concluye que hay presencia de flavonoides en la fracción de acetona.

Ilustración 14. Resultado prueba Shinoda.



Taninos: Al realizar la prueba Gelatina-sal, se formó una leve turbidez en el color de la solución y también se formó poco precipitado como se observa en la ilustración 15. Se concluye que hay presencia de pocos taninos condensables.

Ilustración 15. Resultado prueba Gelatina-sal.



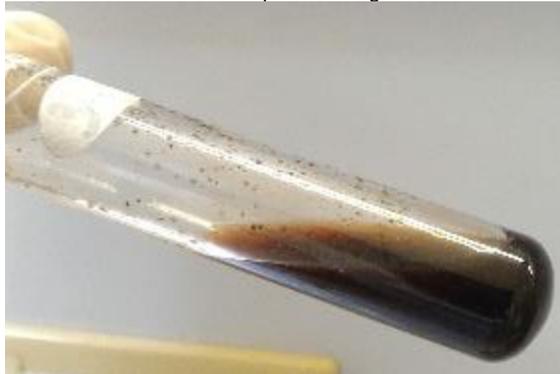
Saponinas: Hay formación de espuma que indica que hay disminución de la tensión superficial cuando se lleva a cabo la prueba de espuma. Como se puede observar en la ilustración 16, la espuma no es demasiado abundante como se define en el protocolo, sin embargo, se mantiene durante más de 1 minuto, lo cual indica presencia de saponinas.

Ilustración 16. Resultado prueba de Espuma



Alcaloides: Al agregar el reactivo Dragendorff, hay un cambio de color en la solución de la fracción de acetona, no obstante, no se forma ningún precipitado como se observa en la ilustración 17. Se concluye que no hay presencia de alcaloides en la muestra.

Ilustración 17. Resultado prueba Dragendorff.



Cardiotónicos: Al agregar reactivo Baljet, se puede observar a través de la ilustración 18 que se forma una coloración naranja fuerte, lo cual indica positivo para la prueba.

Ilustración 18. Resultado prueba Baljet.



Quinonas: Al realizar el procedimiento con reducción Zn/HCl, se pudo evidenciar algo de precipitado blanco, sin embargo, este no fue muy notorio como se observa en la ilustración 19, lo cual implica poca presencia de este tipo de moléculas.

Ilustración 19. Resultado prueba de Reducción con Zn/HCl



En la tabla 19 se encuentra la información donde se compara los resultados obtenidos por los métodos realizados en la presente investigación y lo que se reporta en el estudio de DUEÑAS, J.T., el cual se tuvo lugar en el Jardín Botánico de Bogotá *José Celestino Mutis* en el año 2016.

Tabla 19. Comparación de metabolitos secundarios

Grupo de compuestos	Método de identificación	Hoja- Silvestre*	
		Extracto etanólico total (Dueñas, J. T.)	Fracción Acetona (Cuervo D. y Vanegas J.A.)
Flavonoides	Prueba Shinoda	+	+
Quinonas	Reducción con Zn/HCl	+	+
	Cloruro férrico	++	N/A
Taninos	Cloruro férrico (TLC)	N/A	++
	Gelatina-sal	+	+
Saponinas	Espuma	-	+
Alcaloides	Dragendorff	+	-
Cardiotónicos	Baljet	+	++
	Hidróxido de potasio alcohólico	+	N/A
Cumarinas	Absorción UV (TLC)	N/A	-
	Liberman- Bouchard	++	N/A
	Liberman- Bouchard (TLC)	N/A	+

*Según lo obtenido, el signo negativo (-) significa que no hubo presencia de ese metabolito. El signo positivo (+) significa que hubo poca presencia de ese metabolito y el doble signo positivo (++) significa que la prueba tuvo resultados muy notorios de la presencia de ese metabolito.

De la información obtenida en la tabla 19, se puede concluir que se coincide con la presencia de metabolitos como: flavonoides, quinonas, taninos hidrolizables y taninos condensables. Con respecto a los cardiotónicos, la presente investigación obtiene una presencia muy notoria de estas moléculas, mientras que el estudio de Dueñas reporta poca presencia de ellos. Caso contrario a esteroides, donde, a través de cromatografía en capa delgada con revelador Liberman-Bouchard hubo poca presencia de esteroides y/o triterpenoides, mientras que el estudio de Dueñas fue muy notoria la presencia de estos. Metabolitos como alcaloides y cumarinas se reportaron presentes en el extracto total, mientras que en la fracción de acetona no hubo presencia de estos, lo cual implica que esos compuestos no son los principales responsables de la actividad antibacteriana. En cuanto a las saponinas, hay una discrepancia, debido a que el extracto total no reporta presencia de estas, sin embargo, en la presente investigación si hubo una leve formación de espuma, lo cual indica positivo en la prueba.

De acuerdo a los resultados presentados a través de todo el capítulo, se concluye que a pesar de no tener el mayor rendimiento, la fracción de acetona es la más indicada para la formulación del producto, por su superioridad en las pruebas de inhibición del crecimiento bacteriano. Estas propiedades se le atribuyen principalmente a la presencia de Taninos y Cardiotónicos, los cuales se encuentran en mayor proporción según las pruebas cualitativas. Sin embargo, estudios revelan que los flavonoides y las saponinas también tienen propiedades antibacteriales.

Por otro lado, las características físicas de la fracción de acetona, hacen que sea difícil de maniobrar, sin embargo, las fracciones apolares: hexano y cloroformo, mostraron una mayor dificultad y resistencia en cuanto a que se adhieren y manchan la ropa con más facilidad que las fracciones polares. Al momento de realizar el producto es importante tener en cuenta las características organolépticas del mismo, y esto dependerá de cómo se defina el producto y hacia qué sector va dirigido, como se verá en el siguiente capítulo.

4. FORMULACIÓN DEL PRODUCTO Y ANÁLISIS

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización de los extractos vegetales de la especie, específicamente con sus altos niveles de citotoxicidad, se define que el producto a desarrollar va dirigido a la aplicación en superficies.

Para definir exactamente el tipo de superficie y el sector puntual al que se destina el producto, se investigan diferentes estudios de mercado, donde se establece los ingresos actuales que mueve la comercialización de desinfectantes sintetizados químicamente para superficies de uso doméstico y uso agrícola, los cuales son los que lideran esta categoría.

4.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

Según un estudio de mercado realizado en Estados Unidos en el 2016¹³⁸, el mercado global de los desinfectantes de superficies tales como hipoclorito, peróxido, ácido peracético, compuestos fenólicos, compuestos de amoníaco cuaternario, entre otros, está en crecimiento. Se proyecta que este mercado alcance los USD \$542,55 millones para 2020, a partir de los USD \$312,17 millones conseguidos en el 2015, presentando una tasa anual compuesta de crecimiento de 11,69% en este periodo de 5 años. Cabe resaltar que dentro del estudio de mercado, se evaluaron 3 presentaciones: Líquido, en spray y en toallas, dando como resultado que la presentación en líquido fue la más superior.

Entre tanto, en los desinfectantes agrícolas, se prevé que el mercado alcanzará un valor de USD \$2.11 mil millones en 2021, con una tasa de crecimiento de 4.3% de 2016 a 2021.¹³⁹

Comparando ambos estudios, se puede concluir que se proyecta un mayor crecimiento económico en los desinfectantes de superficie para uso doméstico, a pesar de que los desinfectantes de uso agrícola tengan tanta fuerza actualmente.

Teniendo en cuenta el crecimiento del mercado de desinfectantes para uso doméstico, y la compleja infraestructura requerida para la realización de pruebas in vivo en un sector agrícola, se define que se formula un producto enfocado hacia el uso en superficies del sector doméstico llamado "Driminator", el cual tendrá una presentación líquida y su aplicación será mediante aspersor con el fin de asegurar una aplicación homogénea en la superficie.

¹³⁸ Markets and Markets. Surface Disinfectant Market by Product (Hypochlorite, Quaternary Ammonium Compounds, Hydrogen Peroxide, Chlorhexidine Gluconate, Peracetic Acid, Phenol, Alcohol), Formulation (Sprays, Liquids, Wipes) - Global Forecast to 2020. En línea. [Consultado: 20 de Abril de 2017]. Octubre 2015. < <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/surface-disinfectant-market-231286043.html>>

¹³⁹ Markets and Markets. Agricultural Disinfectants Market worth 2.11 Billion USD by 2021. En línea. [Consultado: 20 de Abril de 2017]. Agosto 2016. < <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/agricultural-disinfectant-market-89992801.html>>

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL: PRE-FORMULACIÓN

Una vez se define el producto a desarrollar, se proponen las pre-formulaciones, basadas en artículos recientes para la formulación de productos desinfectantes de superficies y en los ingredientes más comunes que componen otros productos comerciales.

Debido a que los componentes de la fracción de acetona del extracto no tienen una naturaleza totalmente polar, se siguen las recomendaciones dadas por la patente de DAIGLE, F., *et. al.*,¹⁴⁰ la cual fue escogida por los autores debido a que el documento trata de una formulación de un desinfectante a partir de extractos vegetales, lo cual se ajusta al producto que se desea desarrollar en la presente investigación. En la patente se explica que por su poca solubilidad, se debe agregar un solvente anfílico que sea capaz de solubilizar los compuestos del extracto en el medio acuoso o vehículo. Se decide que para la presente función se selecciona el propilenglicol, el cual actúa a su vez como agente humectante. A partir de esta definición, en la tabla 20 se encuentra la lista de los aditivos que se escogen para realizar las pre-formulaciones iniciales y que por medio de investigaciones previas, se ha demostrado que no ocasionan un efecto negativo en la degradación del extracto vegetal.

Tabla 20. Pre-formulaciones para el diseño de experimentos.

Aditivo	Función
Agua destilada	Vehículo
Extracto	Ingrediente activo
EDTA	Agente quelante
Propilenglicol	Humectante/solvente extracto
Lauril-sulfato de sodio (Texapón 40)	Tensoactivo
Trietanolamina	Regulador de pH (Alcalinizante)
Colorante verde	Corrector de color
Fragancia de canela	Corrector de aroma

La mezcla de todos los ingredientes (incluyendo el extracto) sin alcalinizante, arroja un valor de 3.57, mientras que el pH del blanco (es decir, la mezcla de aditivos sin el extracto ni alcalinizante) marca un pH de 8.05. A partir de estos valores, se calcula por proporción, la cantidad de alcalinizante que debe tener cada uno de los tratamientos para estandarizar su valor de pH. Como se especifica en el marco teórico sección 1.4.3.1, cada desinfectante tiene un rango determinado de pH óptimo para su correcta efectividad y esto depende de su ingrediente activo. En el caso de *D. granadensis* no se encuentran estudios realizados donde se especifique esto, razón por la cual, se decide que la variable en el diseño de experimentos propuesto en la sección 2.5, tomará valores de pH 4 para el tratamiento 1, pH 7 para el tratamiento 2 y pH 10 para el tratamiento 3; esto con el

¹⁴⁰ DAIGLE, F., *et. al.*, Op. cit. p. 6.

fin de abarcar medios ácido, neutro y alcalino respectivamente y evaluar la efectividad del producto en cada uno.

A partir de la definición de los ingredientes, en la tabla 21 se muestra los valores fijos de cada uno y la variación en la cantidad del alcalinizante para conseguir el pH correspondiente a cada tratamiento.

Tabla 21. Formulación del diseño de experimentos

Ingredientes	Tratamientos		
	pH 4 (1)	pH 7 (2)	pH 10 (3)
Agua destilada	75.15%	74.4%	71.9%
Extracto*	2.5%	2.5%	2.5%
Agente quelante	1.0%	1.0%	1.0%
Agente humectante	20.0%	20.0%	20.0%
Tensoactivo	1.0%	1.0%	1.0%
Regulador de pH (variable)	<u>0.25%</u>	<u>1.0%</u>	<u>3.5%</u>
Colorante natural (verde)	0.05%	0.05%	0.05%
Fragancia de canela	0.05%	0.05%	0.05%

*La concentración del ingrediente activo debe ser superior a la concentración mínima inhibitoria obtenida en las pruebas antibacterianas, debido a que, con el paso del tiempo, el extracto se puede degradar, perdiendo su actividad y acortando la vida útil del producto.

Una vez especificada la proporción de cada aditivo en cada uno de los tratamientos, se pasa a hacer el desarrollo del producto a nivel laboratorio. El orden de mezclado y la obtención de las pre-formulaciones se especifica en la sección 4.3.

4.3 DESARROLLO DEL PRODUCTO A NIVEL LABORATORIO.

Se debe mezclar rigurosamente cada uno de los ingredientes, siguiendo el método de DAIGLE, F., *et. al.*,¹⁴¹ en su patente, para asegurar que haya homogeneidad y solubilidad completa de los aditivos en el vehículo. Se prepara un total de 675 ml, en el cual se destina 225 ml por cada tratamiento y, a su vez, ese volumen se divide en 3 para representar cada una de las réplicas. La cantidad empleada de cada aditivo para los tratamientos 1, 2 y 3 se muestran en las tablas 22, 23 y 24 respectivamente.

¹⁴¹ *Ibíd.*, p. 9.

Tabla 22. Pre-formulación - Tratamiento 1.

Aditivo	Cantidad
Extracto	5.625 g
EDTA	2.25 g
Propilenglicol	45 ml
Texapón 40	2.25 ml
Colorante	0.1125 g
Fragancia de canela	0.1125 ml
Alcalinizante	0.5625 ml
Agua des ionizada	169.1 ml

Tabla 23. Pre-formulación – Tratamiento 2.

Aditivo	Cantidad
Extracto	5,625 g
EDTA	2,25 g
Propilenglicol	45 ml
Texapón 40	2,25 ml
Colorante	0,1125 g
Fragancia de canela	0,1125 ml
Agua	167,4 ml
Alcalinizante	2,25 ml

Tabla 24. Pre-formulación - Tratamiento 3.

Aditivo	Cantidad
Extracto	5,625 g
EDTA	2,25 g
Propilenglicol	45 ml
Texapón 40	2,25 ml
Colorante	0,1125 g
Fragancia de canela	0,1125 ml
Agua	161,78 ml
Alcalinizante	7,875 ml

Para homogenizar correctamente, se sigue la secuencia de mezclado de especificada en el diagrama de flujo de la figura 17, que se muestra de manera más gráfica en la ilustración 20.

Figura 17. Secuencia de mezclado con tiempos definidos.

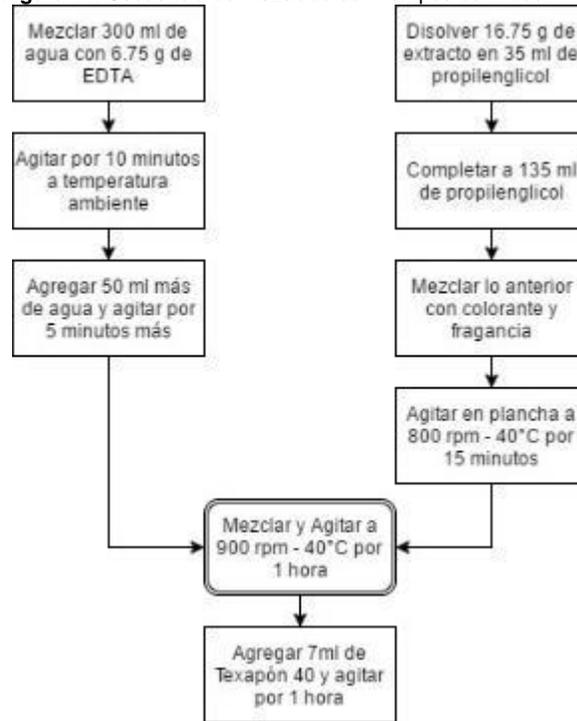
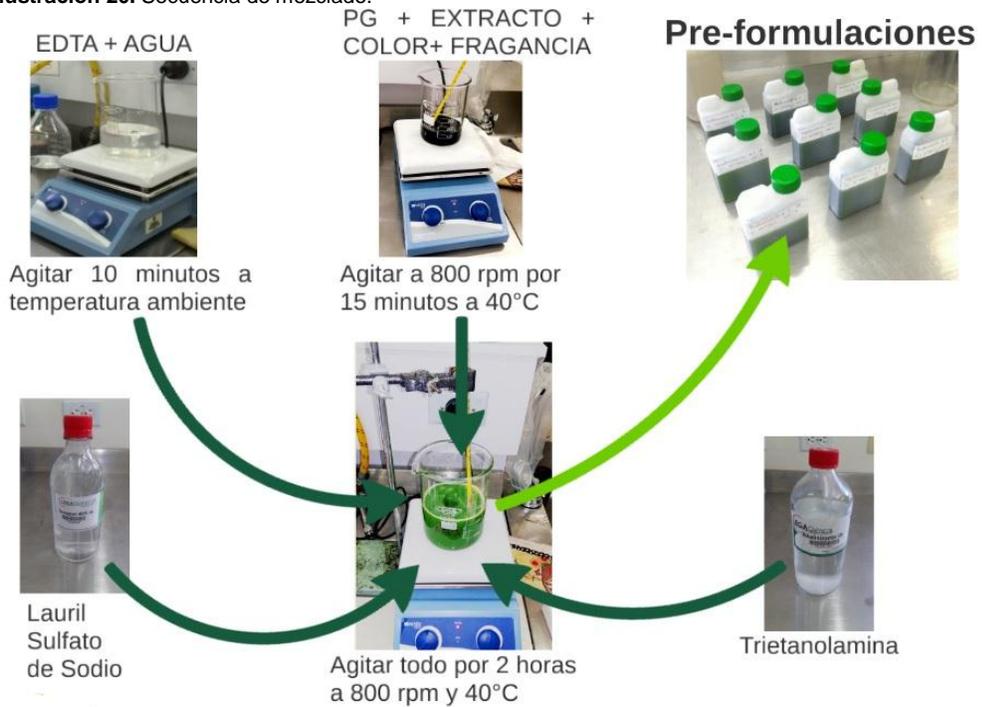


Ilustración 20. Secuencia de mezclado.



Una vez se culmina el tiempo de mezclado y se obtienen las 3 pre-formulaciones establecidas, se vierte 75 ml de cada uno de ellos en 3 envases diferentes para replicar los resultados posteriores como se muestra en la ilustración 21.

Ilustración 21. Pre-formulaciones en el día cero.



Cada uno de los frascos se almacena para evaluar su estabilidad a tiempo real, bajo las condiciones especificadas en la sección 2.6, como se observa en la ilustración 22. En la sección 4.4 se presentan los resultados en la estabilidad tanto del pH como en sus propiedades organolépticas.

Ilustración 22. Almacenamiento de pre-formulaciones en condiciones reales.



4.4 ESTABILIDAD DE PRE-FORMULACIONES

Se evalúan las características organolépticas mencionadas en la sección 2.6.1 en el día cero y el día 15 para cada uno de los tratamientos, con el objetivo de comparar cuánto ha cambiado la apariencia del producto en este tiempo, bajo condiciones de almacenamiento reales. Los resultados se pueden observar a través de la tabla 25.

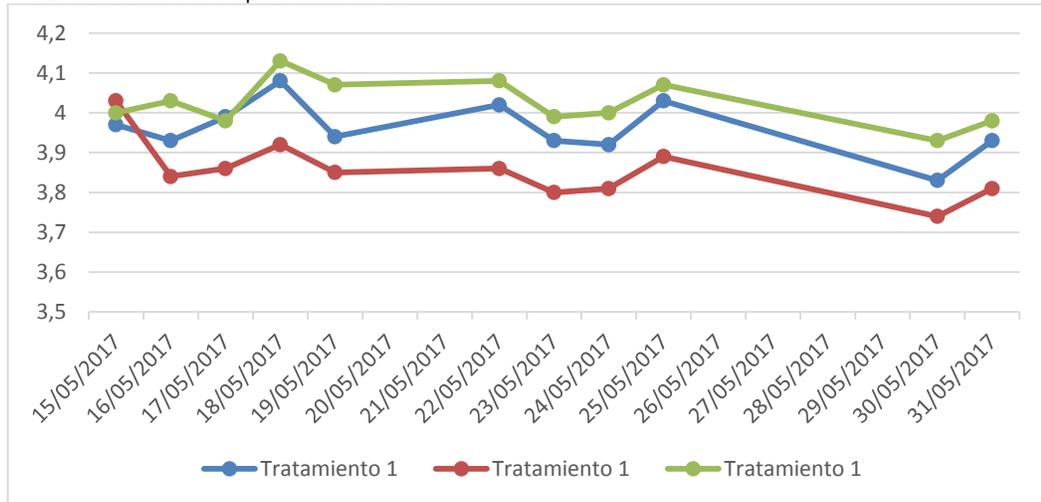
Tabla 25. Resultados pruebas organolépticas

Característica	Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3		Blanco
	15/05/2017	30/05/2017	15/05/2017	30/05/2017	15/05/2017	30/05/2017	30/05/2017
Color	Verde lima	Verde bosque	Verde lima	Verde Oliva	Verde lima	Marrón	Verde esmeralda
Olor a canela	Fuerte	Leve	Fuerte	Muy leve	Fuerte	No se percibe	Fuerte
Transparencia	Poco traslúcido	Muy poco traslúcido	Poco traslúcido	Turbio	Poco traslúcido	Muy Turbio	Muy traslúcido
Partículas suspendidas	Pocas	Muchas	Muy pocas	Muchas	Pocas	Muchas	No hay

Las características organolépticas del producto cambiaron drásticamente en los 3 tratamientos pasados 15 días desde su manufactura, sin embargo, los cambios fueron más notorios a medida que aumenta el valor del pH, lo cual puede deberse a que el extracto es más sensible a degradación en medios alcalinos.

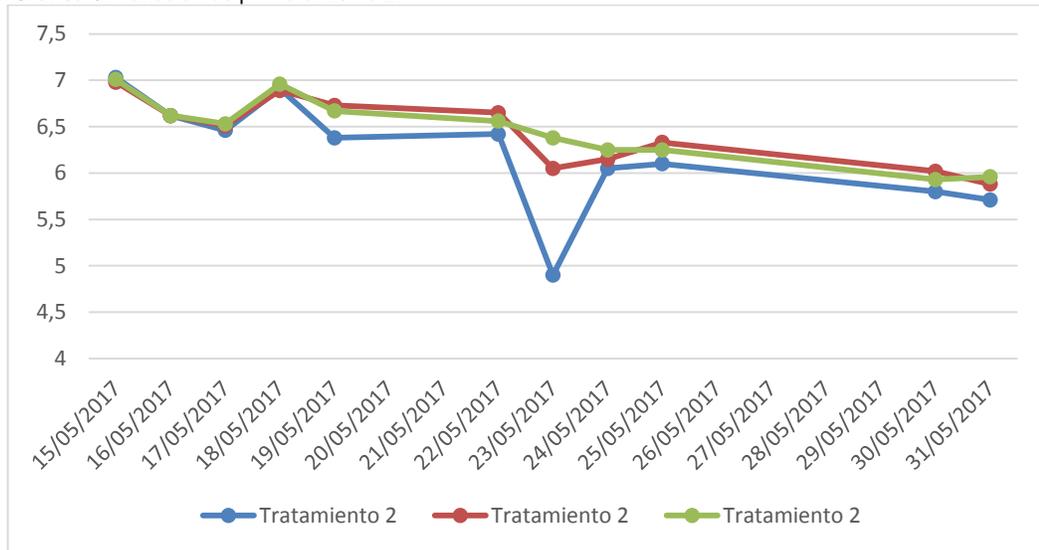
Con respecto a la variación de pH, las gráficas 4,5 y 6 muestra el comportamiento de los 3 tratamientos con respecto al tiempo.

Gráfica 4. Variación del pH tratamiento 1.



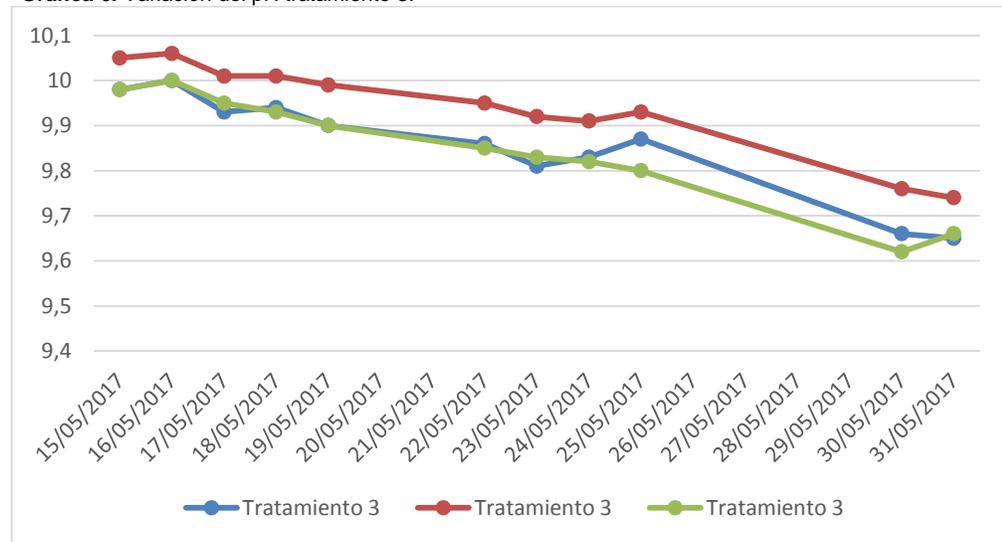
Desviación estándar: 0.06

Gráfica 5. Variación de pH tratamiento 2.



Desviación estándar: 0.42

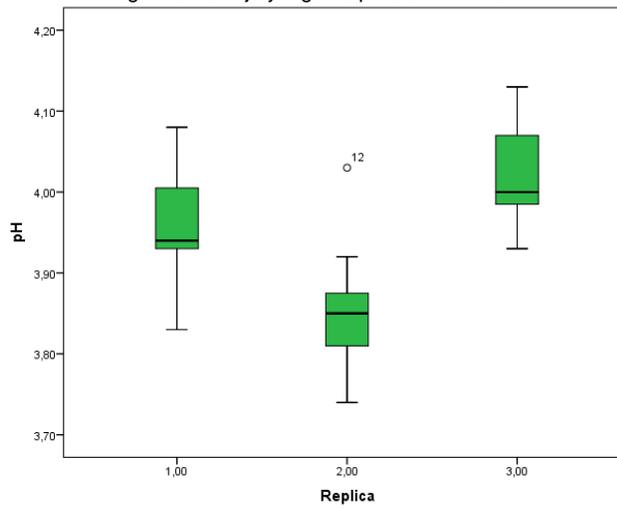
Gráfica 6. Variación del pH tratamiento 3.



Desviación estándar: 0.11

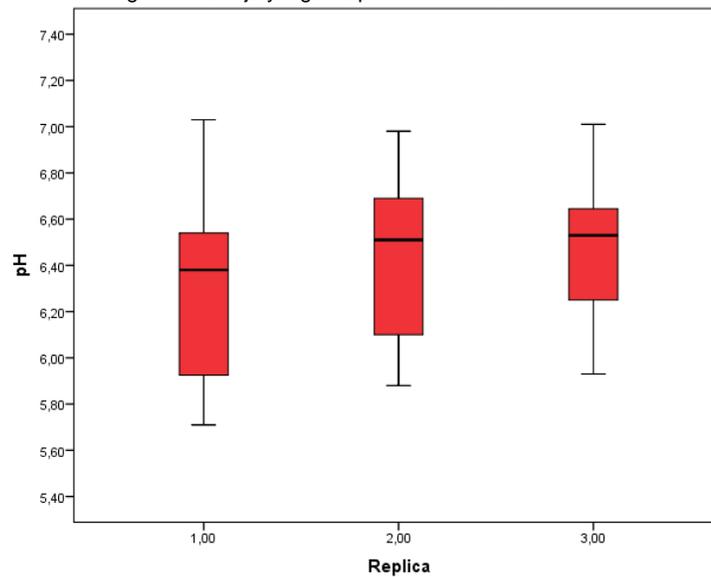
Para determinar la variabilidad de cada una de las réplicas, con respecto al valor de pH en el que se debería mantener (4, 7 o 10 dependiendo del tratamiento) se realizaron diagramas de caja y bigotes en el programa SPSS como se observa en las gráficas 7, 8 y 9.

Gráfica 7. Diagrama de caja y bigotes para el tratamiento 1.



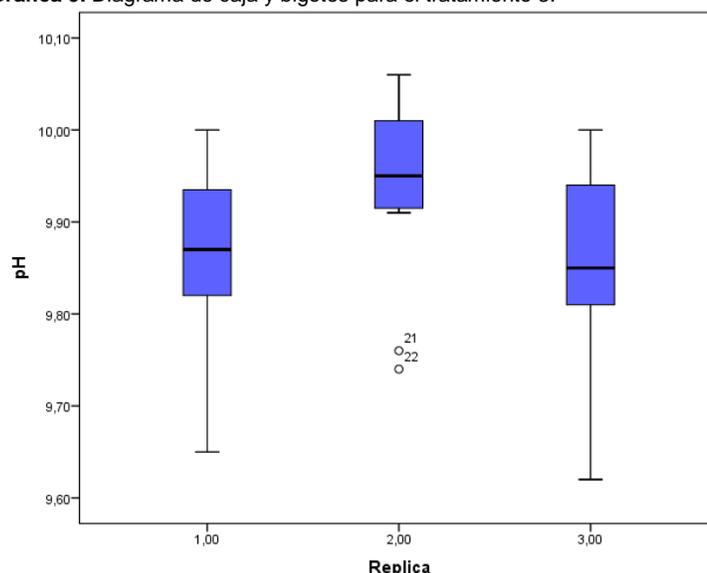
Para el tratamiento 1 replica 2 se ve un dato atípico, que pudo deberse a un error en la medición o en una mala calibración del equipo.

Gráfica 8. Diagrama de caja y bigotes para el tratamiento 2.



Para el tratamiento 2 replica 1 se evidencia un dato atípico, se atribuye a error en la medición del pH.

Gráfica 9. Diagrama de caja y bigotes para el tratamiento 3.



Para el tratamiento 3, replica 2, se evidencia dos datos atípicos inferiores a un pH de 9,8

La variación de pH en el tratamiento 2 fue muy superior a la variación en los tratamientos 1 y 3, lo cual se debe a que, por tratarse de una escala logarítmica, el pH en un rango neutro es más susceptible a variar, debido a que un cambio leve en la concentración de iones hidronio puede alterar de manera cuantiosa su valor. Por otro lado, la trietanolamina tiene la propiedad de formar soluciones buffer, las cuales dan estabilidad a la mezcla, razón por la cual, a mayor cantidad de alcalinizante en la formulación, mayor será la estabilidad de esta variable.

No obstante, el hecho que en este tratamiento las propiedades organolépticas hayan desmejorado considerablemente en un corto tiempo, bajo condiciones normales de almacenamiento, implica que existe la posibilidad de que el ingrediente activo se degrade fácilmente y pierda efectividad en un medio alcalino. Se debe comprobar esta hipótesis mediante los resultados de las pruebas de funcionalidad *in vitro* e *in vivo*.

4.5 RESULTADO PRUEBAS COMPARATIVAS

Para llevar a cabo las pruebas comparativas de funcionalidad, se escogen dos productos comerciales que van de acuerdo con el sector del mercado al que se dirige el producto Driminator, con el fin comparar los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* de las pre-formulaciones como se explica en la sección 2.6.2 y 2.6.3. A continuación se mencionan las características más importantes de cada uno.

- **Producto comercial 1 (Tratamiento 4):** Es un producto comercial multiusos sintetizado químicamente a partir de bicarbonato; viene en una presentación líquida de 960 ml contenido neto, color fucsia y olor a canela. Su modo de uso requiere diluir en el producto en agua, proporción 5:1 respectivamente. Tiene un pH alcalino de 8.06 según medición con pHmetro spectrum SoilStick. Su formulación contiene los aditivos de la tabla 26.

Tabla 26. Formulación del producto comercial 1.

FORMULACIÓN	
Ingrediente	Composición
Bicarbonato de potasio	1%
Surfactantes	3%
Fragancia	0,80%
Desengrasante	1,50%
Excipientes	93,70%

Fuente: Etiqueta del producto comercial 1.

Se escoge este producto por sus características similares a *Driminator*, en cuanto a que va dirigido al sector doméstico para uso en superficies y contiene en su formulación agentes surfactantes, lo cual hace que se emplee de la misma manera.

- **Producto comercial 2:** Producto desinfectante multisuperficies a partir de ingrediente natural de aceite de citronela; viene en presentación líquida de 120 ml contenido neto, color naranja y olor cítrico. Su modo de uso para superficies requiere diluir en 6 tapas del producto en 500 ml de agua, esparcir con un paño y dejar secar. Tiene un pH ácido de 4.65 según medición con pHmetro spectrum SoilStick.

Este producto reporta los aditivos que se usan, más no su composición:

- Agua
- Tensoactivo no iónico
- Aceite de citronela
- Tensoactivo aniónico
- Tensoactivo catiónico
- Espesante
- Secuestrante
- Conservante
- Color

Se escoge este producto porque su ingrediente activo (aceite de citronela) es de origen natural, lo cual es comparable con *Driminator*. Además, tiene dentro de su formulación, aditivos muy similares.

Por otro lado, se hace una mezcla de todos los aditivos que conforman la formulación del producto, exceptuando la adición del ingrediente activo. A esta mezcla se le llamará **Blanco**, y sirve como control para determinar el impacto que tienen los ingredientes en el crecimiento bacteriano.

4.5.1 Resultado prueba in vitro. Siguiendo el protocolo de la prueba de difusión de disco Kirby-Bauer, indicado en la sección 2.6.2, se evalúan las dos bacterias más resistentes de acuerdo a la farmacopea, es decir, *E. coli* y *S. aureus*. En la tabla 27 se muestran las medidas de halos de inhibición en milímetros, para cada uno de los tratamientos y sus respectivas réplicas (R1, R2 y R3).

Tabla 27. Medida de halos de inhibición.

Tratamientos	<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>			
	Halo de inhibición (mm)							
	R1	R2	R3	Desv.	R1	R2	R3	Desv.
Tratamiento 1	17	13	8	4,509	17	10	20	5,132
Tratamiento 2	9	0	7	4,726	0	9	0	5,196
Tratamiento 3	10	7	0	5,132	9	11	8	1,528
Tratamiento 4 (C1)	20	12	15	4,041	25	27	15	6,429
Tratamiento 5 (C2)	10	9	0	5,508	0	0	20	11,55
Tratamiento 6 (Blanco)	0	0	0	0	12	15	13	1,528

Teniendo en cuenta estos datos, la variabilidad de los tratamientos 3 y 6 fue la más baja con respecto a la cepa *S. aureus* y el tratamiento 6 no tuvo variabilidad en sus resultados para la cepa *E. coli*, esto quiere decir que sus resultados son más precisos y por lo tanto, más confiables. Por otro lado, el tratamiento 4 obtuvo los halos de inhibición más grandes, lo cual significa una mayor efectividad para esta prueba. Se realizó un análisis estadístico de los datos para cada bacteria, con base al siguiente diseño de experimento:

Factor: pH

Niveles: T1 (pH 4), T2 (pH7), T3 (pH 10), C1, C2, Blanco

Variable respuesta: Halo de inhibición

Número de réplicas: 3

Con el fin de corroborar el efecto que tiene el pH en la efectividad del desinfectante en la prueba *in vivo*, se plantean la hipótesis nula y alterna respectivamente:

H₀: No hay diferencia significativa en la efectividad del producto entre los tratamientos evaluados.

H₁: hay diferencia significativa en la efectividad del producto en al menos uno de los tratamientos evaluados.

Para el análisis de datos de la prueba en la bacteria *E. coli*, se tomaron los datos de la tabla 28, y se acoplaron a la tabla 29 donde se calculó la suma total y el promedio para el halo de inhibición en milímetros.

Tabla 28. Resultado de halos de inhibición para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Observaciones			Total	Promedio (mm)
	1	2	3		
T1 (pH:4)	17	13	8	38	13
T1 (pH:7)	9	0	7	16	5
T1 (pH:10)	10	7	0	17	6
Comercial 1 (pH: 8.06)	20	12	15	47	16
Comercial 2 (pH: 4.65)	10	9	0	19	6
Blanco	0	0	0	0	0

Se hace un análisis de varianza ANOVA. Teniendo en cuenta los grados de libertad obtenidos en el análisis de varianza, se compara el valor calculado de F (3.68), frente a 3.29, valor extraído de la tabla de distribución de Fisher (Ver anexo E).

Debido a que el F calculado es mayor que el F que se lee en tablas, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que, en al menos un tratamiento, la efectividad interpretada por halo de inhibición es diferente, lo cual afirma el efecto que tiene el pH sobre la efectividad de un desinfectante.

Para el análisis de datos de la prueba en la bacteria Gram positiva *S. aureus*, se siguió la misma metodología de análisis, y se procedió a calcular la tabla ANOVA. Teniendo en cuenta los grados de libertad obtenidos en el análisis de varianza, se compara el valor calculado de F (3.68), frente a 3,29, valor extraído de la tabla de distribución de Fisher (Ver anexo E).

Debido a que el F calculado es mayor que el F que se lee en tablas, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que, en al menos un tratamiento, la efectividad interpretada por halo de inhibición es diferente, lo cual afirma el efecto que tiene el pH sobre la efectividad de un desinfectante, y a su vez es independiente de la bacteria que es sometida a la evaluación.

Una vez establecida la influencia del pH en el desempeño del producto, se analizó cada tratamiento encontrando que el tratamiento 1 tuvo el mejor efecto bactericida en ambas cepas, arrojando resultados muy similares al tratamiento 4. En cuanto al tratamiento 3, su efectividad es baja, debido a que la medida de los halos no fue muy notoria y no hubo inhibición del crecimiento en la réplica 3 de *E. coli*. También

se puede observar que en el tratamiento 5, la efectividad disminuye notoriamente al no presentar halos en 3 de los 6 tratamientos.

No obstante, el producto con la efectividad más baja es el que se encuentra en pH neutro, que corresponde al tratamiento 2, debido a que no mostró inhibición en 1 réplica para *E. coli* y 2 para *S. aureus* y a su vez, los halos que se formaron no son muy notorios en cuanto al tamaño (Ver ilustración 23).

Por otro lado, el blanco no tuvo ningún efecto en el crecimiento de *E. coli*, sin embargo hubo una inhibición en la cepa *S. aureus*, por lo cual se puede decir que la mezcla de aditivos sin extracto tiene, de por sí, un potencial antimicrobiano. Se asume que la adición de fragancia de canela puede ser la responsable directa de esta actividad antibacteriana en el blanco, debido a que estudios, como el realizado por UNLU, M., *et. al.*,¹⁴² concluyen que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (o canela) presenta eficacia contra todas las 21 especies bacterianas y 4 especies de Cándidas que se evaluaron en su estudio.

Ilustración 23. Resultado de halos de inhibición.



Comparando los productos comerciales con las pre-formulaciones, se puede concluir que el producto comercial 1 es superior en cuanto a su efectividad como desinfectante; Por otro lado, el producto comercial 2 presenta falencias en su efectividad y puede ser superado por el tratamiento 1, es decir, la pre-formulación en pH ácido de 4.

4.5.2 Resultado prueba *in vivo*. Llevando a cabo el método de hisopado descrito en la sección 2.6.3, se evalúan las pre-formulaciones con *D. granadensis* y los productos comerciales en superficies reales. Se delimita el área de 100 cm² con marcos de madera autoclavados, en mesones no esterilizado de acero inoxidable (el cual es uno de los materiales recomendados por la farmacopea), instalados en laboratorios de: Fitoquímica, Microbiología e *in vitro* de la Subdirección científica del Jardín Botánico de Bogotá. Todos los ensayos se llevaron a cabo sin incidencia directa de luz solar a una temperatura promedio de 18°C. Los materiales empleados para la prueba fueron previamente esterilizados y los

¹⁴² UNLU, M., *et. al.*, Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food and Chemical Toxicology. Vol. 48. No. 11. 2010. p. 3274 – 3280.

participantes usaron elementos de protección con el fin de no alterar los resultados con microorganismos externos. Se obtienen los resultados de las tablas 29 a la 34.

Tabla 29. Resultados de prueba de superficies para el tratamiento 1.

Tratamiento	Antes	Después	Observaciones
1 (pH 4)			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto

Tabla 30. Resultados de prueba de superficies para el tratamiento 2.

Tratamiento	Antes	Después	Observaciones
2 (pH 7)			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto

Tabla 31. Resultados de prueba de superficies para el tratamiento 3.

Tratamiento	Antes	Después	Observaciones
3 (pH 10)			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto

Tabla 32. Resultados de prueba de superficies para la el producto comercial 1

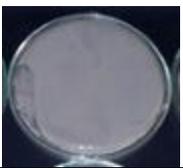
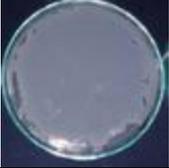
Tratamiento	Antes	Después	Observaciones
4 (Producto comercial 1)			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto

Tabla 33. Resultados de prueba de superficies para el producto comercial 2.

Tratamiento	Antes	Después	Observaciones
5 (Producto comercial 2)			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Ausencia de bacterias después de la aplicación del producto

Tabla 34. Resultados de prueba de superficies para el Blanco.

Tratamiento	Antes	Después	Observaciones
Blanco			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto
			Presencia de bacterias después de la aplicación del producto

Los resultados que se obtienen en la prueba se muestran de manera cualitativa (presencia o ausencia de bacterias después de aplicar el producto), debido a que, por la alta concentración de microorganismos, no se distinguen las unidades formadoras de colonias para hacer su respectivo conteo. Paralelo a esto, los resultados varían en gran medida, esto se debe a que, al ser diferentes superficies, no se tiene información sobre el tipo de materiales que se han puesto ahí, y por lo tanto, hay superficies más contaminadas que otras. La razón por la

cual en varias oportunidades hubo crecimiento después de aplicar el producto fue que no se realizó una limpieza preliminar al procedimiento empleado, y, según la sección 1.4.3 del marco teórico, la presencia de agentes externos, interfiere negativamente en la acción bactericida de los desinfectantes.

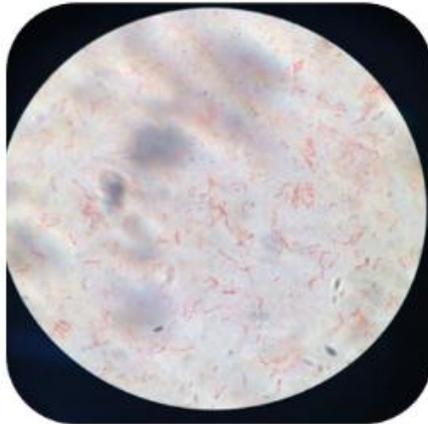
Por otro lado, el tipo de bacteria que se siembra en las cajas de Petri, varía de acuerdo con el tipo de cepas que esté presente. Con el ánimo de clasificar algunas de las bacterias presentes en 3 de las superficies evaluadas, se realiza una tinción de Gram; para hacerlo, se toma una muestra de la bacteria antes y después de la aplicación y se fijan en una placa de vidrio. Seguidamente, se aplican 4 colorantes en el orden que se especifica: Cristal violeta (por 1 minuto), Lugol (Por otro minuto), alcohol acetona (por 30 segundos) y safranina (por 1 minuto). Entre cada aplicación de colorantes se debe lavar con agua. Una vez termina la tinción, se dejan reposar y secar bien las placas como se observa en la ilustración 24.

Ilustración 24. Placas con la tinción de Gram.

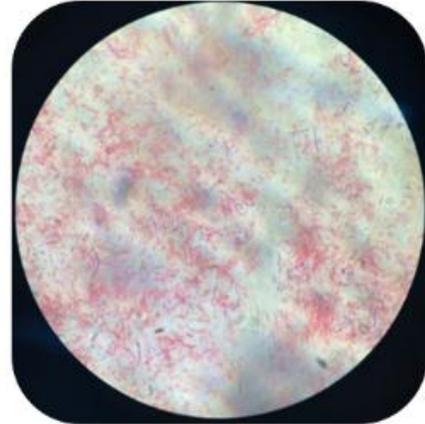


Una vez secas, se aplica aceite de inmersión y se observan los resultados en un microscopio marca Carl zeiss No. 982345 baujahr 1996. La ilustración 25 muestra las cepas bacterianas en el ensayo del tratamiento 5.

Ilustración 25. Tinción de gram en superficie 1.



a)



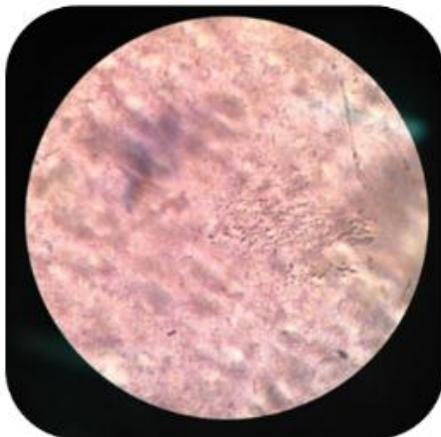
b)

Donde:

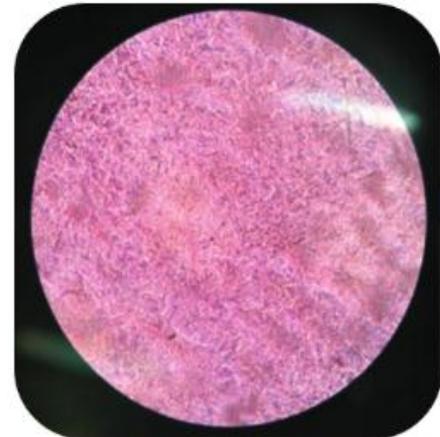
- a) Antes de aplicar el tratamiento 5: se identificaron bacilos gram negativos.
- b) Después de aplicar el producto comercial: hubo presencia de bacilos y cocos gram negativos y bacilos gram positivos.

Este primer resultado es, aparentemente, incoherente. No obstante, se debe tener en cuenta que las bacterias que se obtienen mediante el método de Tinción de gram, depende en gran medida de la muestra que se tome. En la caja de Petri del literal a, se tomó una muestra aleatoria, la cual sólo mostró presencia de bacilos gram negativos, sin embargo, al tratarse de un cultivo mixto, lo más seguro es que, si se toma otra muestra de la misma caja, se obtenga, además de los bacilos gram negativos, presencia de cocos gram negativos y bacilos gram positivos. En la ilustración 26 se observa el resultado de la tinción de gram para las bacterias presentes en el tratamiento 3.

Ilustración 26. Tinción de gram en superficie 2



a)



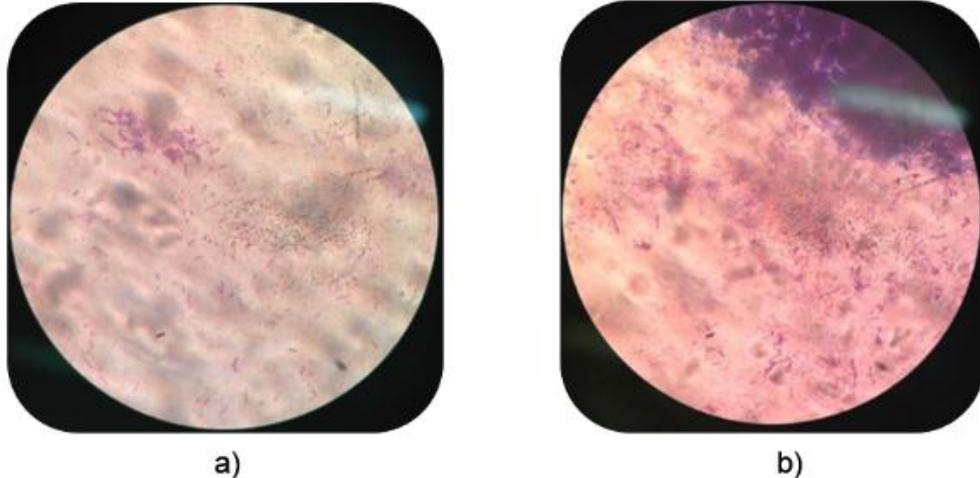
b)

Donde:

- a) Antes de aplicar el tratamiento 3: Se observan cocos gram positivos.
- b) Después de aplicar el producto con pH 10: También se observan cocos gram positivos.

La ilustración 27 muestra los resultados con respecto al blanco.

Ilustración 27. Tinción de gram en superficie 3.



Donde:

- a) Antes de aplicar el blanco: Se evidencian cocos y bacilos gram positivos.
- b) Después de aplicar el blanco: Se observa, de igual manera, cocos y bacilos gram positivos.

Al evidenciar tantas similitudes, antes y después de aplicar los tratamientos, se puede establecer que ninguno de los productos evaluados, posee una alta efectividad bactericida en cultivos mixtos, los cuales son comunes de encontrar en cualquier superficie. Al observar el crecimiento uniforme de las bacterias en las cajas de Petri, hubo imposibilidad de cuantificar las unidades de colonias formadas, y por lo tanto, no es posible afirmar de manera concreta cuál fue el tratamiento con los mejores resultados. No obstante, de manera visual, los tratamientos 1 y 5 fueron aquellos en los que se notó una disminución de bacterias, después de aplicar el producto correspondiente.

Para resumir los resultados preliminares, se considera que el tratamiento 1, el cual corresponde a un pH 4, es el más adecuado para hacer la formulación definitiva, no sólo porque mantiene una mejor apariencia en sus características organolépticas que los otros tratamientos, también presenta una estabilidad en su pH lo suficientemente buena (aunque no la mejor) y es el tratamiento con los

resultados más efectivos en cuanto a la actividad antibacteriana, según las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

4.6 PROPUESTA DE DISEÑO DEL PROCESO A NIVEL PILOTO

Una vez se selecciona el tratamiento 1 para la formulación de Driminator, es importante tomar como base los lineamientos descritos en el proceso de acondicionamiento y de manufactura a nivel laboratorio, para plantear una alternativa de producción a una mayor escala, en este caso, a nivel planta piloto. Esta propuesta se da inicio con la descripción del producto: presentación, contenido neto y características principales. Posteriormente se proponen las operaciones unitarias y finalmente se establecen los procesos específicos en un diagrama PFD.

4.6.1. Descripción del producto. Driminator tiene una presentación de envasado en un recipiente de polietileno de alta densidad con capacidad de 500 ml (ver ilustración 28), que viene junto a su respectiva tapa de color verde y un tapón de plástico para evitar que se derrame el líquido por los lados. El contenido neto es de 450 ml, el cual contiene la formulación especificada en la gráfica 7 con sus respectivos porcentajes.

Con respecto al rotulado y etiquetado, la etiqueta del producto muestra colores verdes llamativos, lo cual se relaciona con el hecho de su origen natural y su esencia a canela como se observa en la ilustración 29. Al ser un producto perteneciente al sector de aseo y limpieza debe cumplir con la norma técnica colombiana NTC 5465 para el rotulado o etiquetado¹⁴³. Como requisitos generales la siguiente información debe estar claramente legible y visible:

- Nombre especificado
- Nombre o razón social del fabricante
- País de origen
- Contenido neto (en volumen)
- Número de lote
- Número de registro sanitario
- Composición básica cualitativa
- Instrucciones de uso, precauciones y advertencias.¹⁴⁴

¹⁴³ NTC 5465 requisitos para el rotulado o etiquetado de productos de aseo y limpieza. Sección 4. 2 p.

¹⁴⁴ Ibid., 2p.

Gráfica 10. Formulación final de *Driminator*.

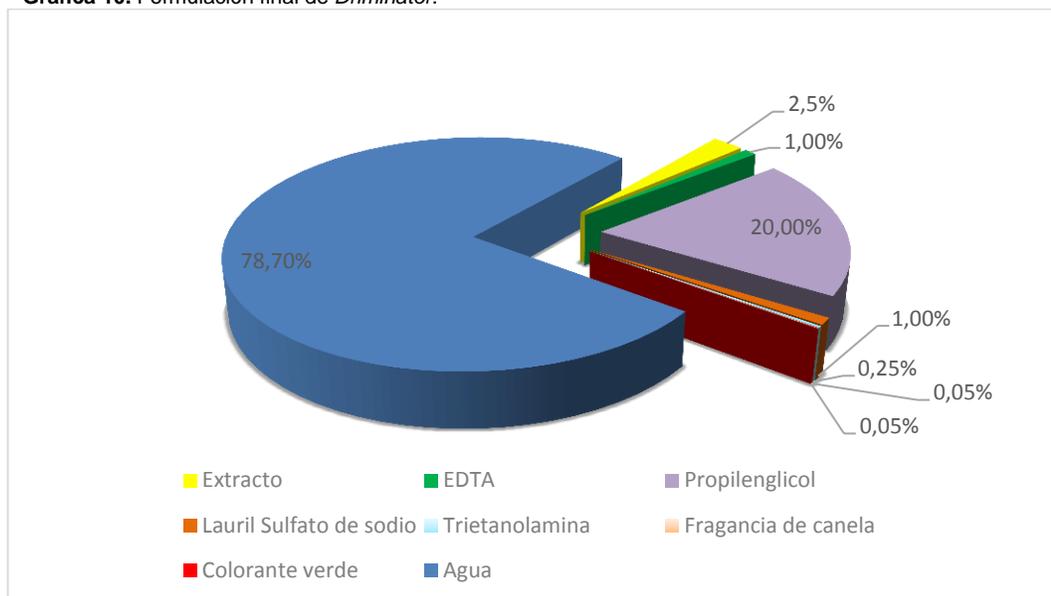


Ilustración 28. Recipiente para empacar el producto



Ilustración 29. Etiqueta del producto terminado.

Drimitanor



450ml
Canelo de páramo
Drimys granadensis
Fabricante:
 Jardín botánico de Bogotá
 José Celestino Mutis
País de Origen:
 Colombia

 **Jardín Botánico de Bogotá**
 José Celestino Mutis

Composición básica cualitativa:

- Agua
- Extracto
- EDTA
- Propilenglicol
- Lauril-sulfato de sodio
- Trietanolamina
- Colorante natural (verde)
- Fragancia de canela

Instrucciones de uso:
 Agregar 5 ml del producto directamente en la superficie a desinfectar y esparcir con un paño.

Precauciones y advertencias:



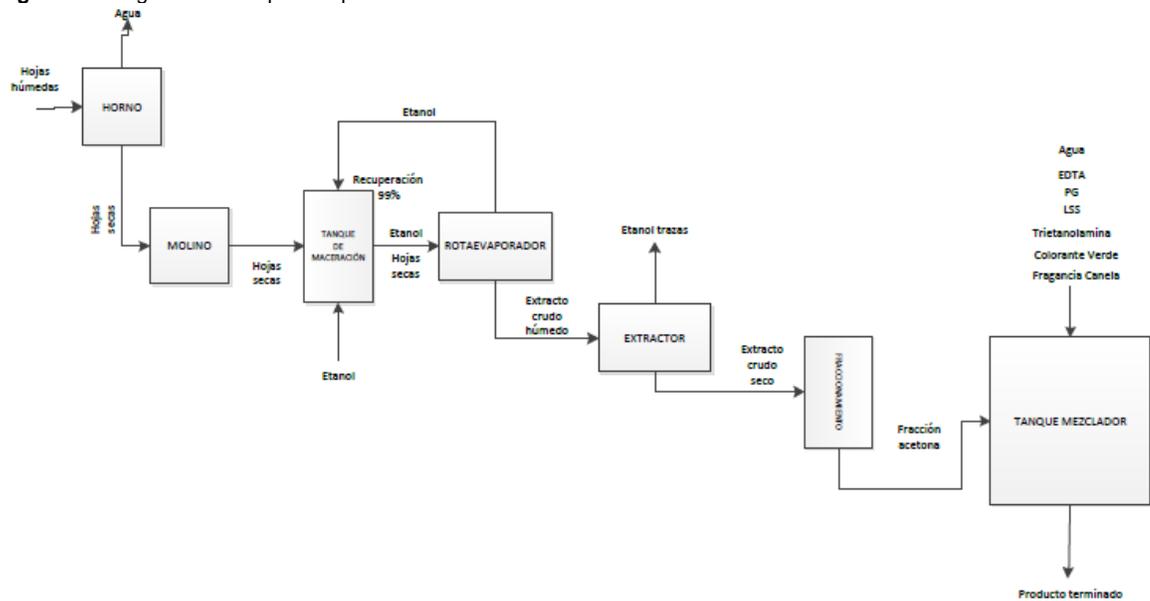

Las características principales de Driminator se pueden observar en la tabla 35.

Tabla 35. Características principales del producto terminado.

Características	
Olor	Canela
Color	Verde lima
Densidad	1,055 g/ml
pH	4
Miscibilible en agua	Si

4.6.2. Diagrama de bloques BFD. De acuerdo con los pasos que se realizan a nivel laboratorio, la propuesta de diseño se fundamenta en seguir la misma dinámica, empezando por el acondicionamiento de la materia prima (en este caso el extracto vegetal crudo de *D. granadensis*) hasta obtener la mezcla de la formulación, empacada y etiquetada. El diagrama básico de bloques se puede observar mediante la figura 18.

Figura 18. Diagrama de bloques de proceso.



Inicialmente, se tiene la recepción del material vegetal, el cual corresponde a las hojas recolectadas; al comenzar el proceso, se lleva a cabo una etapa de acondicionamiento de la materia prima, en la cual se elimina la humedad de las hojas por secado, y en seguida, una reducción de tamaño de las hojas; una vez se tiene preparado el material vegetal se procede a la etapa de maceración y extracción, utilizando etanol 96% como solvente, teniendo en cuenta que es importante hacer recirculación del etanol, para recuperar el solvente durante el proceso; para asegurar que el extracto esté seco, se adiciona una etapa de extracción, donde se remueven las trazas de etanol que queden. La quinta

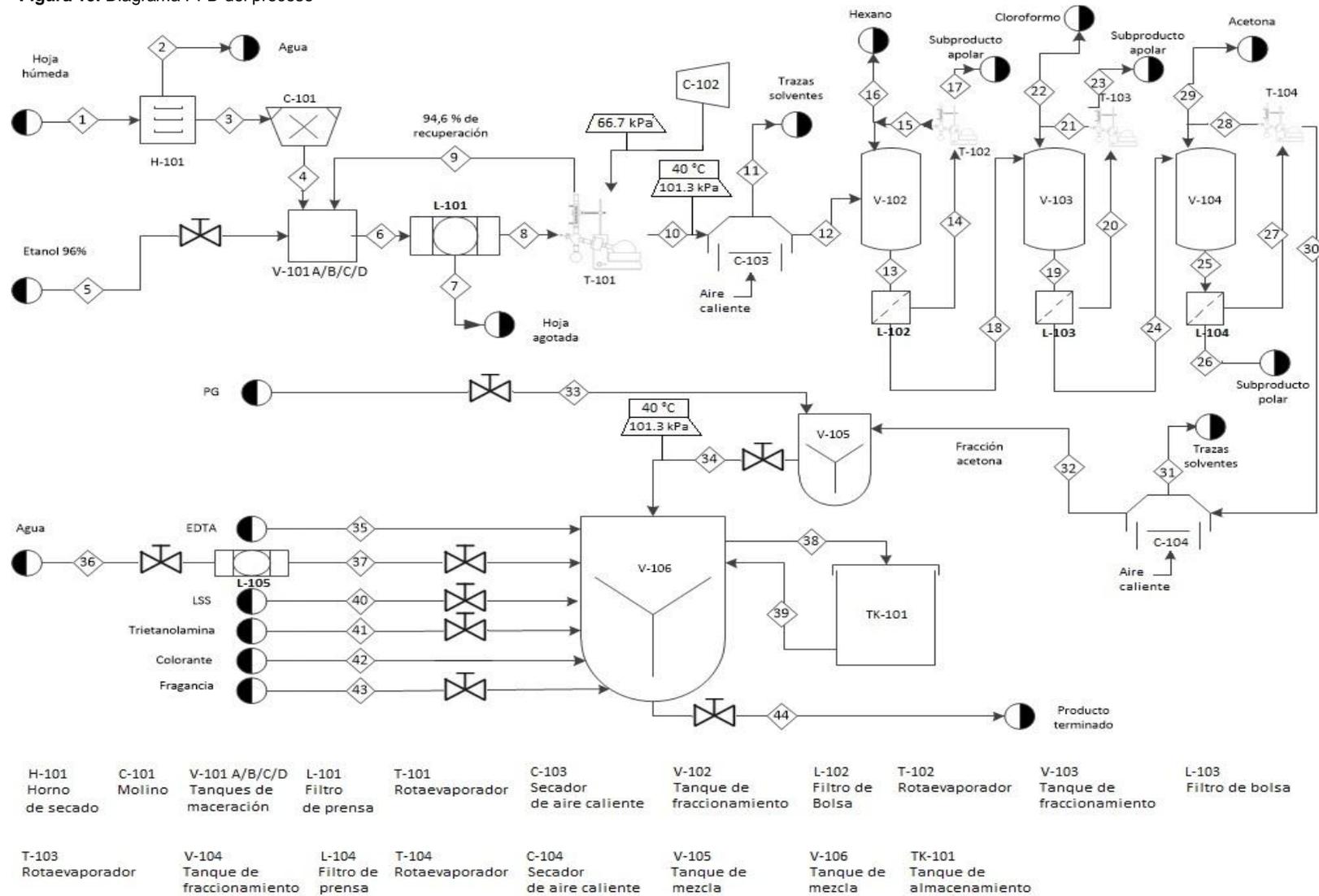
operación es un fraccionamiento del extracto crudo obtenido, por medio de extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente, hasta la obtención de la fracción de acetona, la cual hace parte de las materias primas alimentadas en el proceso de mezclado, donde se agregan los aditivos presentes en la formulación hasta la completa homogenización, obteniéndose finalmente el desinfectante en estado líquido, el cual pasará la etapa final de manufactura donde se realiza el envasado y etiquetado del producto terminado.

4.6.3 Diagrama de proceso PFD. Teniendo en cuenta las operaciones unitarias propuestas en el diagrama de bloques BFD, se plantea el diagrama de proceso PFD a escala piloto como se observa en la figura 19. A su vez, se toman en cuenta las siguientes consideraciones en el balance de masa:

- Producción de Driminator: 200 L/mes.
- La recuperación de etanol es del 94,6% y de acetona un 76,3%. Con base en las volatilidades, se estima que se recupera un 80% de hexano y un 90% de cloroformo ¹⁴⁵.
- Se usa el 10% de hexano sobre la cantidad (en volumen) de etanol total requerido, en el fraccionamiento. La fracción remanente queda con trazas de este solvente, las cuales a medida que avanza el proceso, se pierden por evaporación.
- Se usa el 30% de cloroformo sobre la cantidad (en volumen) de etanol total requerido, en el fraccionamiento. La fracción remanente queda con trazas de este solvente, las cuales a medida que avanza el proceso, se pierden por evaporación.
- Se usa el 20% de acetona sobre la cantidad (en volumen) de etanol total requerido, en el fraccionamiento. El producto final queda con trazas de solvente, sin embargo, para efectos de cálculos, se asume un 0%, debido a que, por su alta volatilidad, se evapora el remanente luego de su fraccionamiento.
- Humedad de las hojas: 50.24%. Se elimina el 99% del agua en las hojas.
- Las pérdidas se deben a partes del extracto que quedan adheridas a las paredes de tanques y paletas de agitación.

¹⁴⁵ DIRSCHERL, J., Ecology Squared. Solvent Recovery without coolant. En línea. http://www.vacuubrand.com/context/recent_papers/2009_01_EN_Peltronic_cpp.pdf

Figura 19. Diagrama PFD del proceso



4.6.3.1 Balances de materia. Se determina el balance de materia por cada lote, en cada uno de los equipos propuestos. Asumiendo que la producción mensual es de 200 L y se tienen 4 tanques de maceración diferentes. En el balance se muestra la cantidad mensual total en las operaciones de acondicionamiento de la materia prima (Secado y trituración), y seguidamente, muestra los cálculos hechos por cada lote.

Horno de secado: Al momento de recibir las hojas húmedas de *D. granadensis*, es necesario contar con un horno de secado (figura 20), el cual pueda remover el agua presente en el material vegetal, antes de pasar a la etapa de trituración, como lo muestra la tabla 36.

Figura 20. Balance por equipo: Horno de secado.

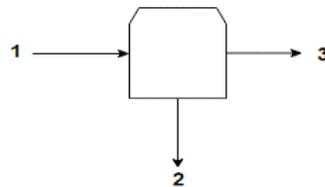


Tabla 36. Balance de masa en el horno

Corriente	Componentes (kg mensual)			Total
	Hoja sin extracto	Agua	Hoja seca	
1	80.13	104.13		209.26
2		104.13		104.13
3			80.13	105.13

Molino Pulverizador: Se alimenta con hojas secas y se saca la misma cantidad de hojas secas, con un menor tamaño como se observa en la tabla 37. (Ver figura 21)

Figura 21. Balance por equipo: Molino pulverizador.

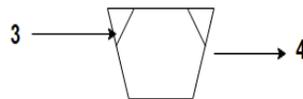


Tabla 37. Balance de masa en el molino.

Corriente	Componentes (kg mensual)		Total
	Hoja seca	Extracto	
3	80.13	25	105.13
4	80.13	25	105.13

Tanques de maceración: Esta etapa es el cuello de botella del proceso. Está representada en el diagrama como un solo equipo (ver figura 22), sin embargo, con la cantidad de producto obtenida al mes, y teniendo en cuenta el largo tiempo que consume esta operación, se propuso colocar a funcionar 4 tanques de estos,

cada dos días; de esta forma, se le da un mayor porcentaje de uso al equipo de mezclado principal que se verá más adelante. (Ver tabla 38)

Figura 22. Balance por equipo: Tanque de maceración.

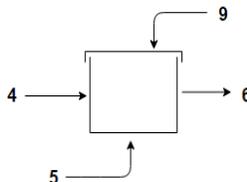


Tabla 38. Balance de masa en el tanque de maceración

Corriente	Componentes (kg por lote)			Total
	Hoja seca	Extracto	Etanol	
4	20.03	6.25	0	26.28
5	0	0	11.198	11.198
6	20.03	6.25	207.37	233.65
9	0	0	196.17	196.17

Filtro de sólidos: Se propone emplear un filtro de prensa para este punto (ver figura 23), debido a que, por su alta presión ejercida, el material sólido sale del proceso con un porcentaje inferior al 1% de humedad como se aprecia en el balance de la tabla 39.

Figura 23. Balance por equipo: Filtro de sólidos.

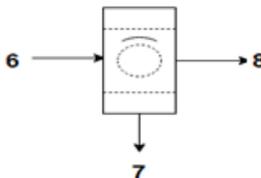


Tabla 39. Balance de masa en el filtro de prensa.

Corriente	Componentes (kg por lote)			Total
	Hoja seca	Extracto	Etanol	
6	20,033	6,25	207,37	233,653
7	20,033	0	2,074	22,107
8	0	6,25	205	211,550

Rotaevaporador: La mezcla líquida etanol-extracto pasa por un proceso de destilación mediante este equipo (ver figura 24), a una temperatura de 40°C a presión de 500 mmHg, en el cual se recupera parte del etanol a recircular como lo muestra el balance de la tabla 40.

Figura 24. Balance por equipo: Rotaevaporador.

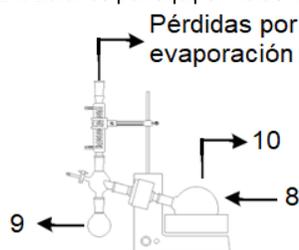


Tabla 40. Balance de masa en el rotaevaporador

Corriente	Componentes (kg por lote)			Total
	Hoja seca	Extracto	Etanol	
8	0	6,25	205,3	211,55
9	0	0	194,210	194,21
10	0	6,25	11,086	17,336

Secador: Se desea emplear un secador batch de correa con flujo de aire caliente como se muestra en la figura 25, suministrado por la parte inferior y superior, para lograr un proceso de secado eficaz y uniforme. (Ver tabla 41)

Figura 25. Balance por equipo: Secador.

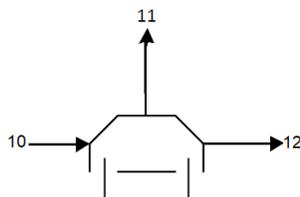


Tabla 41. Balance de masa en el secador.

Corriente	Componentes (kg por lote)			Total
	Hoja seca	Extracto	Etanol	
10	0	6,25	11,086	17,336
11	0	0	10,975	10,975
12	0	6,25	0,111	6,3609

Operación de fraccionamiento: Aunque en el diagrama se especifique como 3 tanques (figuras 26, 27 y 28; tablas 42, 43 y 44), 3 filtros (figuras 29, 30 y 31; tablas 45, 46 y 47) y 3 rotaevaporadores diferentes (figuras 32, 33 y 34; tablas 48, 49 y 50), todo el procedimiento hace referencia a un solo tanque, en el cual, se hace una mezcla del solvente respectivo, a una temperatura de 40°C, para facilitar la separación de las moléculas; un filtro de bolsa, el cual servirá para separar de manera manual y rápida, las fracciones de hexano, cloroformo y la más polar; y finalmente, un rotaevaporador (distinto al del extracto total), donde se concentran los subproductos obtenidos y se recupera parte de los solventes.

**Hexano:
Tanque de fraccionamiento.**

Figura 26. Balance por equipo: Tanque de fraccionamiento (hexano).

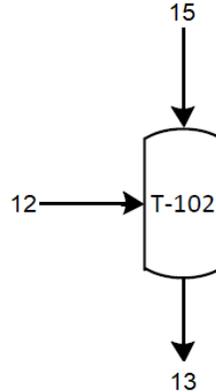


Tabla 42. Balance de masa en el tanque de fraccionamiento de hexano.

Corriente	Componentes (kg por lote)			Total
	Extracto	Etanol	Hexano	
12	6,25	0,1109	0	6,3609
13	6,25	0,1109	17,215	23,5759
15	0	0	13,497	13,497

Filtro de bolsa.

Figura 27. Balance por equipo: Filtro de bolsa (hexano).

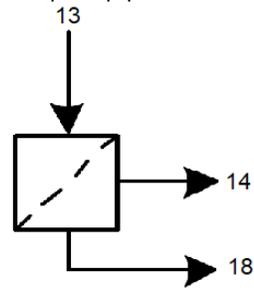


Tabla 43. Balance de masa en el filtro de prensa (hexano).

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Extracto	Etanol	Hexano	Fracción hexano	
13	6,25	0,1109	17,215	0	23,5759
14	0	0,1109	16,871	0,7756	17,7575
18	5,474	0	0,3443	0	5,8183

Rotaevaporador.

Figura 28. Balance por equipo: Rotaevaporador (hexano).

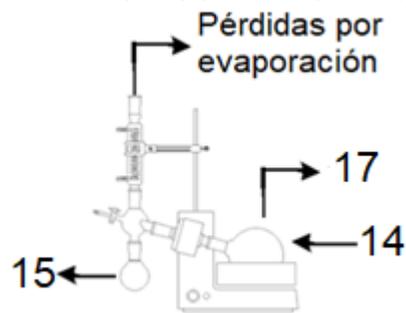


Tabla 44. Balance de masa en el rotaevaporador (hexano)

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Extracto	Etanol	Hexano	Fracción hexano	
14	0	0,1109	16,871	0,7756	17,7575
15	0	0	13,497	0	13,497
17	0	0,1109	3,3742	0,7756	4,2607

Cloroformo: Tanque de fraccionamiento.

Figura 29. Balance por equipo: Tanque de fraccionamiento (cloroformo).

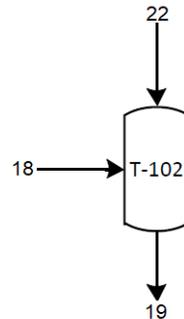


Tabla 45. Balance de masa en el tanque de fraccionamiento de cloroformo.

Corriente	Componentes (kg por lote)			Total
	Extracto	Hexano	Cloroformo	
18	5,4744	0,3443	0	5,8187
19	5,4744	0,3443	117,48	123,2987
22	0	0	13,863	13,863

Filtro de bolsa.

Figura 30. Balance por equipo: Filtro de bolsa (cloroformo).

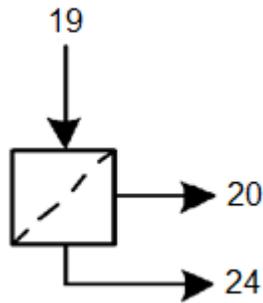


Tabla 46. Balance de masa en el filtro de prensa (cloroformo).

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Extracto	Hexano	Cloroformo	Fracción cloroformo	
19	5,4744	0,3443	117,48	0	123,2987
20	0	0,2066	115,13	2,8694	118,206
24	2,605	0,1377	2,3497	0	5,0924

Rotaevaporador.

Figura 31. Balance por equipo: Rotaevaporador (cloroformo).

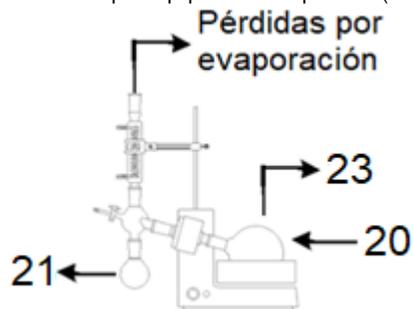


Tabla 47. Balance de masa en el rotaevaporador (cloroformo).

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Extracto	Hexano	Cloroformo	Fracción cloroformo	
20	0	0,2066	115,13	2,8694	118,206
21	0	0	103,62	0	103,62
23	0	0,2066	11,513	2,8694	14,589

**Acetona:
Tanque de fraccionamiento.**

Figura 32. Balance por equipo: Tanque de fraccionamiento (acetona).

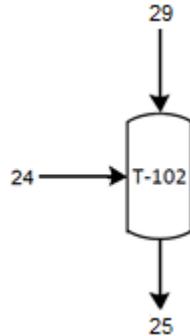


Tabla 48. Balance de masa en el tanque de fraccionamiento de acetona.

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Extracto	Hexano	Cloroformo	Acetona	
24	2,605	0,1377	2,3497	0	5,0924
25	2,605	0,1377	2,3497	41,579	46,6714
29	0	0	0	10,489	10,489

Filtro de bolsa.

Figura 33. Balance por equipo: Filtro de bolsa (acetona).

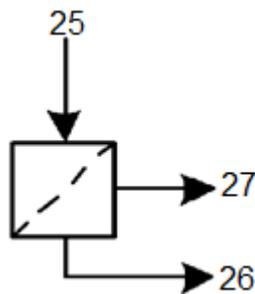


Tabla 49. Balance de masa en el filtro de prensa (Acetona).

Corriente	Componentes (kg por lote)					Fracción acetona	Total
	Extracto	Hexano	Cloroformo	Acetona	Pérdidas		
25	2,605	0,1377	2,3497	41,579	0	0	46,6714
26	0	0,0138	0,7049	0,8316	1,3544	0	2,9047
27	0	0,1239	1,6448	40,747	0	1,2506	43,7663

Rotaevaporador.

Figura 34. Balance por equipo: Rotaevaporador (acetona).

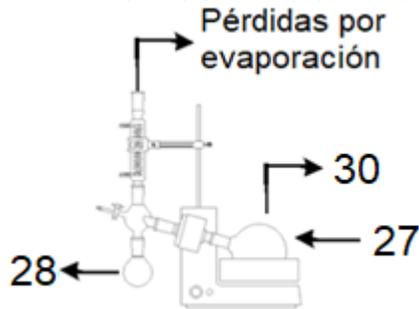


Tabla 50. Balance de masa en el rotaevaporador (acetona).

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Hexano	Cloroformo	Acetona	Fracción acetona	
27	0,1239	1,6448	40,747	1,2506	43,7663
28	0	0	31,09	0	31,09
30	0,1239	1,6448	9,6572	1,2506	12,6765

Secador: Se utiliza el mismo tipo de secador para la primera fase, debido a que la fracción de acetona tiene una alta viscosidad, por lo cual resulta difícil de maniobrar.

Figura 35. Balance por equipo: Secador de la fracción.

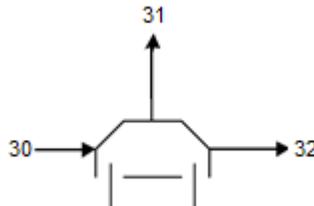


Tabla 51. Balance de masa en el secador (fracción)

Corriente	Componentes (kg por lote)				Total
	Hexano	Cloroformo	Acetona	Fracción acetona	
30	0,1239	1,6448	9,6572	1,2506	12,6765
31	0,1239	1,6448	9,6572	0	11,4259
32	0	0	0	1,2506	1,2506

Tanque de mezclado PG-Fracción acetona: Previo a la mezcla principal, es recomendable mezclar el propilenglicol con la fracción de acetona durante 2 horas, debido a que el PG ayuda a que la fracción fluya con más facilidad y, a su vez, aumenta su solubilidad en el resto de la mezcla por su carácter anfílico.

Figura 36. Balance por equipo: Tanque pre-mezclado.

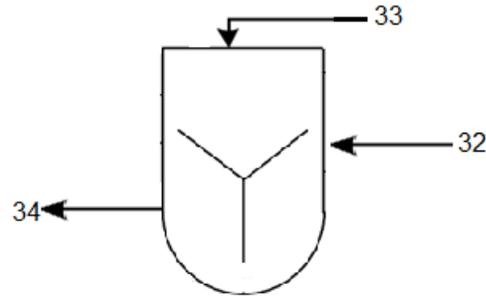


Tabla 52. Balance de masa en el tanque pre-mezclado.

Corriente	Componentes (kg por lote)		Total
	Fracción acetona	Propilenglicol	
32	1,2506	0	1,2506
33	0	10,4	10,4
34	1,2506	10,4	11,6506

Tanque de mezclado principal y tanque de almacenamiento auxiliar: Simultáneamente con la mezcla PG-Fracción de acetona, se sugiere mezclar EDTA + AGUA en el tanque principal durante 2 horas. Posteriormente, almacenar esta solución en un tanque de plástico, mientras la mezcla PG-Fracción de acetona se transfiere al tanque principal, para mezclarse con el resto de los aditivos durante 2 horas. Pasado este tiempo, se retorna el EDTA+AGUA al tanque principal para mezclar todos los aditivos y obtener el producto deseado.

Figura 37. Balance por equipo: Tanque mezclado principal

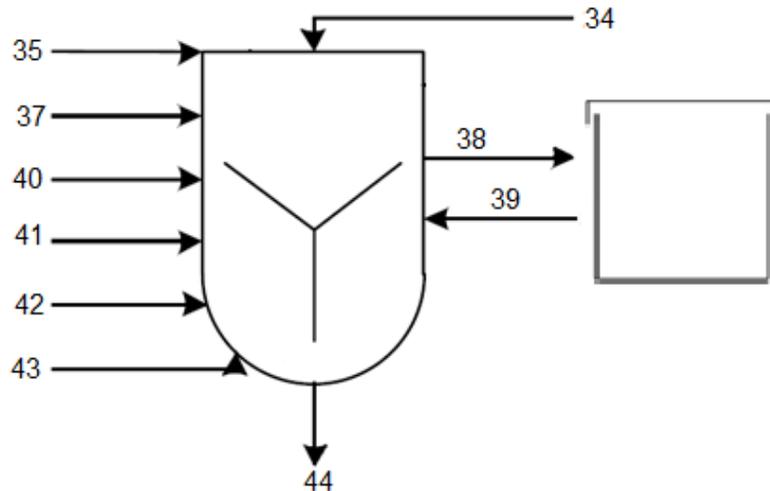


Tabla 53. Balance de masa en el tanque de mezcla principal.

Componente (kg por lote)	Corriente									
	34	35	37	38	39	40	41	42	43	44
Fracción acetona	1,2506	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2506
Propilenglicol	10,4	0	0	0	0	0	0	0	0	10,4
Agua	0	0	39,35	39,35	39,35	0	0	0	0	39,35
EDTA	0	0,5	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0,5
Colorante	0	0	0	0	0	0	0	0,025	0	0,025
Fragancia	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0263	0,0263
Texapón	0	0	0	0	0	0,525	0	0	0	0,525
Alcalinizante	0	0	0	0	0	0	0,1413	0	0	0,1413
Total (kg)	11,6506	0,5	39,35	39,85	39,85	0,525	0,1413	0,025	0,0263	52,2182

En total, se obtiene 52.2182 kg de producto total terminado, teniendo en cuenta que su densidad es de 1.055 kg/L, se obtiene un total de 49.495 L por cada lote, coincidiendo con la proyección de 50 L por lote que se tenía prevista. En los ANEXOS G se puede observar la tabla completa del balance de materia.

Balance global: Teniendo en cuenta las cantidades empleadas por lote en cada uno de los equipos, se plantea el balance global del proceso (Ver figura 38), sin tener en cuenta las corrientes y procesos intermedios. La tabla 54 muestra los resultados.

Figura 38. Balance global de proceso.

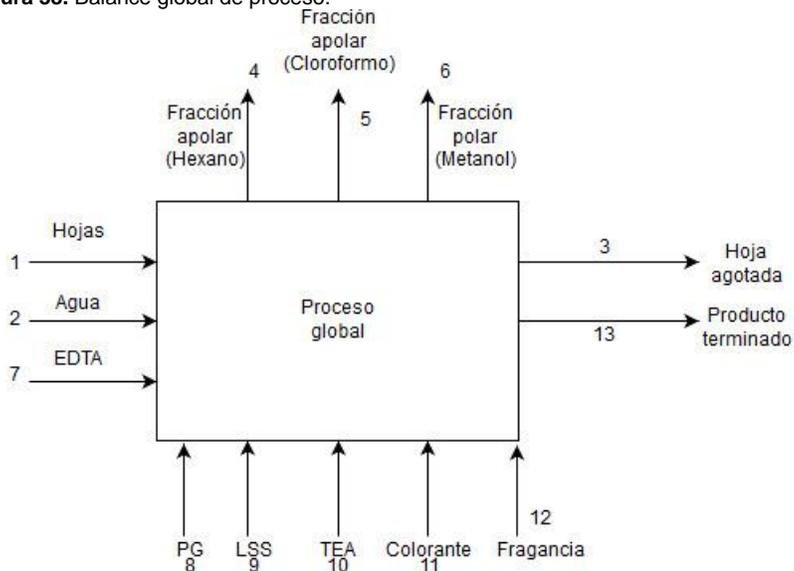


Tabla 54. Balance global del proceso.

Componente (kg por lote)	Corriente												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Hojas (sin extracto)	20,0	0	20,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua	26,0	39,4	26,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fracción hexano	0	0	0	0,78	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fracción cloroformo	0	0	0	0	2,9	0	0	0	0	0	0	0	0
Fracción metanol	0	0	0	0	0	1,4	0	0	0	0	0	0	0
PG	0	0	0	0	0	0	0	10,4	0	0	0	0	0
EDTA	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
LSS	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0
TEA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0
Colorante	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,03	0	0
Fragancia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,03	0
Producto terminado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52,2
Total	52,3	39,4	46,1	0,8	2,9	1,4	0,5	10,4	0,5	0,1	0,03	0,03	52,2

4.6.3.2 Tiempos de operación. Si se desea producir 200 L mensuales, se debe tener en cuenta que el modo de trabajo se conforma por 1 turno diurno de 48 horas semanales de lunes a sábado. Siendo así, se organizan los modos de trabajo por lote mediante la figura 39. Cada cuadro en el diagrama representa un día laboral. Dependiendo de la duración (en horas) de cada una de las actividades o procesos, se organiza la secuencia para cada día. Los tiempos de cada proceso individual se planean de la siguiente manera:

Inicio: Recepción de hojas de *Drimys granadensis*.

Secado: 24 horas.

Trituración: 2 horas.

Maceración: 8 días (incluyendo domingos).

Filtración y evaporación de solvente (rotaevaporador): 8 horas

Disminución de trazas de etanol por secado: 24 horas

Agitación y filtración de hexano: 1 hora

Recuperación de hexano: 2 horas

Agitación y filtración de cloroformo: 3 horas

Recuperación de cloroformo: 3 horas

Agitación y filtración acetona: 2 horas

Recuperación de acetona: 1 hora

Eliminación de trazas de solvente: 20 horas

Mezcla PG con fracción acetona: 2 horas

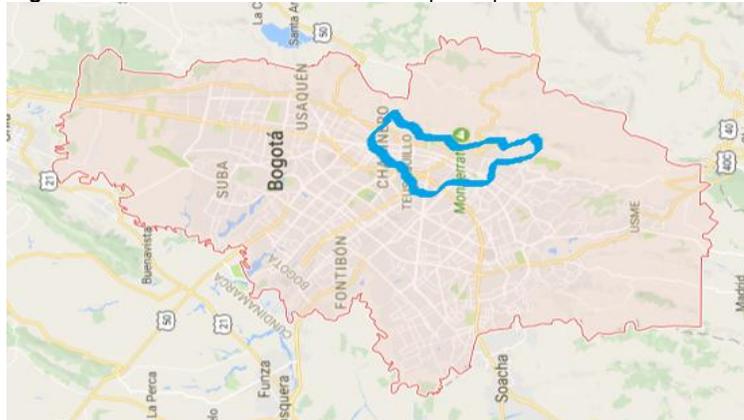
Mezcla EDTA con agua: 2 horas (simultáneo con la mezcla PG + Fracción acetona)

5. COSTOS

El proyecto se basa en un flujo de caja experimental de tres meses, donde se asume una demanda de mercado de 200 litros vendidos al mes, para consumidores del sector doméstico en la ciudad de Bogotá.

LOCALIZACIÓN: Para los temas de macro localización se propuso que la planta piloto este lo más cerca posible del lugar de colecta de la especie, es decir el centro de la ciudad hacia los cerros orientales, sin embargo por tratarse del eje ambiental de la ciudad de Bogotá, es difícil la ubicación en esta zona, por tal motivo se propusieron las localidades de los mártires o Santafé, lo cual disminuye los costos asociados a esta materia prima, como lo expone Córdoba¹⁴⁶ este lugar está determinado con el fin de lograr la máxima utilidad o el mínimo costo. De igual forma no puede estar muy alejado del mercado de los consumidores potenciales. El espacio rodeado en la figura 40 sería la zona más pertinente de ubicación.

Figura 40. Área de macro localización de la planta piloto.



Fuente: Imagen de Google Maps¹⁴⁷

TAMAÑO: Siendo congruentes con el criterio tomado de manejar los equipos más pequeños a nivel industrial para el desarrollo de la propuesta a escala piloto, se limita directamente el tamaño de la producción, es decir se asume una demanda constante de 444 unidades vendidas al mes, para los tres periodos de evolución.

TECNOLOGÍA: Generalmente viene dada por el tamaño o demanda del producto, al tratarse de un volumen de producción bajo no es necesario contar con alta automatización, por el contrario por el modo en que se desarrolla el proceso es necesario de personal, específicamente un ingeniero químico que lidere la producción y un operario, que se encargara tanto de las etapas de alistamiento

¹⁴⁶ CORDOBA, Marcial. Formulación y evaluación de proyectos. Ecoe ediciones. 2da edición. Bogota. 2011.

¹⁴⁷ "Google Maps", Mapa de Bogotá., En línea. [Consultado: 20 de mayo de 2017] <<https://www.google.com.co/maps/place/Bogot%C3%A1/@4.6289191,-74.4061285,10.25z/data=!4m5!3m4!1s0x8e3f9bfd2da6cb29:0x239d635520a33914!8m2!3d4.7109886!4d-74.072092> >

del extracto, como del proceso de producción del desinfectante. Anexo a esto surge la necesidad de una capacitación para el correcto manejo del proceso en general por parte de los operarios.

5.1 EVALUACION FINANCIERA

La evaluación financiera se pretende desarrollar en dos escenarios, el primer escenario donde la inversión del proyecto se realiza con recursos propios de los dueños, donde el flujo de capital es aportada por los mismos, y un segundo escenario con una financiación por parte de una entidad externa que aportara la mitad del capital para la inversión inicial.

Para esta evaluación del proyecto se deben tener en cuenta factores claves como los son la TIO, el impuesto de renta, las depreciaciones y finalmente tasa de interés para el segundo escenario.

La TIO es una tasa que se entiende como el interés promedio ponderado por el uso del dinero proveniente de las diferentes fuentes de financiamiento¹⁴⁸, es decir es la rentabilidad mínima aceptable que esperan los dueños del proyecto, además de reflejar el costo de oportunidad debe reflejar el riesgo asociado al proyecto¹⁴⁹, por lo tanto debe tener dos componentes:

- Rentabilidad sin riesgo
- Retribución por el riesgo que se corre en el proyecto

El primer componente, como su nombre lo indica, es una tasa que no representa ningún riesgo para los inversionistas¹⁵⁰, algunos ejemplos de estas son las tasas en un fondo de inversión, o los títulos de tesorería que ofrece el gobierno, para la presente evaluación se fijó 15 % como tasa libre de riesgo pues es un rendimiento que ofrecen algunos fondos de inversión. En cuanto al segundo componente, como el proyecto trata de un producto nuevo debe contar con un componente que le involucre el riesgo que se corre en su ejecución, por consiguiente se toma un margen de 10 % atribuido a esta incertidumbre.

Teniendo en cuenta estos dos componentes la TIO manejada para el presente proyecto será del 25% efectiva anual.

El impuesto de renta es un impuesto que tiene cobertura en todo el país y para su cuantificación se requiere establecer la utilidad generada por el desarrollo de

¹⁴⁸ HERNANDEZ, 2001, citado por ROJAS, Miguel. Evaluación de Proyectos para Ingenieros. Bogotá: Ecoe ediciones, 2015. Sección 4.

¹⁴⁹ Ibid., seccion4.

¹⁵⁰ Superintendencia Financiera de Colombia. Tasa libre de Riesgo. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] < <https://www.superfinanciera.gov.co/jsp/loader.jsf?!Servicio=Glosario&ITipo=user&IFuncion=main&letra=T> >

actividades durante un año¹⁵¹. El artículo 240 del estatuto tributario nacional, establece que la tarifa general del impuesto sobre la renta será del 34% para el año gravable 2017¹⁵². Por lo tanto se tomara esta tasa para calcular los impuestos en el proyecto.

Debido a que el estudio experimental está planteado sobre un horizonte de evaluación en periodos mensuales es necesario convertir la TIO efectiva anual a una tasa de interés periódica vencida por la ecuación 5.

Ecuación 5. Conversión de tasa EA – PV.

$$IPV = [(1 + EA)^{\frac{1}{12}} - 1]$$

Obteniendo una tasa de oportunidad de 1.88 % mensual.

En cuanto a la depreciación, entendiéndose esta como el mecanismo mediante el cual se reconoce el desgaste y pérdida de valor que sufre un bien o un activo por el uso que se haga de él¹⁵³, se plantea calcular únicamente el desgaste que sufren los equipos en el proceso por el método de línea recta.

La vida útil propuesta es de 10 años para todos los equipos, sabiendo que el horizonte de evaluación es de tres meses, se calcula la depreciación para cada periodo por la ecuación 6.

Ecuación 6. Depreciación en línea recta.

$$\frac{\text{Valor del activo}}{\text{Vida util (meses)}}$$

COSTOS DE PRODUCCION EXPERIMENTAL

Se planea hacer volumen de producción mensual de 200 Litros que equivalen a 444 unidades producidas en el mes. El plan de producción será de la siguiente manera: se tendrá el primer lote de producción a los 13 días de iniciado el proceso de acondicionamiento del ingrediente activo, luego de esto se tendrá producción cada tercer día, para un total de 4 corridas de producción al mes, los 3 días restantes serán de limpieza y desinfección de equipos.

¹⁵¹ DIAN. Actualizado 24 de enero de 2016. Generalidades sobre el impuesto sobre la renta y complementarios, ventas, timbre. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017]

< <http://www.dian.gov.co/DIAN/12SobreD.nsf/pages/Impuestosinternos#2> >

¹⁵² ACTUALÍCESE. Publicado el 10 de enero de 2017. Tarifas del impuesto sobre la renta fueron modificadas por la reforma tributaria. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] < <http://actualicese.com/actualidad/2017/01/10/tarifas-del-impuesto-sobre-la-renta-fueron-modificadas-por-la-reforma-tributaria/> >

¹⁵³ Gerencie. Publicado el 14 de marzo de 2017. Depreciación de activos. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] < <https://www.gerencie.com/depreciacion.html> >

Los costos de producción se dividen en dos grupos principalmente, costos fijos y costos variables, los cuales se presentan a continuación

COSTOS VARIABLES

- Materia prima
- Insumos
- Mano de obra directa
- Envases y etiquetas

COSTOS FIJOS

- Depreciación
- Impuestos
- Financiación

Para el costo de materias primas se desarrolló una cotización en la empresa Lega Químicos, la cantidad requerida de cada compuesto junto con su costo para una producción mensual se presenta en la tabla 55. En cuanto el extracto se calculó el costo teniendo en cuenta precios de plantas medicinales similares a *D. granadensis*, además de esto el costo del agua se calculó mediante las tarifas del acueducto de Bogotá para el año 2017.¹⁵⁴

Tabla 55. Costo mensual de materias primas.

Materias Primas	Porcentaje	Cantidad requerida	Costo
Extracto	2,5%	5,0 kg	\$ 180.000
EDTA	1,00%	2,0 kg	\$ 26.400
Propilenglicol	20,00%	40,0 L	\$ 360.000
Lauril Sulfato de sodio	1,00%	2,0 L	\$ 40.000
Trietanolamina	0,25%	0,5 L	\$ 7.300
Fragancia de canela	0,05%	0,100 L	\$ 5.073
Colorante verde limón	0,05%	0,100 kg	\$ 7.200
Agua	78,70%	157,4 L	\$ 8.314
TOTAL	100,00%		\$ 634.287

En el proceso de obtención del extracto es necesario de algunos solventes que son tenidos en cuenta como insumos en el proceso, la cantidad requerida para una producción mensual junto con su costo se relacionan en la tabla 56.

Tabla 56. Costo mensual de insumos.

Insumo	Cantidad requerida	Costo
Etanol	305,4 L	\$ 2.443.200
Hexano	43,31 L	\$ 2.477.332
Cloroformo	106,76 L	\$ 9.821.920
Acetona	92,35 L	\$ 3.509.300
TOTAL		\$ 18.251.752

¹⁵⁴ Acueducto agua y alcantarillado de Bogotá. Tarifas servicios de Acueducto y alcantarillado. Tarifas 2017.

En cuanto a los costos de mano de obra directa, según la estructura propuesta, para un ingeniero químico se tomó el salario base de un recién graduado según un artículo de la revista Semana,¹⁵⁵ y un operario devengando un salario mínimo legal vigente, costos presentados en la tabla 57.

Tabla 57. Costos mensuales de mano de obra.

Mano de obra	Salario/persona	Salario Integral
Ingeniero químico	\$ 1.664.788	\$ 2.037.701
Operario	\$ 737.717	\$ 902.966
TOTAL		\$ 2.940.666

El producto terminado esta contenido dentro de un envase primario de 500 mL de polietileno de alta densidad y una etiqueta con la información respectiva en cuanto a nombre del producto, contenido neto en volumen, composición básica y lote de producción. El costo del embalaje anteriormente descrito tiene un costo de \$80.000 COP mensuales, costo indicado por la tabla 58.

Tabla 58. Costos mensuales de embalaje.

Embalaje	Precio unitario	Cantidad	Precio
Envase	300	444	\$ 133.200
Etiqueta	100	444	\$ 44.400
Tapón de seguridad	20	444	\$ 8.880
TOTAL			\$186.480

COSTOS FIJOS

Como costos fijos se fijaron la depreciación mensual calculada para los equipos, el impuesto de renta gravable para el 2017 y la financiación por parte de una entidad externa.

INVERSIÓN

Basados en la propuesta de diseño de proceso que se plantea en el diagrama PFD (ver figura 19), se desarrollaron cotizaciones para cada una de las unidades de proceso manejando volúmenes acordes a la producción, el costo para cada equipo se especifica en la tabla 59.

¹⁵⁵ ¿Cuánto ganan los recién graduados? En: Revista Semana [en línea](3 de abril de 2017) disponible en < <http://www.semana.com/educacion/articulo/salario-de-un-recien-egresado/517340>>

Tabla 59. Costos de inversión (equipos).

Equipos	Precio Unitario	Cantidad	Precio
Horno de secado	\$ 3.000.000	1	\$ 3.000.000
Molino pulverizador	\$ 2.000.000	1	\$ 2.000.000
Tanque maceración	\$ 600.000	4	\$ 2.400.000
Filtro Prensa	\$ 9.260.000	1	\$ 9.260.000
Filtro de bolsa	\$ 875.000	1	\$ 875.000
Rotaevaporador industrial	\$ 35.000.000	2	\$ 70.000.000
Secador	\$ 26.046.000	1	\$ 1.364.600
Tanque de fraccionamiento 1	\$ 14.470.000	1	\$ 14.470.000
Tanque de fraccionamiento 2	\$ 23.152.000	1	\$ 23.152.000
Tanque mezclador	\$ 17.436.350	2	\$ 34.872.700
Tanque auxiliar	\$ 50.000	1	\$ 50.000
Filtros de agua	\$ 1.000.000	1	\$ 1.000.000
TOTAL			\$187.125.700

Como resultado de estos datos se tiene una inversión de \$ 187.125.700 COP, también cabe aclarar que se propuso un valor de salvamento para todos los equipos de \$ 182.000.000 COP al finalizar el periodo de evaluación, generando el flujo de fondos para cada uno de los 3 meses (ver tabla 60).

Tabla 60. Flujo general de fondos (pesos colombianos).

Meses	0	1	2	3
Ingresos, ventas		6.000.000	6.000.000	6.000.000
Costos de producción		21.436.798	21.436.798	21.436.798
Depreciación		1.353.703	1.353.703	1.353.703
Costo de inversión	162.444.300			158.000.000

Con base en esta tabla se pasa a calcular el VPN, en base al flujo proyectado en la tabla 63 y manejando una TIO y un impuesto de renta de 1,88 y 34 % respectivamente.

Tabla 61. Flujo de caja libre proyectado (pesos colombianos).

	0	1	2	3
Ingresos, ventas		6.660.000	6.660.000	6.660.000
Costos de producción		-22.013.185	-22.013.185	-22.013.185
Depreciación		-1.559.381	-1.559.381	-1.559.381
UTILIDAD GRAVABLE		-16.912.566	-16.912.566	-16.912.566
Impuestos (34 %)		5.750.272	5.750.272	5.750.272
UTILIDAD NETA		-11.162.294	-11.162.294	-11.162.294
Depreciación		1.559.381	1.559.381	1.559.381
FLUJO OPERACIONAL		-9.602.913	-9.602.913	-9.602.913
Flujo de inversión				
Máquinas y equipos	-187.125.700			182.000.000
FLUJO DE CAJA LIBRE	-187.125.700	-9.602.913	-9.602.913	172.397.087

El VPN se calcula tomando los valores del flujo de caja libre de la tabla, reemplazando la TIO y la inversión inicial mediante la ecuación 7.

Ecuación 7. Valor presente neto VPN.

$$VPN = -I_0 + \frac{FC_1}{(1+i)^1} + \frac{FC_2}{(1+i)^2} + \dots + \frac{FC_n}{(1+i)^n}$$

La TIR se calcula por medio de la misma ecuación pero igualando el VPN 0, donde lo que se quiere saber es la tasa de interés que logre este objetivo (ver tabla 62).

Ecuación 8. Tasa interna de retorno TIR.

$$0 = -I_0 + \frac{FC_1}{(1+i)^1} + \frac{FC_2}{(1+i)^2} + \dots + \frac{FC_n}{(1+i)^n}$$

Tabla 62. Resumen de evaluación del proyecto.

Suma invertida	Ingresos netos de caja			VPN	TIR
	1 mes	2 mes	3 mes		
-187.125.700	-9.602.913	-9.602.913	172.397.087	-42.774.842	-6,10%

El valor presente calculado es de \$ -42.774.842 millones, es decir un VPN menor a cero lo cual indica que no es viable la realización del proyecto, pues generará pérdidas a los inversionistas, de igual forma la TIR es congruente con el VPN ya que da un valor de -6.10 %, porcentaje inferior a la TIO del 1,88 %.

Para la evaluación del segundo escenario donde se tiene en cuenta una financiación externa del 50% de la inversión, se tomó como referencia una tasa media de 22% efectiva anual basada en las tasas mínima y máxima que se tiene en un crédito de libre versión de la entidad Bancolombia¹⁵⁶, el análisis se desarrolla de la misma manera, donde se involucran los intereses y el abono a capital de esta financiación (ver tabla 63 y 64) mediante la siguiente tabla de flujos generados para el horizonte de evaluación planteado.

La tasa de interés mensual del crédito calculada por la ecuación 5 es de 1,3 % mensual.

Tabla 63. Tabla de amortización del crédito (pesos colombianos).

MES	Saldo	Amortización	Interés
0	93.562.850	-	-
1	93.562.850	31.187.617	1.216.317
2	62.375.233	31.187.617	810.878
3	31.187.617	31.187.617	405.439

Tabla 64. Flujo de caja libre proyectado con financiación (pesos colombianos).

Meses	0	1	2	3
Ingresos, ventas		6.660.000	6.660.000	6.660.000
Costos de producción		-22.013.185	-22.013.185	-22.013.185
Depreciación		-1.559.381	-1.559.381	-1.559.381
Intereses		-1.216.317	-810.878	-405.439
UTILIDAD GRAVABLE		-18.128.883	-17.723.444	-17.318.005
Impuestos (34 %)		6.163.820	6.025.971	5.888.122
UTILIDAD NETA		-11.965.063	-11.697.473	-11.429.883
Depreciación		1.559.381	1.559.381	1.559.381
FLUJO OPERACIONAL		-10.405.682	-10.138.092	-9.870.503
Flujo de inversión				
Máquinas y equipos	-187.125.700			182.000.000
FLUJO DE FINANCIACIÓN	93.562.850	-31.187.617	-31.187.617	-31.187.617
FLUJO FINANCIADO	-93.562.850	-41.593.299	-41.325.709	140.941.881

El VPN y la TIR se calculan a partir del flujo financiado y por medio de las ecuaciones 7 y 8, obteniendo como resultado el resumen de evaluación mostrado en la tabla 65.

Tabla 65. Resumen de evaluación del proyecto con financiación.

Suma invertida	Ingresos netos de caja			VPN	TIR
	1 mes	2 mes	3 mes		
93.562.850	-41.593.299	-41.325.709	140.941.881	-40.920.694	-9.46%

¹⁵⁶ Grupobancolombia. Productos y servicios. Creditos. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017<
www.grupobancolombia.com >

Por lo tanto el proyecto financiado un 50% aunque hace mayor el VPN (-40.920.694, este sigue siendo negativo, y la TIR (-9,46%) menor a la TIO, concluyendo que como en el escenario sin financiación como con financiación no es viable hacer el proyecto ya que se generan pérdidas en su ejecución.

6. CONCLUSIONES

- Empleando tres proporciones distintas entre la masa seca de hojas y el volumen de etanol al 96%, se concluye que la mejor relación es 1/10 respectivamente, debido a que su rendimiento fue el mayor, con un porcentaje de 23.78%, el cual, mediante análisis de varianza ($F_{\text{calculado}}=33.65$ vs. $F_{\text{tablas}}=5.14$), se rechaza la hipótesis nula, lo cual afirma que hay diferencia significativa en el rendimiento cuando hay variación de volumen de etanol, lo cual se reitera mediante la prueba de Tukey. Posteriormente, se aplicó el método de fraccionamiento por solventes de polaridad creciente, mediante el cual se obtuvo que la fracción de cloroformo fue la de mayor rendimiento, con un 45.91% del extracto total (teniendo en cuenta las pérdidas a medida que se hizo el procedimiento). No obstante, la fracción de acetona, con un rendimiento del 20,00%, presentó la mejor efectividad en la prueba de concentración mínima inhibitoria o "MIC test" en pozos, debido a que en una concentración de 15 mg/ml, inhibió el crecimiento bacteriano de las 4 cepas evaluadas. Estas características se le atribuyen a la presencia de metabolitos secundarios como Taninos y Cardiotónicos, los cuales se identificaron claramente en las pruebas de Gelatina-Sal, Cloruro férrico y Baljet, respectivamente.
- Aplicando la definición de bioprospección, las propiedades de *Drimys granadensis* son aprovechables en la formulación de un desinfectante; no obstante, debido a la alta toxicidad que se reporta en las pruebas con Artemia salina, por DUEÑAS, J.T., se define que el producto va dirigido hacia uso doméstico en superficies; de acuerdo a los estudios de mercado de Markets & Markets, este tipo de productos tiene una alta proyección comparada con otros sectores para los próximos 5 años. A partir de esto, se estableció que los aditivos funcionales que llevará Driminator son: EDTA (1%), propilenglicol (20%), lauril sulfato de sodio (1%) y regulador de pH (Trietanolamina), el cual, mediante el resultado de su diseño de experimentos, se decidió que tendrá 0.25% de este agente, para obtener un pH 4 del producto total. Por otro lado, para darle una mejor apariencia, el producto contiene también colorante verde lima (0,05%) y fragancia de canela (0,05%).
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba *in vitro* de discos Kirby-Bauer, el tamaño de los diámetros de los halos de inhibición del producto comercial 1 fueron superiores a los demás tratamientos; no obstante, el tratamiento 1 (pH 4) presentó un mayor halo de inhibición que los tratamientos 2 y 3, superando incluso el tratamiento 5 (producto comercial 2), el cual contiene como ingrediente activo un componente de origen natural al igual que Driminator; con respecto al análisis de varianza en ambas cepas ($F_{\text{calculado}}=3.68$ vs. $F_{\text{tabla}}=3.29$) se rechaza la hipótesis nula, es decir, hay diferencia significativa entre tratamientos. Por otro lado, la prueba de superficies *in vivo*, tuvo resultados cualitativos (ausencia o presencia de bacterias), debido a que,

la alta concentración de microorganismos impidió la formación de colonias visualmente notorias; estos resultados se pudieron ver afectados debido a que no se hizo una limpieza previa a la desinfección, y según la sección 1.4.3.5, la presencia de materiales extraños sobre la superficie puede afectar negativamente la efectividad de un desinfectante.

- Para la producción de 200 L mensuales de Driminator a escala piloto, es necesario contar con equipos como mezcladores, rotaevaporador, hornos de secado, triturador y filtros de materia prima y agua. Para cumplir con esta producción, se necesita recolectar 209.25 kg de hojas; también se requiere mensualmente de 829,5 kg de etanol al 96%, 68.86 kg de Hexano, 474.65 kg de cloroformo, 168 kg de acetona, 157 kg de agua, 2 kg de EDTA, 41.6 kg de PG, 0.1 kg de colorante, 0.105 kg de fragancia, 2.1 kg de Texapón y finalmente, 1.13 kg de alcalinizante.
- Teniendo como base la propuesta de diseño preliminar, se calculó el valor de VPN y TIR con y sin financiación; para el primer escenario, se obtuvo que el valor presente calculado es de \$ -42.774.842 millones, es decir un VPN menor a cero, lo cual indica que el proyecto no es viable en su realización, pues generará pérdidas a los inversionistas; de igual forma, el valor de TIR es congruente con el VPN, debido a que arroja un valor de -6,10%, inferior a la TIO de 1,88 %. Con respecto al segundo escenario, se tiene en cuenta una financiación externa del 50% de la inversión, se tomó como referencia una tasa media de 22% efectiva anual basada en las tasas mínima y máxima que se tiene en un crédito de libre versión de la entidad Bancolombia; los resultados de VPN y TIR son \$ -40.920.694 y -9.46 % respectivamente. Con base en esto, la producción de Driminator, sea o no financiada, no es rentable bajo las condiciones que se propone.

7. RECOMENDACIONES

- Con el fin de darle un mayor alcance al proyecto en ámbitos microbiológicos, se recomienda realizar las mismas pruebas de funcionalidad del extracto y del producto terminado en otras cepas bacterianas (como *Pseudomonas aureginosa*) y hongos.
- Investigar acerca de usos innovadores para los subproductos que se obtienen en el proceso, es decir, las fracciones de hexano, cloroformo y metanol.
- Se sugiere evaluar otros factores como la temperatura y el tiempo de contacto, los cuales intervienen en la funcionalidad de un desinfectante para el producto elaborado y por cuestiones de delimitación no se realizaron en la presente investigación. A su vez, se recomienda evaluar el efecto del pH como agente externo al producto en el crecimiento de las cepas bacterianas.
- Se recomienda desarrollar un producto similar, con la diferencia de que su materia prima sea el aceite esencial de la especie, con el fin de comparar su actividad antibacteriana y su rentabilidad con lo obtenido en el presente documento.
- Evaluar el producto Driminator en bacterias presentes en otro tipo de superficies, siguiendo el marco legal y los protocolos recomendados por instituciones técnicas en Colombia, como se describe en el marco teórico sección 1.7.1.
- Identificar por métodos cuantitativos las moléculas responsables de la actividad antibacteriana de la especie, como la metodología: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Agregar a la formulación un aditivo estabilizante y antioxidante que permita disminuir la variabilidad del pH en el producto, dándole un valor agregado y una mayor vida útil. Se sugiere realizar pruebas de estabilidad acelerada para determinar la cinética de degradación bajo condiciones de temperatura más alta.
- Evaluar otros métodos de extracción del extracto crudo para obtener un mayor rendimiento.
- Optimizar condiciones de operación que permitan aprovechar mejor las materias primas, aditivos y tiempos de operación.
- Debido al resultado del análisis financiero, se sugiere considerar la alternativa de maquilar el producto Driminator por terceros y analizar la rentabilidad en este escenario.
- Complementar las pruebas organolépticas de color mediante técnicas espectrofotométricas, aplicando la ley de Lambert Beer.

BIBLIOGRAFÍA

AccuWeather, Inc. Colombia Tiempo meteorológico. Pronóstico mensual. En línea. [Consultado el 27 de mayo de 2017] <

<http://www.accuweather.com/es/co/bogota/107487/january-weather/107487>>

ACTUALÍCESE. Publicado el 10 de enero de 2017. Tarifas del impuesto sobre la renta fueron modificadas por la reforma tributaria. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] < <http://actualicese.com/actualidad/2017/01/10/tarifas-del-impuesto-sobre-la-renta-fueron-modificadas-por-la-reforma-tributaria/> >

Alarcón, L.R y Olivas, E. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. Departamento de ciencias básicas de ICB. Academia de Microbiología y Parasitología. 2004, p. 17.

ALBA, N.E. y ARAUJO, F.L., Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de Fitoterapéuticos en laboratorios Pronabell LTDA. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 2008. p. 72.

Alcaldía de Boyacá. Esquema de ordenamiento territorial Pachavita – Boyacá (2003/2012). Físico – Biótico. Zonas de vida. p. 73.

Álvarez, Mauricio, et al., Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Programa de Inventarios de Biodiversidad. Grupo de Exploración y monitoreo ambiental (GEMA). 2004 p. 78, 79.

Anderson, F. y Martínez, P.N., Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Universidad del Quindío. 2013, p. 101 – 102.

ANGULO, M.A., Presentación “Infecciones en cirugía”. Septiembre 2011. En línea. [Consultado: 16 de abril de 2017] <<https://es.slideshare.net/chentu/infecciones-en-cirurgia>>

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC) International, Citado por Microchem Laboratory. Use Dilution Test (AOAC 955.14; 955.15; 964.02). En línea. [Consultado: 24 de Abril de 2017] <<http://microchemlab.com/test/aoac-use-dilution-test-aoac-95514-95515-96402>>

ASTM E1153-14, Standard Test Method for Efficacy of Sanitizers Recommended for Inanimate, Hard, Nonporous Non-Food Contact Surfaces, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014. En línea. [Consultado el 27 de abril de 2017] < <https://www.astm.org/Standards/E1153.htm>>

Bilbao, M.R., Análisis Fitoquímico preliminar. Química de Productos Naturales. Universidad del Quindío. Facultad de ciencias básicas y tecnológicas. Programa de Química de Productos Vegetales. 1997, p. 173.

Cammack, R, et al., Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. 2 Edición. 2008.

CARRIZOSA POSADA, Santiago. Bioprospección y El Acceso a Los Recursos Genéticos: Una Guía Práctica. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2000.

CASTELLANOS, Salvador Acosta y VILELA, Alejandra E. Anatomía foliar y morfología del polen de *Drimys granadensis* var. mexicana (winteraceae: magnoliales). En: Polibotánica. no. 8, p. 1-12

Carvajal, L., et. al., Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesiana* Krukoff). Revisa Colombia Forestal Vol. 12. 2009. p. 165.

Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL). 2016. En línea. [Consultado: 29 de abril de 2017] <<https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>>

Cervantes-García, E, et al. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio Vol. 61, n 1. 2014 p. 28.

CHIVA, Ricardo y CAMISÓN, Cesar. Aprendizaje organizativo y sistemas complejos con capacidad de adaptación: implicaciones en la gestión del diseño de producto. 2002. Universitat Jaume p.184.

CICCIO, José F. Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). vol. 1, no. 1, p. 29.

COOPER, MS., 2000. Citado por SANDLE T. Pharmaceutical Microbiology. Ch. 15 Cleaning and disinfection. 2016. p. 189.

CORDOBA, Marcial. Formulación y evaluación de proyectos. Ecoe ediciones. 2da edición. Bogota. 2011.

DEL VALLE A, J. 1972. Introducción a la Dendrología de Colombia. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia, p. 351.

DIAN. Actualizado 24 de enero de 2016. Generalidades sobre el impuesto sobre la renta y complementarios, ventas, timbre. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] < <http://www.dian.gov.co/DIAN/12SobreD.nsf/pages/Impuestosinternos#2> >

Diccionario de términos ambientales [en línea] < <http://www.ambientum.com/diccionario/listado/diccionario.asp?letra=f#> > [citado el 2/10/2016]

DORWARD, D. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). 2014. Public Health Image Library. En línea. [Consultado: 15 de Abril de 2017] < <https://phil.cdc.gov/Phil/details.asp> >

DUARTE TORRES, Oscar y VELHO, Léa. Capacidades científicas y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección. En: Revista Iberoamericana De Ciencia Tecnología y Sociedad. vol. 4, no. 12, p. 55-68.

DUEÑAS, J.T., Desarrollo de un producto bioactivo partiendo de extractos vegetales de especies alto andinas. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. 2017. p. 36.

Enciclopedia Britannica. Winteraceae Plant Family. [En línea] <<https://global.britannica.com/plant/Winteraceae>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

FAO- División de Producción y Sanidad Animal. EMPRES: Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales.

Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 30. Vol. 1. <1072> Desinfectantes y antisépticos. 2007. p. 558.

FLAMENCO, José W. y GUEVARA, Glenda I. Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana. vol. 1, no. 1, p. 26.

FUNG, C.P., *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. Emerging Infectious Diseases. Vol 19, No. 8. 2012. p. 1322.

Gerencie. Publicado el 14 de marzo de 2017. Depreciación de activos. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] < <https://www.gerencie.com/depreciacion.html> >

Gómez Payán, M., *et al.* Uso de la metodología del diseño por mezclas en el sector agrícola. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. CULCyT, 2015, p. 202.

GAVIRIA, M., *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Drimys granadensis* L.F leaves from Colombia. vol. 8, no. 1, p. 533.

HAMMEL, Barry, *Drimys granadensis* L. f., 2009, <http://www.tropicos.org/ImageFullView.aspx?imageid=21424&projectid=3> [Consulta: Sábado, 01 de Octubre de 2016]

Haney, J. CDC/ National Escherichia, Shigella, Vibrio Reference Unit at CDC. En línea. [Consultado: 05 de Enero de 2017] <<http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20electron%20microscopy.html>>

HAVSTEEN, B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics. 2002. Vol. 96. p. 82.

HERNANDEZ, 2001, citado por ROJAS, Miguel. Evaluación de Proyectos para Ingenieros. Bogotá: Ecoe ediciones, 2015. Sección 4.

HUDZICKI, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. 2009. En línea. [Consultado el 27 de Abril de 2017] <<http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189>>

INSTITUTO COLOMBIANO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA COLCIENCIAS. [En línea]: Plataforma ScienTI. <<http://scienti.colciencias.gov.co:8083/ciencia-war/BusquedaGrupoXArea.do>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN ICONTEC. Documentación, presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. p. 41.

_____ Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. p. 27.

_____ Requisitos para el rotulado o etiquetado de productos de aseo y limpieza. NTC 5465. p. 5.

_____ Referencias bibliográficas. Contenido, forma y estructura. NTC 5613. p. 38.

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO, NTP 429: Desinfectantes: Características y Usos Más Corrientes. España, 1999. p. 1-4.

_____ Reglamento CLP. Clasificación de mezclas: peligros para la salud. NTP 974 de 2013. España. p. 3.

INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS, INVIMA. Normatividad Institucional. Documentos INVIMA. Leyes. En línea.

[Consultado en: 02 de Junio de 2017]. <<https://www.invima.gov.co/leyes-en-normatividad-institucional.html>>

John Hutchinson (1973). The Families of Flowering Plants. Oxford at the Clarendon Press [En Línea] <<https://www.abebooks.co.uk/servlet/BookDetailsPL?bi=19127546811&searchurl=tn%3Dthe%2Bfamilies%2Bof%2Bflowering%2Bplants%26sortby%3D17%26an%3Dhutchinson%2Bj>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

Lizcano-R, A y Vergara-G, J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Microbiología Industrial. Bogotá, 2008

Markets and Markets. Agricultural Disinfectants Market worth 2.11 Billion USD by 2021. En línea. [Consultado: 20 de Abril de 2017]. Agosto 2016. <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/agricultural-disinfectant-market-89992801.html>>

_____ Surface Disinfectant Market by Product (Hypochlorite, Quaternary Ammonium Compounds, Hydrogen Peroxide, Chlorhexidine Gluconate, Peracetic Acid, Phenol, Alcohol), Formulation (Sprays, Liquids, Wipes) - Global Forecast to 2020. En línea. [Consultado: 20 de Abril de 2017]. Octubre 2015. <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/surface-disinfectant-market-231286043.html>>

MARTIN, J.J., *et. al.*, TLC profiles and antibacterial activity of *Glinus oppositifolius* L. Aug. DC. (Molluginaceae) leaf and stem extracts against bacterial pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2015. Vol. 5. No. 7. p. 571.

Melgarejo, L. M., Sánchez, J., Chaparro, A., Newmark, F., Santos-Acevedo, M., Burbano, C. y Reyes, C. 2002. Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia. Serie de Documentos Generales INVEMAR No.10. Cargraphics. Bogotá, 334p.

MICHELANGELI, Fabian A., Leaf abaxial surface, http://www.plantsystematics.org/imgs/fm18/r/Winteraceae_Drimys_granadensis%20%20_28894.html [Consulta: Sábado, 01 de Octubre de 2016]

MICROCHEM Laboratory. Minimum Inhibitory Concentration Test (MIC). En línea. [Consultado: 24 de abril de 2017]. <<http://microchemlab.com/test/minimum-inhibitory-concentration-test-mic-0>>

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución 2715 de 2014. En línea. [Consultado en: 02 de Junio de 2017] <<https://www.invima.gov.co/images/pdf/%C3%81cidos-%C3%A1lcalis/Resoluci%C3%B3n%202715%20de%202014%20sustancias%20objeto%20de%20registro%20de%20control.pdf>>

Missouri Botanical Garden. Angiosperm Phylogeny Website. [En Línea]: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/canellalesweb.htm#Winteraceae>> [Consulta: 26 de Enero de 2017]

Montgomery, D.C., Diseño y Análisis de Experimentos. México, D.F: Limusa wiley, 2004. p. 102

NORMAS LEGALES. Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y bebidas. Perú. 2007. p. 4.

Organización para la Educación y Protección Ambiental - Canelo de páramo - *Drimys granadensis*. http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=460&Itemid=30 [Consulta: Miércoles, 31 de agosto de 2016].

RAMÍREZ, J., et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. En: Revista Fuente Año. vol. 2, no. 7

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA (2016) Diccionario de la lengua española [Consulta: Lunes, 03 de Octubre de 2016]

RESTREPO, M., et. al., Sustitución de tartazina por betacaroteno en la elaboración de bebidas no alcohólicas. Revista Lasallista de Investigación – Vol. 3, No. 2. 2007. p. 11.

Revista Semana: ¿Cuánto ganan los recién graduados? [en línea](3 de abril de 2017) disponible en < <http://www.semana.com/educacion/articulo/salario-de-un-recien-egresado/517340>>

RICHARD, Harvey A. Microbiology. 2 ed. New Jersey, United States: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 438

Rizi, K, et al., Development of a rapid reliable and quantitative method – “SPOTi” for testing antifungal efficacy. Journal of Microbiological Methods. 2015, p 37.

RAMOS, Yusibeska y ALONSO, Guillermina, Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 31. P. 130 – 137.

ROCA, W., MROGINSKI, L. Cultivo de Tejidos en Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia, 1991.

Rodriguez-Angeles, M. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. Vol. 44 n 5. 2002 p 464

RODRIGUEZ, Evelyn. *et al.* BACTERIOLOGIA GENERAL Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 2005. p 63.

Royal Botanic Gardens KEW. Vascular Plant Families and Genera. List of genera in family Winteraceae. [En línea]: < <http://data.kew.org/cgi-bin/vpfg1992/genlist.pl?WINTERACEAE> > [Consulta: 26 de Enero de 2017]

Sanabria-G, A, et al., Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Revista Colciencias Química Farmacéutica No. 26, 1997, p 15.

SÁNCHEZ, Leonardo., SAENZ, Eliana. Antisépticos y desinfectantes. Dermatología peruana. 2005. Vol: 15 N°2.

Secretaría Distrital de Salud. En línea. [Consultado en: 02 de Junio de 2017]. <http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/decreto_1545_1998.pdf>

Spangenberg, B. Quantitative thin-layer chromatography, chapter 4: The mobile phase in adsorption and partition chromatography. p. 81, 82. 2011.

STANDLEY, P.C. 1937. Flora of Costa Rica. Citado por CICCIO, José F. Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). vol. 1, no. 1, p. 29

Sittenfeld, A., Gámez, R. 1993. Biodiversity prospecting by INBio. En Reid, W. V., Laird, S. A., Meyer, C. A., Gámez, R., Sittenfeld, A., Janzen, D. H. (Eds). Biodiversity prospecting: using genetic resources for sustainable development. Washington. World Resources Institute. P 69-98

Superintendencia Financiera de Colombia. Tasa libre de Riesgo. En línea [Consultado: 27 de mayo de 2017] <<https://www.superfinanciera.gov.co/jsp/loader.jsf?!Servicio=Glosario&ITipo=user&Funcion=main&letra=T>>

The Plant List. A working list of all plants species. *Drimys granadensis*. En línea. [Consultado: 05 de Octubre de 2016] <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=drimys+granadensis>

Tropicos.org., Missouri Botanical Garden, <http://www.tropicos.org/Name/34200005>
[Consulta: Lunes, 03 de Octubre de 2016]

Universidad de la República, Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2da Edición. 2006 p 266.

UNLU, M., *et. al.*, Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food and Chemical Toxicology. Vol. 48. No. 11. 2010. p. 3274 – 3280.

U.S. Centers for Disease Control and Prevention - Medical Illustrator. 2013. En línea. [Consultado: 29 de abril de 2017] <<https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>>

US PATENT. Antimicrobial composition formulated with essential oils. Inventor: DEATH, S., DEATH, J. Estados Unidos, Patente de investigación. WO 2001084936 A1. 15 de Noviembre de 2001.

US PATENT. Disinfectant Formulation. Inventor: DAIGLE, F., *et. al.*, Estados Unidos, Patente de investigación. US 9,609,864 B2. 04 de Abril 2017.

US Pharmacopeial Convention. USP 31 <1072> Disinfectants and antiseptics. Disinfectant Challenge Testing. En línea. [Consultado: 24 de Abril de 2017] <http://www.uspbpep.com/usp31/v31261/usp31nf26s1_c1072.asp>

Wagner, G., *et. al.* Product design and Engineering. Formulation of Gel and Pastes. Vol 1. Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co. 2013. p. 1.

Walton, H.F. y Reyes, J., Análisis Químico e instrumental moderno. Barcelona, España. 2005, p. 323.

ANEXOS

ANEXO A. Equipos

NOMBRE	Rotaevaporador	
MARCA	Heidolph	
MODELO	Laborota 4000 efficient	
NOMBRE	Cabina de extracción	
MARCA	C4	
MODELO	CEX120	
NOMBRE	Balanza analítica	
MARCA	OHAUS	
MODELO	Pioneer	
NOMBRE	Horno	
MARCA	memmert	
MODELO		
NOMBRE	Desecador	
MARCA	Vakuumfest	
MODELO		

NOMBRE	Incubadora	
MARCA	E&Q	
MODELO		
NOMBRE	Cabina de Flujo Laminar	
MARCA	ISOCIDE	
MODELO		
NOMBRE	Autoclave	
MARCA	ALL AMERICAN	
MODELO	50X	
NOMBRE	pH-metro	
MARCA	Spectrum	
MODELO	SoilStick	
NOMBRE	Lámpara UV 365 nm	
MARCA	Merck KGaA	
MODELO		
NOMBRE	Micropipetas	
MARCA	Accumax	
MODELO	Pro	

NOMBRE	Espectrofotómetro	
MARCA	Thermo	
MODELO	GENESYS 10uv	
NOMBRE	Estufa eléctrica	
MARCA	PREMIUM	
MODELO		
NOMBRE	Agitador magnético	
MARCA	Nahita-Blue	
MODELO	692	
NOMBRE	Baño de agua	
MARCA	memmert	
MODELO		
NOMBRE	Bomba de vacío	
MARCA	Rocker	
MODELO	600	
NOMBRE	Vortex	
MARCA	VELP SCIENTIFICAr	
MODELO	ZX3	

ANEXO B. Información de recolecta

OBJETO DE COLECCIÓN

Código de barras	JBB13555
Número de catálogo	13905
Preparación	Ejemplar preservado
Determinado por	Suarez, C.I.
Fecha de determinación	2016

EVENTO DE COLECTA

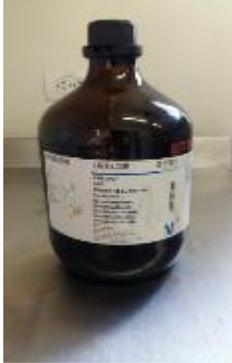
Pais	Colombia
Departamento	Distrito Capital
Municipio	Bogotá
Localidad	Predio Santa Bárbara - Río Arzobispo
Coordenadas verbatim	4° 36' 42.3" N - 74° 02' 17.0" W
Latitud decimal	4.6117500
Longitud decimal	-74.0380556
Altitud en metros	3245
Fecha de colecta	2016-06-30

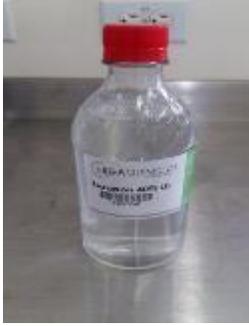
REGISTRO DE OCURRENCIA



Tomado de: Herbario JBB en línea - Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Disponible en: <http://coleccion.es.jbb.gov.co/herbario>. Consultado en 2017-05-28

ANEXO C. Reactivos y materias primas

Hexano	Metanol	Cloroformo	Acetona
			
Dimetilsulfóxido	Acetato de etilo	Agar Mueller-Hinton	Agar Nutritivo
			
Propilenglicol	Colorante verde	EDTA	Fragancia de canela
			

Trietanolamina	LSS
	

ANEXO D. Fichas técnicas de reactivos

 ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ D.C. AMBIENTE Jardín Botánico José Celestino Mutis	FICHA DE SEGURIDAD DE REACTIVOS		
	ACETATO DE ETILO N° de CAS: 141-78-6		 Inflamable
DESCRIPCIÓN			
GRUPO QUÍMICO	Compuesto Orgánico	CONCENTRACIÓN	99,5 al 99%
FORMULA QUÍMICA	CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	PESO MOLECULAR	88,1 g/mol
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS			
ESTADO FÍSICO	Líquido	TEMPERATURA DE FUSIÓN	menos 83°C
APARIENCIA	Incoloro y Volátil	DENSIDAD	No reportado
OLOR	Olor característico	PRESIÓN DE VAPOR	76 mmHg a 20°C
PH	No disponible	DENSIDAD DE VAPOR	3
TEMPERATURA DE EBULLICIÓN	77°C	SOLUBILIDAD	soluble en: agua, acetona, Eteral
IDENTIFICACIÓN DE RIESGO			
RIESGO PRINCIPAL	Inflamable		
MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS			
EN CASO DE:			
INHALACIÓN	Utilizar mascarar con provisión de aire o equipo de respiración autónomos en situaciones excesivas de concentración de vapores		
CONTACTO CON LA PIEL	Puede causar irritación a la piel. Lavar inmediatamente con abundante agua y jabón		
CONTACTO CON LOS OJOS	El polvo puede causar irritación. Mantener los ojos abiertos, enjuagar durante 15 minutos con abundante agua		
INGESTIÓN	Muy peligroso en caso de ingestión. Consultar al medico de inmediato		
EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL			
ROPA DE TRABAJO	Debe utilizarse traje de seguridad completo.		
PROTECCIÓN RESPIRATORIA	Respirador aprobado por NIOSH adecuado para los componentes del producto		
GUANTES DE PROTECCIÓN	Debe utilizarse guantes de seguridad.		
LENTE PROTECTORES	Se recomienda utilizar anteojos de seguridad con protectores laterales y escudo facial		
CALZADO DE SEGURIDAD	Uso de calzado cerrado.		
ALMACENAMIENTO			
ÁREA DE ALMACENAMIENTO	Mantener lejos de sustancias incompatibles en un área fresca y bien ventilada		
PRECAUCIONES ESPECIALES	El producto puede ser combustible a temperaturas altas, por lo que se aconseja mantenerlo lejos del calor en cualquier forma.		

Referencia:

		FICHA DE SEGURIDAD DE REACTIVOS	
		ACETONA N° de CAS: 67-64-1	
		 Inflamable	
DESCRIPCIÓN			
GRUPO QUÍMICO	Solvente Orgánico	CONCENTRACIÓN	No determinado
FORMULA QUÍMICA	C ₃ H ₈ O	PESO MOLECULAR	58,08
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS			
ESTADO FÍSICO	Líquido	TEMPERATURA DE FUSIÓN	540°C
APARIENCIA	Incoloro	DENSIDAD A 20°	790 - 792 Kg/m ³
OLOR	Característico	PRESIÓN DE VAPOR	24,7 kpa a 20 ^o
PH	Indeterminado	DENSIDAD DE VAPOR	No disponible
TEMPERATURA DE EBULLICIÓN	55,8 - 56,6 °C	SOLUBILIDAD	Agua a 20°C
IDENTIFICACIÓN DE RIESGO			
RIESGO PRINCIPAL	Inflamable		
MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS			
EN CASO DE:			
INHALACIÓN	Nocivo por inhalación. Los vapores son irritantes a las membranas y mucosas del tracto respiratorio superior. Se recomienda proveer oxígeno y consultar al médico.		
CONTACTO CON LA PIEL	Irrita levemente la piel, por lo tanto se recomienda lavar con agua y jabón, remover la ropa contaminada y buscar atención médica.		
CONTACTO CON LOS OJOS	El líquido o altas concentraciones de vapor, irrita severamente los ojos. Se recomienda lavar inmediatamente con abundante agua manteniendo los párpados abiertos por lo menos 15 minutos.		
INGESTIÓN	Causa irritación del tracto digestivo con dolor abdominal, náuseas y vómito. Puede afectar la conducta y el sistema urinario.		
EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL			
ROPA DE TRABAJO	Se recomienda traje de seguridad completo.		
PROTECCIÓN RESPIRATORIA	Se recomienda utilizar un respirador o trompa respiratoria con filtro para vapores orgánicos.		
GUANTES DE PROTECCIÓN	Se deben utilizar guantes de neopreno de puño largo.		
LENTE PROTECTORES	Se recomienda anteojos de protección química.		
CALZADO DE SEGURIDAD	Uso de calzado cerrado.		
ALMACENAMIENTO			
ÁREA DE ALMACENAMIENTO	Manténgase lejos de la luz directa del sol y de otras fuentes de calor o ignición. No		
PRECAUCIONES ESPECIALES	Los contenedores para el almacenamiento deben ser metálicos.		

Referencia: Ficha datos de seguridad CARLO ERBA (Acetona)

		FICHA DE SEGURIDAD DE REACTIVOS	
ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ D.C. <small>AMBIENTE</small> <small>Jardín Botánico José Celestino Mutis</small>		CLOROFORMO Nº de CAS: 67-66-3	
		 <small>Tóxica</small>	
DESCRIPCIÓN			
GRUPO QUÍMICO	Compuesto Orgánico	CONCENTRACIÓN	97.20%
FORMULA QUÍMICA	CHCl ₃	PESO MOLECULAR	119,35g
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS			
ESTADO FÍSICO	Líquido	TEMPERATURA DE FUSIÓN	menos 63,05°C
APARIENCIA	Incoloro	DENSIDAD	No reportado
OLOR	Dulce característico	PRESIÓN DE VAPOR	0,825 a -60°C
PH	No reportado	DENSIDAD DE VAPOR	4,12
TEMPERATURA DE EBULLICION	61,26°C	SOLUBILIDAD	En agua
IDENTIFICACIÓN DE RIESGO			
RIESGO PRINCIPAL	Tóxico		
MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS			
EN CASO DE:			
INHALACIÓN	Los signos de intoxicación aguda con vapores de cloroformo, en general, son: depresión respiratoria, neumonitis química, edema pulmonar, acidosis metabólica, depresión del sistema nervioso central, dolor de cabeza, fatiga, adormecimiento y pérdida del equilibrio. Se ha informado, también de arritmias y paro cardíacos.		
CONTACTO CON LA PIEL	No hay una absorción significativa a través de la piel. Quitar la ropa contaminada, y lavar la piel con agua corriente en gran cantidad.		
CONTACTO CON LOS OJOS	Ocasiona conjuntivitis, e, incluso, quemaduras dolorosas, ya sea en forma de vapor o líquido. Los ojos pueden lavarse también disolución salina neutra asegurándose de abrir bien los párpados.		
INGESTIÓN	Provoca náusea, vómito, salivación, anorexia, irritación gastrointestinal y daño a hígado y riñones. Mantener a la víctima en reposo y caliente. No inducir el vómito. Puede suministrarse carbón activado, si la víctima está consciente. Usar de 15 a 30 g, para niños, o de 50 a 100 g, para adultos con 1/2 a 1 taza de agua. Provocar excreción con un cartártico salino o sorbitol para víctimas conscientes, los niños requieren de 15 a 30 g y los adultos de 50 a 100 g.		
EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL			
ROPA DE TRABAJO	En general, uso de indumentaria de trabajo.		
PROTECCIÓN RESPIRATORIA	Aplicar protección respiratoria.		
GUANTES DE PROTECCIÓN	Utilización de guantes de características impermeables.		
LENTE PROTECTORES	Uso de lentes de seguridad.		
CALZADO DE SEGURIDAD	En general, uso de calzado cerrado, no absorbente.		

ALMACENAMIENTO	
ÁREA DE ALMACENAMIENTO <u>LISTA</u>	Los recipientes que contienen este producto deben ser almacenados en lugares alejados de la luz directa del sol, ya que se descompone lentamente a productos como el fosgeno.
PRECAUCIONES ESPECIALES	A pesar de ser un producto no inflamable, los contenedores donde se encuentra almacenado el cloroformo explotan con calor. Además, al calentarse, libera fosgeno, cloruro de hidrógeno, cloro y óxidos de carbono y cloro, los cuales son corrosivos y muy tóxicos. En general, tener precaución con los reactivos mencionados en las Propiedades Químicas.

Referencia:

 ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ D.C. AMBIENTE Jardín Botánico José Celestino Mutis	FICHA DE SEGURIDAD DE REACTIVOS		
	ALCOHOL ETILICO Nº de CAS: 64-17-5		 Inflamable
DESCRIPCIÓN			
GRUPO QUIMICO	Compuesto Orgánico	CONCENTRACIÓN	95,00%
FORMULA QUÍMICA	CH ₃ CH ₂ OH	PEJO MOLECULAR	46
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS			
ESTADO FÍSICO	Líquido	TEMPERATURA DE FUSIÓN	Menos 114
APARIENCIA	Incoloro volátil	DENSIDAD	No reportado
OLOR	Olor característico	PRESIÓN DE VAPOR	4.39 mmHg a 20°C
PH	6-8	DENSIDAD DE VAPOR	44.0 / 20°C
TEMPERATURA DE EBULLICIÓN	78 - 79	SOLUBILIDAD	Soluble en agua
IDENTIFICACIÓN DE RIESGO			
RIESGO PRINCIPAL	Inflamable		
MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS			
EN CASO DE:			
INHALACIÓN	Altas concentraciones del vapor pueden causar somnolencia, tos, irritación de los ojos y el tracto respiratorio, dolor de cabeza y síntomas similares a la ingestión. Trasladar al aire fresco. Si no respira administrar respiración artificial. Si respira con dificultad suministrar oxígeno. Mantener la víctima abrigada y en reposo. Buscar atención médica inmediatamente.		
CONTACTO CON LA PIEL	Resequedad. Lavar la piel con abundante agua. Retirar la ropa contaminada y lávela con abundante agua y jabón.		
CONTACTO CON LOS OJOS	Irritación, enrojecimiento, dolor, sensación de quemadura. Lavar con abundante agua, mínimo durante 15 minutos. Levantar y separar los párpados para asegurar la remoción del químico. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica.		
INGESTIÓN	Sensación de quemadura. Actúa al principio como estimulante seguido de depresión, dolor de cabeza, visión borrosa, somnolencia e inconsciencia. Grandes cantidades afectan el aparato gastrointestinal. Si es desnaturalizado con metanol, puede causar ceguera. Lavar la boca con agua. Inducir al vómito. No administrar eméticos, carbón animal ni leche. Buscar atención médica inmediatamente (puede tratarse de alcohol desnaturalizado).		
EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL			

ROPA DE TRABAJO	Utilizar ropas de protección adecuada para evitar la exposición de la piel.
PROTECCIÓN RESPIRATORIA	Mascarillas con cartuchos para vapores orgánicos.
GUANTES DE PROTECCIÓN	Utilizar Guantes de Neopreno.
LENTES PROTECTORES	Lentes de seguridad
CALZADO DE SEGURIDAD	Sin medidas especiales necesarias.
ALMACENAMIENTO	
ÁREA DE ALMACENAMIENTO	Lugares ventilados, frescos y secos. Lejos de fuentes de calor e ignición. Separado de materiales incompatibles. Rotular los recipientes adecuadamente. Depositar en contenedores herméticamente cerrados. Los equipos eléctricos y de iluminación deben ser a prueba de explosión.
PRECAUCIONES ESPECIALES	Usar siempre protección personal así sea corta la exposición o la actividad que realice con el producto. Mantener estrictas normas de higiene, no fumar, ni comer en el sitio de trabajo. Usar las menores cantidades posibles. Conocer en donde está el equipo para la atención de emergencias. Leer las instrucciones de la etiqueta antes de usar el producto. Rotular los recipientes adecuadamente.

Referencia:

ANEXO E. Cotizaciones de equipos

29 de Mayo de 2017.



COTIZACIÓN

CLIENTE: UNIVERSIDAD AMERICA
 At'n.: Ing. Julián Vanegas.
 E-mail: julian.vanegas1207@gmail.com
 Tel.: (31) 153-0695.
 Cot. No.: 0236.



MAQUINARIA Y PROCESOS PULVEX S.A. DE C.V.
 Plutarco Elias Calles #290
 Col. Tlazintla C.P. 08710 México D.F.
 Tel. +52 (55) 5657-9133
 www.pulvex.mx
 e-mail: ventas@pulvex.mx

Agradecemos su solicitud y a continuación le cotizamos:

AGIT. PORTATIL C/TURB. INTERCAMBIABLES Y TQ INOX 304 PULVEX MOD AD-50

MATERIAL	Todas las partes en contacto con el producto son de acero inoxidable tipo 304.
AGITADOR	Vertical rápido / lento con velocidad variable de 300 - 2000 RPM (dependiendo del diámetro y tipo de turbina a utilizar), con turbinas (propelas) intercambiables dependiendo la aplicación a utilizar. El precio base del equipo incluye una flecha de agitación y una turbina de cualquier tipo (excepto emulsor rotor/estator).
RECIPIENTE	Tq vert cilíndrico de pared sencilla, de 50 lts. útiles, c/fondo cónico y válvula tipo mariposa para descarga del producto, totalmente desmontable para su limpieza total, ubicada al centro del fondo cónico.
MOTOR	Motor eléctrico directo, con brida C, 4 polos, 220 V, 60 Hz, trifásico, de protección IP54, acoplado a un variador de frecuencia electrónico de entrada monofásica 127 V y salida trifásica a 220 V.
APOYOS	Para el tanque, 4 patas tubulares con placas de refuerzo y placas de anclaje.
TAPA	Tapa plana con media luna fija y media luna abatible, por medio de bisagras y manija de levantamiento, con ceja de ajuste y puente transversal para agitador.
ACABADOS	Para las partes en contacto con el producto, acabado sanitario pulido grano 180 brillante.
SOPORTES	Soporte tipo puente transversal, fabricado en lámina de acero inoxidable tipo 304, para colocarse sobre la tapa del tanque o recipiente, con 2 manijas de levantamiento para su fácil manejo.
DIMENSIONES GENERALES	Este agitador ha sido calculado y diseñado para trabajar con productos / procesos de viscosidad máx 2,000 cps, densidad máx 1.2 g/ml, concentración de sólidos solubles < 20%, temperatura ambiente, presión atmosférica y SIN vacío...
DESCARGA	Invariablemente, es total y exclusiva responsabilidad del cliente, el conocer las características reológicas y condiciones de servicio de sus productos / procesos e informarnos inmediatamente si son superiores a las aquí mencionadas, en el punto anterior, para re calcular el agitador.

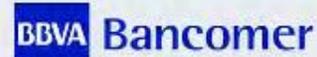
J. Luis Cárdenas Escareño.
 Ventas División Tanques y Agitadores.
 E-mail: joseluis@pulvex.mx

Liderazgo en Agitadores, Mezcladoras, Molinos y Tanques



TERMINOS COMERCIALES:

PRECIO:	<ul style="list-style-type: none">- AGITADOR PORTATIL EN INOX 304: \$2,050.00 USD + IVA (Dos mil cincuenta dólares americanos 00/100 USCY). <p>OPCION:</p> <ul style="list-style-type: none">- Turbina de emulsión rotor/estator en inox 304: \$1,070.00 USD + IVA.- Flecha de agitación en inox 304: \$245.00 USD + IVA.- Turbina de cualquier tipo en inox 304: \$215.00 USD + IVA.- Turbina Planetaria o Palas Periféricas en inox 304: \$345.00 USD + IVA.
TIEMPO DE ENTREGA:	<ul style="list-style-type: none">• 3 a 5 semanas (5 días hábiles) L.A.B en nuestra planta en la Ciudad de México.• A contar del siguiente día hábil en que se reciba su orden de compra y su anticipo correspondiente.
CONDICIONES DE PAGO:	<ul style="list-style-type: none">• 50 % de anticipo más 16% de IVA con su orden de compra.• 50 % más 16% de IVA restante al aviso de que el equipo se encuentra listo para su entrega.
GARANTÍAS:	Por DOCE (12) meses a contar de la fecha de entrega. Esta garantía cubre reposición sin cargo de la(s) pieza(s) con posible defecto, No cubre desgaste o daños causados por uso inadecuado, ni cuando se empleen productos abrasivos no especificados, la(s) piezas eléctricas y el motor cuentan con garantía por parte del fabricante. La garantía es efectiva en nuestros talleres (costo de traslado con cuenta y riesgo del cliente).
DOCUMENTACIÓN INCLUIDA	<ul style="list-style-type: none">• Póliza de Garantía, Certificado de Calidad.• Manual de instalación eléctrica.• Instructivos de operación y mantenimiento.• Planos 3D del equipo en AutoCAD.
EXCLUSIONES:	<ul style="list-style-type: none">• No incluye flete ni transportación ni gastos aduanales. Este corre a cargo y riesgo del cliente.• Equipos periféricos.• Arrancadores, guarda motores o tableros de control.• Cualquier otro aspecto no reflejado expresamente por escrito o incluido en esta cotización.
DATOS BANCARIOS	MAQUINARIA Y PROCESOS PULVEX S.A. DE C.V. Suc. 0182 Granjas México Cta. 0197967950 Clabe: 012180001979679505



J. Luis Cárdenas Escareño.
Ventas División Tanques y Agitadores.
E-mail: joseluis@pulvex.mx

Liderazgo en Agitadores, Mezcladoras, Molinos y Tanques

ANEXO F. Preparación de reactivos

Vainillina en ácido sulfúrico.

Diluir 100 mg de vainillina en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y 9ml de etanol o dietileter.

Vainillina-ácido fosfórico.

Diluir 100 mg de vainillina en 4ml de etanol y 5ml de ácido fosfórico concentrado.

Revelador Cloruro férrico:

Disolver 1 gramo de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 5 ml de agua diluida en 100 ml de etanol.

Reactivo Liberman-Bouchard:

Solución etanólica de anhídrido acético en presencia de ácido sulfúrico.

Gelatina-Sal:

Mezclar 10 g de gnetina hidrolizada y 100 g de cloruro de sodio por litro.

Reactivo Dragendorff:

Disolver 8 g de subnitrato de bismuto en 20 ml de HNO_3 concentrado y añadir lentamente esta solución a una solución concentrada de 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Enfriar y decantar para separar los cristales de nitrato de potasio y diluir con agua a 100ml

Reactivo Baljet

Mezclar dos partes iguales de Soluciones A y B.

Solución A: 1 gramo de ácido pícrico se afora con 100 ml de etanol.

Solución B: 10 gramos de hidróxido de sodio se afora a 100 ml con agua.

ANEXO G. Balances de materia PFD

COMPONENTE	1	2	3	4	5	6	7	8
Hojas (sin extracto)	38,29%	100,00%	76,22%	76,22%	0,00%	8,57%	90,62%	0,00%
Extracto	11,95%	0,00%	23,78%	23,78%	0,00%	2,67%	0,00%	2,95%
Etanol	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	88,75%	9,38%	97,05%
Hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Perdidas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Agua	49,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
EDTA	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PG	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colorante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fragancia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Texapon	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Alcalinizante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

COMPONENTE	9	10	11	12	13	14	15	16
Hojas (sin extracto)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Extracto	0,00%	36,05%	0,00%	98,26%	26,51%	0,00%	0,00%	0,00%
Etanol	100,00%	63,95%	100,00%	1,74%	0,47%	0,62%	0,00%	0,00%
Hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	73,02%	95,01%	100,00%	100,00%
Fracción hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,37%	0,00%	0,00%
Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Perdidas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Agua	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
EDTA	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PG	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colorante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fragancia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Texapon	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Alcalinizante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

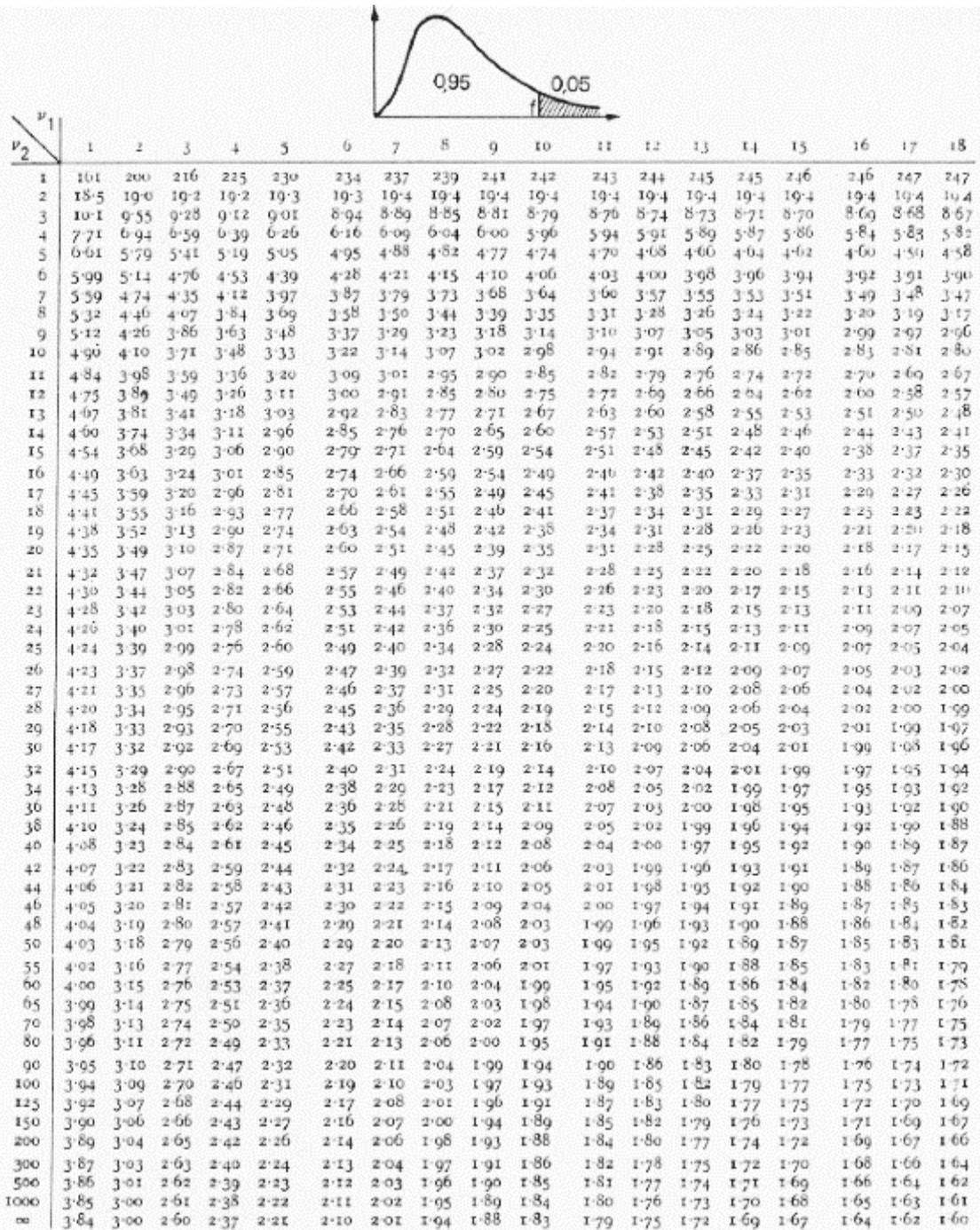
COMPONENTE	17	18	19	20	21	22	23	24
Hojas (sin extracto)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Extracto	0,00%	94,08%	4,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	51,15%
Etolanol	2,60%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Hexano	79,19%	5,92%	0,28%	0,17%	0,00%	0,00%	1,42%	2,70%
Fracción hexano	18,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Cloroformo	0,00%	0,00%	95,28%	97,40%	100,00%	100,00%	78,92%	46,14%
Fracción Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	2,43%	0,00%	0,00%	19,67%	0,00%
Acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Perdidas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Agua	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
EDTA	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PG	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colorante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fragancia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Texapon	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Alcalinizante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

COMPONENTE	25	26	27	28	29	30	31	32
Hojas (sin extracto)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Extracto	5,58%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Etolanol	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Hexano	0,30%	0,47%	0,28%	0,00%	0,00%	0,98%	1,08%	0,00%
Fracción hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Cloroformo	5,03%	24,27%	3,76%	0,00%	0,00%	12,97%	14,40%	0,00%
Fracción Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Acetona	89,09%	28,63%	93,10%	100,00%	100,00%	76,18%	84,52%	0,00%
Fracción acetona	0,00%	0,00%	2,86%	0,00%	0,00%	9,87%	0,00%	100,00%
Perdidas	0,00%	46,63%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Agua	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
EDTA	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PG	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colorante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fragancia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Texapon	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Alcalinizante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

COMPONENTE	33	34	35	36	37	38	39	40
Hojas (sin extracto)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Extracto	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Etolol	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción acetona	0,00%	10,73%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Perdidas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Agua	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%	98,75%	98,75%	0,00%
EDTA	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	1,25%	1,25%	0,00%
PG	100,00%	89,27%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colorante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fragancia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Texapon	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Alcalinizante	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

COMPONENTE	41	42	43	44
Hojas (sin extracto)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Extracto	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Etolol	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción hexano	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción Cloroformo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Acetona	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Fracción acetona	0,00%	0,00%	0,00%	2,40%
Perdidas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Agua	0,00%	0,00%	0,00%	75,36%
EDTA	0,00%	0,00%	0,00%	0,96%
PG	0,00%	0,00%	0,00%	19,92%
Colorante	0,00%	100,00%	0,00%	0,05%
Fragancia	0,00%	0,00%	100,00%	0,05%
Texapón	0,00%	0,00%	0,00%	1,01%
Alcalinizante	100,00%	0,00%	0,00%	0,27%

ANEXO H. Tabla de distribución de Fisher



Fuente: Jean-Michel Jolion 2006-05-27.

ANEXO I. Tabla de prueba Tukey

VIII. Puntos porcentuales del estadístico del rango studentizado (continuación)
 $q_{\alpha, 25}(p, f)$

<i>f</i>	<i>p</i>																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	18.1	26.7	32.8	37.2	40.5	43.1	45.4	47.3	49.1	50.6	51.9	53.2	54.3	55.4	56.3	57.2	58.0	58.8	59.6	
2	6.09	8.28	9.80	10.89	11.73	12.43	13.03	13.54	13.99	14.39	14.75	15.08	15.38	15.65	15.91	16.14	16.36	16.57	16.77	
3	4.50	5.88	6.83	7.51	8.04	8.47	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.16	10.35	10.52	10.69	10.84	10.98	11.12	11.24	
4	3.93	5.00	5.76	6.31	6.73	7.06	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.67	8.80	8.92	9.03	9.14	9.24	
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72	7.83	7.93	8.03	8.12	8.21	
6	3.46	4.34	4.90	5.31	5.63	5.89	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.04	7.14	7.24	7.34	7.43	7.51	7.59	
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.35	5.59	5.80	5.99	6.15	6.29	6.42	6.54	6.65	6.75	6.84	6.93	7.01	7.08	7.16	
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48	6.57	6.65	6.73	6.80	6.87	
9	3.20	3.95	4.42	4.76	5.02	5.24	5.43	5.60	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28	6.36	6.44	6.51	6.58	6.65	
10	3.15	3.88	4.33	4.66	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.12	6.20	6.27	6.34	6.41	6.47	
11	3.11	3.82	4.26	4.58	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98	6.06	6.14	6.20	6.27	6.33	
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.40	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88	5.95	6.02	6.09	6.15	6.21	
13	3.06	3.73	4.15	4.46	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79	5.86	5.93	6.00	6.06	6.11	
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25	5.36	5.46	5.56	5.64	5.72	5.79	5.86	5.92	5.98	6.03	
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65	5.72	5.79	5.85	5.91	5.96	
16	3.00	3.65	4.05	4.34	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59	5.66	5.73	5.79	5.84	5.90	
17	2.98	3.62	4.02	4.31	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.55	5.61	5.68	5.74	5.79	5.84	
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.83	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50	5.57	5.63	5.69	5.74	5.79	
19	2.96	3.59	3.98	4.26	4.47	4.64	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.32	5.39	5.46	5.53	5.59	5.65	5.70	5.75	
20	2.95	3.58	3.96	4.24	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43	5.50	5.56	5.61	5.66	5.71	
24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32	5.38	5.44	5.50	5.55	5.59	
30	2.89	3.48	3.84	4.11	4.30	4.46	4.60	4.72	4.83	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21	5.27	5.33	5.38	5.43	5.48	
40	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.74	4.82	4.90	4.98	5.05	5.11	5.17	5.22	5.27	5.32	5.36	
60	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65	4.73	4.81	4.88	4.94	5.00	5.06	5.11	5.15	5.20	5.24	
120	2.80	3.36	3.69	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56	4.64	4.71	4.78	4.84	4.90	4.95	5.00	5.04	5.09	5.13	
∞	2.77	3.32	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47	4.55	4.62	4.68	4.74	4.80	4.84	4.98	4.93	4.97	5.01	

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

**AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL
LUMIERES**

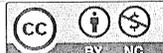
Nosotros, **Daniela Cuervo Salcedo y Julián Alexander Vanegas Campos**, en calidad de titulares de la obra **Diseño de un producto antibacterial para superficies** procedente de extractos vegetales de *Drimys granadesnis* L.f a nivel laboratorio, elaborada en el año 2016, autorizamos al Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la *licencia Creative Commons* que se señala a continuación:

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

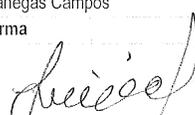
De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación		X
Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D.C, a los 18 días del mes de agosto del año 2017.

LOS AUTORES:

Autor 1	
Nombres	Apellidos
Daniela	Cuervo Salcedo
Documento de identificación No	Firma
1143854947	

Nombres	Apellidos
Julián Alexander	Vanegas Campos
Documento de identificación No	Firma
1072699691	

2