

18 No 78



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS

"ORIGENES Y TIPOS DE CONTAMINACION MAS FRECUENTES EN COSMETICOS"



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EDITH JOSEFINA NAVA SUSANA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

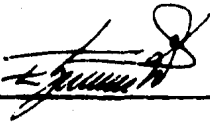
PRESIDENTE: PROF. JUAN BOSCO BOUE PEÑA
VOCAL: PROFA. ROSA MARIA RAMIREZ GALA
SECRETARIO: PROFA. ELVIA CORTES MANRIQUE
1er. SUPLENTE: PROF. SALVADOR MARTIN SOSA
2do. SUPLENTE: PROFA. LUZ DEL CARMEN CAMACHO SUSUNAGA

Sitio donde se desarrolló el tema:

AVON COSMETICS, S.A. DE C.V.

SUSTENTANTE:

EDITH JOSEFINA NAVA SUSANA



ASESOR:

Q.F.B. ELVIA CORTES MANRIQUE



CON AMOR Y ADMIRACION A MI PADRE,
POR SU CONSTANTE LUCHA POR LA SUPERACION,
POR SU EJEMPLO DE RECTITUD Y TENACIDAD,
POR SU PACIENCIA Y APOYO BRINDALOS.

CON AMOR Y RESPETO A MI MADRE,
POR SU INFINITA BONDAD,
POR SU CONSTANTE ALEGRIA,
POR DARME SIEMPRE LO MEJOR DE
ELLA MISMA.

A MIS HERMANOS : CON TODO MI APRECIO Y MI
CARINO

MI SINCERO AGRADECIMIENTO AL RESPETABLE JURALO
POR LAS ATENCIONES QUE TUVO CONMIGO

A LA Q.F.B. ELVIA CORTES DE GARDUÑO
POR SU VALIOSA AYUDA Y AMISTAD QUE
SIEMPRE ME HA BRINDADO.

INDICE

Páginas :

INTRODUCCION 1 - 2

Capítulo I

"ORIGENES DE CONTAMINACION"

A) Factores Primarios	
1) Materias primas	3 - 14
2) Equipo de manufactura	14 - 16
3) Medio Ambiente	16 - 18
4) Personal	18 - 20
5) Equipo de Llenado	20 - 21
6) Materiales de empaque	22 - 22
B) Factores Secundarios	22 - 23

Capítulo II

"TIPOS DE CONTAMINACION MAS FRECUENTES"

A) Pseudomona aeruginosa	24 - 31
B) Staphylococcus aureus	32 - 33

Páginas :

C) Enterobacterias	34 - 34
1) Escherichia coli	34 - 36
D) Hongos	36 - 38
1) Candida albicans	38 - 38
2) Aspergillus	38 - 39
3) Penicillium	39 - 40

Capítulo III

"ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS"

A) Muestreo y manejo de muestras de materia prima y producto terminado	41 - 43
B) Preparación de muestras	43 - 45
C) Evaluaciones microbiológicas	45 - 56
D) Formulación de Medios y Preparación -- de Reactivos y Colorantes	57 - 72
E) Límites Microbiológicos	72 - 77

Páginas :

Capítulo IV

"PRINCIPALES METODOS DE ESTERILIZACION EN MATERIA PRIMA Y COMPONENTES PRIMARIOS"

A) Procesos Físicos de Esterilización	78- 79
1) Métodos térmicos	79 - 80
a) Esterilización por calor seco	80 - 82
b) Esterilización por calor húme do o con Vapor bajo presión	82 - 85
2) Métodos No térmicos	
a) Esterilización por Luz Ultra- violeta	85 - 87
b) Esterilización por Radiaciones ionizantes	87 - 89
c) Esterilización por Filtración	89 - 91
B) Procesos Químicos	
1) Esterilización por medio de Gas	92 - 93
a) Esterilización con Oxido de -- Etileno	93 - 99
b) Esterilización con Beta-pronio lactona	99 -100
c) Proceso Aséptico	100 -100

Páginas :

Capítulo V

<u>"CONSERVALORES Y SU IMPORTANCIA"</u>	101 - 104
A) Diferentes tipos de conservadores	104 - 108
B) Clasificación y Niveles de concentración	109 - 112
C) Factores que influyen en la Actividad de los Conservadores	112 - 118
D) Mecanismo de Acción	118 - 120
E) Reducción de la Actividad Antimicrobiana	120 - 124
F) Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	124 - 129

Capítulo VI

"PARTE PRACTICA"

Análisis Microbiológico de :

A) Materia prima	130 - 134
B) Equipo de Manufactura	134 - 135
C) Medio Ambiente	135 - 136
D) Producto en Proceso	136 - 137

Páginas :

E) Producto Envasado 137 - 137

F) Materiales de Empaque 137 - 139

"CONCLUSIONES" 140 - 142

"BIBLIOGRAFIA" 143 - 147

"INTRODUCCION"

Si bién la belleza física puede ser una cosa superficial, los problemas que afectan a los productos de belleza son realmente profundos. Los cosméticos por contaminación microbiana se descomponen adquiriendo una apariencia y olor desagradables. Las emulsiones cosméticas se separan, así mismo pierden las propiedades que su formulación les confiere. La alteración puede presentarse después de que el crecimiento microbiano ha llegado a su máximo y cuando la cuenta está declinando. Ocasionalmente se han encontrado sustancias que contienen hasta 7 millones de Microorganismos por mililitro sin señales obvias de alteración.

Los productos cosméticos pueden llegar a ser considerados como una amenaza para la salud pública por convertirse en transmisores de enfermedades. En el pasado se había obtenido cierta consolación al no poder contes-

tar dos preguntas pertinentes: 1) ¿Afecta el contenido microbiano solamente al producto? y 2) ¿Existe algún registro de infecciones que hayan resultado de un cosmético contaminado?. Algunos informes recientes han implicado que los cosméticos contaminados y cremas farmacéuticas en el mismo estado son el origen de cierta patología humana en el ambiente hospitalario.

El origen de este tipo de problema que aqueja a la Industria Cosmética es uno sólo: "CONTAMINACION POR MICROORGANISMOS". Sin importar su origen, la presencia de un gran número de microbios durante un período importante es heraldo de peligro contra la calidad y salubridad de un producto.

Por lo antes mencionado, a través de este trabajo serán analizados todos los posibles factores que originan la contaminación microbiana, así como mecanismos que garanticen la calidad microbiológica de los productos y en consecuencia la Importancia de un Análisis Microbiológico en los Cosméticos, con el fin de evitar una posible contaminación al consumidor.

Capítulo I

"ORIGENES DE CONTAMINACION"

Para poder analizar los posibles orígenes de contaminación microbiana, se debe saber que en todas las etapas por las que pasa un cosmético durante su vida está sujeto a contaminación; a esto hay que agregar que la composición de muchos de ellos es un medio rico en nutrientes que pueden aprovechar los microorganismos para su desarrollo.

Todos los investigadores que han abordado el tema de la Microbiología en los cosméticos están de acuerdo -

en que el principal peligro que los microorganismos presentes pueden acarrear es contra el mismo producto, al que le pueden provocar enturbiamiento, rompimiento de emulsión, cambio de olor, color, viscosidad, formación de gas, etc. Los casos en que un producto de perfumería o cosmético ha podido ser detectado como origen de contaminación patógena son muy escasos, máxime si se toma en cuenta los miles de millones de unidades que han sido vendidos desde hace décadas. Los ejemplos más conocidos de esto último son las infecciones oculares ocurridas en Suecia e Inglaterra por el uso de ungüentos y soluciones salinas conteniendo Ps.aeruginosa y los casos de septicemia por K.pneumoniae contenida en un envase aplicador de crema para las manos, el cual se utilizaba en la sección de terapia intensiva y que había sido relleno en varias ocasiones con productos que habían sido vendidos en el mercado.

Como varios autores lo hacen notar, la piel es una magnífica barrera que vive en equilibrio con una gran cantidad de microorganismos sin permitir su paso al interior del cuerpo, pero su ruptura o lesión constituye una puerta de entrada cuyo peligro potencial debe ser tomado en cuenta.

A continuación se mencionan los posibles orígenes de contaminación, los cuales deben ser analizados detalladamente. Estos pueden ser clasificados en :

A) Factores Primarios :

- 1) Materias primas
- 2) Equipo de Manufactura
- 3) Medio Ambiente
- 4) Personal
- 5) Equipo de llenado
- 6) Materiales de empaque

B) Factores Secundarios.

A) Factores Primarios: es la contaminación obtenida durante el proceso del producto.

1) Materias primas:

De los diversos ingredientes que se usan para fabricar cosméticos, algunos de ellos muestran frecuentemente niveles de contaminación peligrosa.

a) Materias primas de Origen Animal:

Dentro de estos se pueden citar: grasas y aceites animales, caseína, extractos de placenta, huevo, gelatina, etc., los cuales pueden ser portadores de contaminantes (E.coli, Salmonella, Staphylococcus aureus, etc).

b) Materias primas de Origen Vegetal:

Lista de Microorganismos encontrados:

<u>Material</u>	<u>Microbio aislado</u>
Almidón de Maiz	<u>Staphylococcus aureus</u> , <u>Aerobacter</u>
Almidón de papa	<u>Bacillus sp.</u>
Almidón de trigo	Bacilos Gram (-) Halofilos
Grasa vegetal	Hongos y <u>Bacillus sp.</u>

<u>Material</u>	<u>Microbio aislado</u>
Goma arábiga	<u>E.coli</u> , <u>Salmonella</u>
Agar	<u>Bacillus sp.</u> , Hongos
Aceite de Coco	Hongos y levaduras

c) Materias primas de Origen Mineral.

Las materias primas vegetales y minerales, con adecuados procesos de producción, pueden lograr una calidad microbiológica admisible ya que algunos de ellos, durante el proceso, requieren de una alta temperatura, por lo que la contaminación microbiana, en caso de existir, desaparece.

Es posible, en materias primas en polvo como son talcos y colorantes, realizar una esterilización con Oxido de Etileno o bien con Calor Seco; esto dependerá de la naturaleza de la materia prima de que se trate, y se tratará ampliamente en los siguientes capítulos.

Las principales materias primas involucradas en la fabricación de cosméticos incluyen:

- a) Agua
- b) Resinas
- c) Agentes dispersantes
- d) Surfactantes
- e) Saborizantes o perfumes
- f) Geles acuosos
- g) Polvos

De los anteriores, el agua es considerada el contaminante número uno en los cosméticos, ya que es el origen más frecuente de contaminación de Ps.aeruginosa, sobre todo cuando se trata de agua deionizada o desmineralizada que se ha mantenido en almacenamiento. El agua requiere una atención particular, no sólo por su importancia como materia prima sino también como solvente, para limpiar y enjuagar.

La siguiente es una guía de seguridad en la calidad Microbiológica del proceso de Agua para la fabricación de Cosméticos.

El número permisible de microorganismos puede ser el origen de la contaminación de todo el sistema de fabricación. Es responsabilidad del fabricante establecer no solo un número máximo de microorganismos para el agua de proceso; sino también los microorganismos específicos que sean dañinos para el producto mismo, y para el público.

Las materias orgánicas y/o inorgánicas son indeseables para el agua de proceso por algunas de las siguientes razones:

- A) Llegan a servir como nutrimentos para el desarrollo de microorganismos, que podrían tener un efecto deteriorable en las propiedades físicas del producto.
- B) Es posible produzcan oscurecimiento al producto.
- C) Llegan a impartir un olor desagradable al ---

agua.

D) El agua con un alto contenido mineral forma -
escamas de cal que sirven como trampa de materia orgánica y microorganismos. Aunque el cloro es un excelente de -
sinfectante del agua, probablemente cause problemas de -
estabilidad en el color y olor al producto, por lo que -
debe ser cuidadosamente controlado en el proceso del ---
agua.

E) Altas concentraciones de minerales presentes -
en el agua de proceso podrían afectar en lo estético, -
propiedades funcionales o productos finales.

Manejo de Muestras de Agua

El propósito es asegurar una determinación exacta -
del contenido microbiológico en la muestra de agua. Las -
muestras del agua de proceso, que serán analizadas, de -
ben ser transferidas en envases estériles, desde el pun -
to donde se toma, al laboratorio. El análisis deberá ha -
cerse antes de una hora después de tomadas las muestras,
si esto no fuera posible, deben ser refrigeradas y anali -
zadas dentro de las cuatro horas siguientes.

Diseño y mantenimiento del sistema

Ingeniería: El sistema será diseñado con un drenaje
y recirculación apropiados, con un mínimo de codos, T, y
ángulos; deberán evitarse los "Caminos sin salida" en el
sistema ya que podrían convertirse en el mejor origen de
desarrollo microbiano en el sistema. Los medidores de -
agua son otra área que favorece al desarrollo.

El sistema tiene que ser examinado a intervalos regulares con un máximo de eficiencia, eliminando los minerales. Cuando se use el sistema de deionización la regeneración y mantenimiento general deberán ser responsabilidad de una persona competente que esté familiarizada con el equipo, filtros en línea, lámparas U.V., o algún otro equipo que requiera especial atención. El servicio tendrá que ser acorde a las especificaciones del equipo para así mantener las operaciones al máximo de eficiencia.

1 Cuando se almacena el agua en un tanque, se recomienda tomar muestras periódicas para llevar un control del desarrollo de microorganismos.

Es responsabilidad del fabricante de cosméticos, artículos para tocador y fragancias, establecer métodos y procedimientos para mantener la pureza microbiana dentro de los tanques de almacenamiento de agua y tuberías. Es recomendable consultar al Microbiólogo todo lo concerniente a los aspectos microbiológicos de la Ingeniería y mantenimiento del sistema.

Química: Cuando los resultados de las pruebas indican que el agua en un sistema de deionización no está dentro de las especificaciones químicas y /o físicas establecidas, se recomienda que el sistema sea revisado. Por ejemplo cambios en resistencia eléctrica medidos por un potenciómetro, o cambios repentinos en el pH, son dos criterios indicativos de un problema potencial.

Microbiología: Cuando las pruebas establecidas para los cosméticos por el fabricante indican una población microbiana superior al límite máximo aceptado, o un cambio significativo en el nivel, se deben realizar los siguientes pasos:

1) Determinar el origen de los microorganismos. - La contaminación puede provenir, entre otros lugares, de tanques de almacenamiento, pinas de reparto, válvulas y medidores. Esta construcción es típicamente americana.

2) Sanitizar el origen de contaminación y todas las partes del sistema "Río abajo" desde el origen. La contaminación que usualmente ocurre en las resinas iónicas se controla circulando, a través de las resinas, una solución de formaldehído (en concentraciones desde 0.25 % al 1.5 %, con formaldehído al 37. %) o concentraciones apropiadas de otros agentes compatibles. Debe consultarse a los fabricantes de resinas sobre las recomendaciones de agentes compatibles. Se tendrá cuidado de eliminar todo residuo de formaldehído y otros agentes, circulando agua después del tratamiento; por ello, es recomendable que la sanitización se haga sobre bases ya establecidas.

Como una práctica general, debe circularse una cantidad suficiente de agua entre operación y operación, esta cantidad dependerá del tamaño del sistema.

Perfil Microbiano: Nivel de población y especies.

Es deseable que el agua usada en la fabricación de-

productos cosméticos, artículos para tocador, y fragancias tenga un nivel prácticamente muy bajo de microorganismos.

Es responsabilidad del fabricante determinar las consecuencias del número residual de microorganismos. En el caso de productos donde se usa el agua para "Mezclado en frío", lo ideal sería usar agua sin microorganismos.

Los únicos medios de localizar el origen de microorganismos es conociendo las partes del sistema de agua; con este tipo de información, es posible instituir procedimientos correctivos con objeto de minimizar la frecuencia de problemas microbiológicos en el sistema de proceso de agua.

Las siguientes áreas del sistema desmineralizador de agua deberán recibir sumo cuidado:

- 1) La entrada de agua que alimenta la unidad
- 2) El agua que proviene de las columnas de resinas para intercambio iónico.
- 3) Cada estación de agua de la unidad desmineralizadora.
- 4) Algún otro punto en el sistema donde la información sobre el estado microbiológico se estime necesario.

Es recomendable que las muestras adicionales para analizarse sean tomadas de los siguientes puntos:

- 1) Placa de carbón: Tomar una muestra de agua -- después de que pase por ésta unidad.

2) Tanques de almacenamiento de agua.

3) Radiación U.V. Tomar la muestra después de -
que pase por ésta unidad.

1 Lo ideal es hacer una historia de población micro -
biana de cada área del sistema, para lo cual es recomen -
dable que se programe una muestra incluyendo cada esta -
ción de donde se mueve el agua así como el tanque de al -
macenamiento. La frecuencia de las pruebas depende del +
nivel de referencia de cada compañía.

Control de Microorganismos:

Los microorganismos que normalmente se encuentran -
en un sistema desmineralizador, tienen su origen en el -
agua misma que será desmineralizada. Los microorganismos
son adsorbidos desde el agua existente en las resinas. -
Es en este punto que ellos se multiplican y obstruyen -
las partículas de resina, disminuyendo la eficiencia del
proceso de intercambio iónico. Las resinas contaminadas -
microbianamente actúan como un foco de contaminación que
se extiende por todo el sistema.

Métodos de Control:

a) Desinfección química:

Cuando hay un cambio ascendente en la cuenta micro -
biológica del sistema, este debe cerrarse y tratarse. La
desventaja de este proceso es que la solución es solo -
temporal.

b) Calor:

El calor es un medio efectivo en el control de la población microbiana. Esto puede completarse manteniendo el agua en el tanque de almacenamiento a una temperatura elevada ($160^{\circ} - 180^{\circ}\text{F}$) ($71^{\circ} - 82^{\circ}\text{C}$), o bien haciendo que el agua trasladada desde el tanque de almacenamiento se caliente rápidamente antes de su uso en la fabricación.

El sistema caliente debe estar construido de un material resistente al calor. Así, por ejemplo, no se pueden usar las tuberías de cloruro de polivinil sino únicamente tuberías de acero inoxidable.

c) Luz U.V.:

Otra forma para minimizar la presencia de microorganismos en un sistema desmineralizador de agua, es el uso de luz U.V. Una instalación de lámparas U.V. debe constar por lo menos de dos. La primera se coloca al empezar el sistema, para que el agua sea irradiada antes de entrar al sistema. La segunda unidad se coloca en un lugar tal que se irradie toda el agua deionizada que va al tanque de almacenamiento. Además el agua debe estar recirculando. Deben tomarse estas precauciones para que la unidad U.V. trabaje con un máximo de eficiencia. Si el agua contiene sólidos suspendidos, estos deben ser removidos pasando el agua a través de un filtro. Es recomendable se revisen periódicamente las unidades U.V.

d) Filtración por membrana:

Estos filtros eliminan partículas o microorganismos

Grandes, de acuerdo al tamaño del poro. Las membranas - trabajan en todas condiciones: los filtros se diseñan pa - ra la esterilización de fluidos con aplicación especial - para el agua; y, dependiendo de la calidad del agua tra - tada, es o no necesario usar un filtro cartucho para eli - minar las partículas grandes. Este pretratamiento prolon - ga la vida de las membranas y ayuda a mantener la veloci - dad del fluido en el sistema en particular. De cualquier manera, antes de la instalación de un sistema de filtra - ción de membrana, se deben seguir al pie de la letra las recomendaciones del proveedor para su instalación, uso y mantenimiento. Además el dispositivo debe revisarse pe - riódicamente para verificar su funcionamiento apropiado.

e) Ozono:

Hay equipos disponibles con medios prácticos de ozo - nación, para reducir el nivel de microorganismos en el - agua. Además debe ser revisado periódicamente para asegu - rar el funcionamiento apropiado.

f) Personal:

Para establecer un buen control, el programa debe - completarse utilizando personal apropiadamente entrenado en el mantenimiento del sistema.

2) Equipo de Manufactura

Un segundo y gran origen de contaminación es el -- equipo, sobre todo en aquellos productos que durante su - proceso de fabricación no incluyen ningún calentamiento.

Los microorganismos están constantemente reproduciéndose y el crecimiento microbiano puede no ser observado durante un período relativamente prolongado al no ser visibles en los rincones y hendiduras del equipo de la planta. Si esto ocurre, los microorganismos avanzarían hasta que finalmente, aparecerían en el producto terminado. El control de contaminación microbiológica debe llevarse a cabo como parte vital en la fabricación del producto. Es indispensable la limpieza del equipo después de que se haya usado. Como una práctica regular, se deben limpiar las líneas, calderas, tanques y todos aquellos utensilios usados en la manufactura de cosméticos susceptibles de contaminación con agua caliente, vapor y/o soluciones sanitizantes para ayudar a realizar una buena fabricación.

Los agentes sanitizantes empleados son diferentes; ejem: solución de compuestos cuaternarios de amonio al 0.5 %, solución de formaldehído o hipoclorito de sodio diluido (200-250 ppm), vapor, solución de yodo, compuestos fenólicos.

La selección de los sanitizantes dependerá del tipo de equipo y del producto a fabricar; esto sin olvidar que, para que la sanitización sea efectiva, es conveniente rotar los sanitizantes por lo menos una vez al mes, para evitar la adaptación de los microorganismos.

El tiempo de contacto del sanitizante con el equipo es de gran importancia ya que de ello depende en gran

parte la efectividad de los sanitizantes.

Los resultados de las pruebas microbiológicas que se hagan del equipo mostrarán la efectividad de la operación de limpieza. La presencia de algunos miles o cientos de microorganismos en una mancha o ml. cúbico exige acción inmediata. Unas cuantas docenas son inevitables, aún cuando es posible obtener cuenta de cero en las zonas realmente limpias y sanitizadas.

Es importante un programa de adecuada limpieza general a fin de controlar el hospedaje microbiano, entendiéndose por limpieza general, la de los pisos, paredes, techos, anaqueles, depósitos, mesas de trabajo (por arriba y por abajo), la parte posterior de anaqueles (por debajo también), o bien cualquier área de trabajo. En esos sitios las salpicaduras y derrames de productos que se mezclan con el polvo constituyen un potencial para el desarrollo de ciertas bacterias resistentes.

3) Medio Ambiente:

El tercer origen de contaminación es el medio ambiente. Las condiciones higiénicas del local de manufactura necesariamente repercuten en los productos que se elaboran en él. El área debe contar con pisos, paredes y techos limpios y sin superficies rugosas o permeables. Las puertas protegerán las áreas de manufactura del medio ambiente exterior para minimizar la circulación de aire. Los sistemas de ventilación deben incluir filtros-

cambiable, adecuados para mantener una entrada limitada de partículas materiales, insectos, bacterias y otros contaminantes. Se tendrá presión positiva en áreas que contengan material fácil de contaminarse, las ventanas tendrán tela de alambre y habrá un buen control de roedores e insectos. El agua usada para humedecer será de calidad microbiológica aceptable.

En el caso de no contar con un sistema de aire filtrado o sistema de presión positiva, se recomienda nebulizar las áreas de manufactura con agentes sanitizantes como el cloruro de benzalconio al 10 % o bien el uso de propileno glicol al 10 % en solución acuosa, esto debe realizarse diariamente o bien con base a los resultados microbiológicos, debiendo realizarse cuando el personal haya desalojado el área para así evitar intoxicaciones; la persona que nebulize el área deberá usar una mascarilla.

El área de producción estará provisto de un lavamanos. Hay que recordar con anuncios al personal que debe lavarse las manos, explicando claramente la facilidad del aseo. No se permitirá comer y fumar en las áreas de manufactura.

Envases limpios, utensilios y agua microbiológicamente aceptable, además de un desinfectante, mantendrán en general una área limpia. Habrán recipientes limpios y apropiadamente rotulados para recolectar todo sobrante y fragmentos de materiales. Existirán áreas definidas para

almacenar materias primas y producto terminado.

Una vez terminado un lote de proceso se deberán limpiar y almacenar los residuos de productos.

Debe tenerse cuidado al tomar los materiales almacenados para prevenir la introducción de microbios.

Las condiciones deseables del almacén son: seco, - protegido de contaminantes aéreos, mantenido dentro de - los límites de temperatura razonables. Localizado dentro de áreas de poca circulación y suficientemente grande para separar materiales entrantes de materiales ya recibidos y aprobados. Estarán almacenados apropiadamente separados del piso y paredes para prevenir una contaminación.

Todo lo anterior no garantiza la fabricación de cosméticos sin contaminar, pero es indispensable dentro de las normas comunes para lograrlo.

4) Personal:

Un programa educacional adecuado para el personal - así como la impartición periódica de cursos lo convencerán o concientizarán de la importancia de su labor dentro de la fabricación de cosméticos de una buena calidad. El personal es una fuente importante de contaminación. - Para que un producto sea de buena calidad, se requiere - que toda la gente que se encuentra en contacto directo - de la fabricación del mismo, especialmente aquellos que pesan las materias primas, quienes operan la maquinaria, etc., desempeñe sus obligaciones en una forma adecuada,

para así obtener una venta exitosa y un producto de buena calidad.

Las manos y el cabello tienden a ser grandes portadores de contaminantes, Staphylococcus son innatos de esas áreas. El cabello puede ser origen de Pseudomona aeruginosa. En un estudio reciente sobre el contenido microbiológico del cabello, se aseguró que las Pseudomonadas podían ser aisladas en gran número. El cabello se lava con agua potable, la cual contiene algunas Pseudomonadas. Además, la mayoría de las personas humedecen su cabello antes de cepillarlo, especialmente en la mañana. Así las Pseudomonadas se introducen sobre el cabello y ahí se multiplican. Debe enseñársele al trabajador la importancia de una buena higiene personal. Deben estar adecuadamente vestidos, cabellos cubiertos y frecuentes lavados de manos, particularmente después de los períodos de descanso, comidas, o ir al baño. Es recomendable el uso de guantes protectores, cofias para retener el cabello, uniformes limpios, así como exámenes periódicos que aseguren la condición sanitaria del personal.

Programa Educativo

Los siguientes son ejemplos de buenas prácticas microbiológicas de manufactura que deben destacarse al personal:

A) Los lotes pueden contaminarse:

a) Por contacto físico, especialmente por un per

sonal pobre en higiene.

- b) Por densa contaminación de los procesos y/o -
enjuague con agua contaminada, polvo y partí-
culas de materia cargadas con bacterias y hon-
gos así como esporas aéreas y células vegeta-
tivas.
 - c) Equipo sucio.
 - d) Materias primas contaminadas.
 - e) Por el uso de recipientes de materia prima su-
cios.
- B) Correctos procedimientos de limpieza y sanitiza-
ción.
- C) Motivar a los empleados a reportar la introduc-
ción de alimentos o condiciones de operación de-
la planta que afecten la integridad del producto
- D) Presentar películas sobre la importancia de la -
calidad microbiológica.

5) Equipo de Llenado

Gran parte de lo que se dijo en cuanto al equipo de
manufactura es aplicable al equipo de llenado. Pero debi-
do a que esto es más complejo, es recomendable que el -
sistema se desensamble totalmente, se limpie, y sanitice
cada vez que sea posible y, ya ensamblado, se cargue con
un sanitizante, dejándolo un tiempo aproximado de 30 mi-
nutos, dependiendo del equipo o del producto de que se -
trate. Es importante que no queden residuos del saniti-

zante en el equipo y que se le conserve debidamente cubierto. Una vez sanitizado el equipo, deberán correrse pruebas para confirmar si el equipo fué debidamente sanitizado.

Recomendaciones

A) Todos los utensilios auxiliares y equipo de llenado deberán limpiarse y sanitizarse entre cada nuevo lote de diferente producto. La frecuencia de limpieza y sanitización del equipo por corridas continuas o lotes consecutivos deberá ser determinada por pruebas apropiadas del departamento de microbiología.

B) El equipo auxiliar estará limpio, sanitizado, seco y protegido apropiadamente antes de ser guardado.

C) Etiquetar con marbete de identificación mangaderas, tambores, tanques y equipo de llenado limpios y sanitizados indicando que está limpio y sanitizado, además de los datos de la persona que ejecutó la operación.

D) El equipo auxiliar, después de estar almacenado y antes de ser usado, tendrá que ser sanitizado, excepto cuando pruebas anteriores y/o experiencias previas hayan mostrado que estuvieron seguramente almacenado y mantenidos dentro de una limpieza y condiciones sanitarias. El tiempo de almacenaje del equipo auxiliar dependerá de las pruebas anteriormente realizadas y teniendo como referencia los resultados anteriores.

6) Materiales de Empaque:

El empaque primario suele ser también una fuente de contaminación, aunque originalmente se fabrican prácticamente en condiciones microbiológicamente aceptables. Su contaminación proviene principalmente del polvo, por lo que se recomienda sean conservados en lugares limpios y secos y de preferencia en envases cerrados y cubiertos con plástico, que no permitan la entrada del polvo. Otro material que se ha encontrado contaminado con frecuencia son los empaques de las tapas, debido principalmente a su manejo y almacenaje en condiciones antihigiénicas. En componentes para el área de los ojos como son: aplicadores de máscaras, pinceles, brochas, etc., se recomienda su esterilización con óxido de etileno.

Todo componente de empaque debe ser almacenado en condiciones que minimicen la posibilidad de contaminación aérea y acumulación de humedad. Botellas, tapas, roscas, forros, tienden a guardar mohos y esporas. Es una precaución esterilizar o sanitizar las botellas, tapas, antes de empaclar, si es que esto puede llevarse a cabo, sin que se distorsionen las tapas o forros.

Se ejecutarán pruebas periódicas en los materiales de empaque apropiados, o envases del producto, asegurando así las especificaciones microbiológicas de la compañía.

B) Factores Secundarios (Contaminación Secundaria)

Con este nombre se conoce a la que se produce durante

te el uso del cosmético hasta su terminación. Es la más-difícil de predecir, ya que su naturaleza puede ser muy-diversa y es prácticamente imposible de evitar. Según - Wallhousser, cada vez que se introduce un dedo en una - crema para tomar una pequeña porción, se deja de 20-100 gérmenes que pueden reproducirse en el producto. Esto - da una idea de lo que debe soportar el cosmético duran- te semanas y en ocasiones años en que se mantiene en -- uso. La única solución posible a este tipo de contamina- ción es la presencia de un buen sistema conservador, - aunque también puede ayudar el uso de aplicadores, atomi- zadores, tubos colapsibles, sistemas en aerosol y cual- - quier tipo de envase que evite el contacto directo del - producto con el consumidor.

Capítulo II

"TIPOS DE CONTAMINACION MAS FRECUENTES"

Los reportes que se encuentran en la literatura sobre la magnitud de la contaminación en cosméticos es, -- desgraciadamente, poco sistemática, limitada en mucho a estudios aislados, realizados principalmente en los Estados Unidos con poca información referente a identificación de gérmenes y con conclusiones a veces contradictorias. Por citar algunos ejemplos: Wolven y Levenstein, -- en un estudio realizado en 1969, encontraron que de 250 muestras de cosméticos analizadas, 61, es decir el ---

24.4 % resultaron contaminadas, mientras que en otro estudio similar, realizado en 1972, de 223 muestras analizadas, sólo 3, es decir el 3.5 % mostraron el mismo defecto y concluyendo que en la fabricación de cosméticos se usan buenas prácticas de manufactura. Anderson, McConville y Anger en 1973 estudiaron el grado de contaminación de delineadores y sombras para los ojos que de 43 muestras que habían estado en uso durante una semana a tres años, sólo 9 contenían más de 100 microorganismos por gramo y sólo una contenía más de 650. También encontraron que en el caso de aplicadores automáticos, de 13 muestras analizadas sólo dos mostraban menos de 200 microorganismos. Por otro lado Ferreira reporta que en un análisis de talcos y materias primas para talcos, más del 50 % dieron cuentas mayores de 100 microorganismos por gramo; en un estudio de la Junta Médica Real de Suecia sobre contaminación microbiológica de preparaciones médicas encontraron que, de 71 ungüentos, pastas, cremas y linimentos, 39 estaban contaminadas, 4 de 3 mucilagos contenían bacterias, 12 de 19 cremas para niños contenían bacterias y 23 lotes de 11 tipos de talcos contenían más de 1000 gérmenes por gramo; finalmente algunas de las cifras reportadas por la FDA son las siguientes: 7 ungüentos contaminados de 79 conteniendo antibióticos, 19 envases conteniendo Pseudomonas de 20 muestras de cremas para las manos y el cuerpo, de 324 muestras de polvos compactos, 91 (28 %) contenían 300 o más gérmenes -

por gramo.

En los cosméticos se han aislado microorganismos como: Pseudomonas, St.aureus, y albus, Enterobacterias patógenas (Salmonella, E.coli, Klebsiella, Proteus, etc.) y Hongos como: Penicillium, Aspergillus y Candida.

En un estudio sobre preservación de cosméticos se ha determinado que microorganismos correspondientes a 17 géneros provienen del aire; 31 géneros provienen del agua; y 9 de otras fuentes contaminantes.

Algunos de los géneros reportados son los siguientes:

<u>Hongos</u>	<u>Bacterias</u>	<u>Levaduras</u>
<u>Absidia</u>	<u>Achromobacter</u>	<u>Candida</u>
<u>Alternaria</u>	<u>Aerobacter</u>	<u>Saccharomyces</u>
<u>Aspergillus</u>	<u>Bacillus</u>	<u>Torula</u>
<u>Citromyces</u>	<u>Enterococcus</u>	<u>Zygosaccharomyces</u>
<u>Cladosporium</u>	<u>Escherichia</u>	
<u>Dematiun</u>	<u>Klebsiella</u>	
<u>Fusarium</u>	<u>Micrococcus</u>	
<u>Helminthosporium</u>	<u>Proteus</u>	
<u>Geotrichum</u>	<u>Pseudomonas</u>	
<u>Mucor</u>	<u>Sarcina</u>	
<u>Paerilomyces</u>	<u>Serratia</u>	
<u>Penicillium</u>	<u>Staphylococcus</u>	
<u>Phoma</u>	<u>Streptococcus</u>	

HongosBacteriasPullulariaRhizopusVerticillium

De estos algunos pueden destruirse mediante calentamiento a 70-80°C por 20 a 30 minutos, otros requieren -- hasta 100°C y una atmósfera de presión durante 30 minutos para ser destruidos.

A) Pseudomona aeruginosa

El género pseudomonas está compuesto por bacilos - gramnegativos móviles que producen pigmentos hidrosolubles que se difunden a través del medio. Se encuentran - ampliamente distribuidos en el suelo, agua, aguas negras y en el aire. Ps.aeruginosa crece con facilidad en los - medios de cultivo, no fermenta la lactosa, y forma colonias redondas, lisas de color verdoso fluorescente y de olor aromático "dulzón" ; de las colonias difunde un pigmento verdeazul hacia el medio. Ps.aeruginosa es patógena solamente cuando es introducida en áreas que carecen de las defensas normales o cuando participa en infecciones mixtas.

Ps.aeruginosa es de los microorganismos más frecuentes y peligrosos en cosméticos, ya que se encuentra es - parcido en el medio exterior y con frecuencia existe en-

la piel de individuos sanos; como ya se dijo, es patógena para el hombre en ocasiones donde se ha asociado a procesos supurativos y de otra naturaleza como son infecciones de córnea, absesos, úlceras, otitis, mastoiditis, y puede producir septicemias, etc. Se ha encontrado como huésped común en agua, ya sea clorada, deionizada, desmineralizada o no. Se reproduce fácilmente en válvulas, tubos en "U", filtros de cerámica, medidores de flujo, equipos de desmineralización y en general cualquier parte del equipo que no puede desinfectarse con frecuencia. Una de las razones por las que este microorganismo es especialmente peligroso es porque es resistente a muchos antibióticos y en los casos en que estos se aplican o administran en cantidades masivas, eliminan casi toda la flora normal que puede competir con él, favoreciendo su desarrollo en forma indirecta.

También suele crecer en aceites hidrocarbonados, petrolatos, detergentes activos, pigmentos y especialmente en aquellos productos que son emulsiones de aceite en agua y que tienen un pH entre 7.0 y 8.5, ya que a la vez contienen una cantidad significativa de agentes no iónicos (tipo tween 30).

Se han aislado Pseudomonas en máscaras para los ojos, lociones para las manos y el cuerpo, lociones para la cara, lociones fijadoras para el cabello y shampoos líquidos, productos a los que le causan alteración.

Las pseudomonas son no sólo responsables de la

descomposición de cosméticos, sino también de alimentos, productos derivados del petróleo y productos farmacéuticos.

El contaminante más común de los compuestos oftálmicos y que como tal es responsable de muchos daños serios a los ojos y a veces hasta la pérdida de la vista, ha sido Ps.aeruginosa.

Se ha establecido que el crecimiento de las pseudomónadas es responsable de la deterioración de shampoos, lociones faciales, bronceadores, productos infantiles, productos de maquillaje, cremas limpiadoras, cremas suavizadoras, cojincillos de limpieza, preparados cosméticos para los ojos, soluciones contra las arrugas, esponjas para la limpieza, soluciones de proteínas, gelatinas cosméticas, aceites de hidrocarburo para limpieza, etc. Estos productos incluyen soluciones simples, emulsiones de aceite en agua, y agua en aceite, sistemas trifásicos, geles y aceites de hidrocarburos.

En ocasiones se han aislado estafilococos, levaduras y mohos, pero raras veces mezclados con las pseudomónadas. La experiencia ha demostrado que un producto con preservación deficiente por naturaleza sólo se ve contaminado por un microorganismo específico, esto es, una crema susceptible a las pseudomónadas, no lo es a los estafilococos o levaduras, aún cuando una infección fulminante de pseudomónadas puede abrir camino a un subsecuente crecimiento de moho. Esto no significa que las --

formulaciones que contienen emulsificadores aniónicos o catiónicos no estén sujetos al ataque, sino más bien la presencia de no-iónicos ha demostrado ser más propicia a la contaminación de esas bacterias.

Las consecuencias de un intenso crecimiento microbiano pueden manifestarse en un olor desagradable, formación de un depósito o turbiedad, cambio en la fluidez y rotura de las emulsiones debido a la actividad enzimática, decoloración y/o presentación de un color parduzco debido a la acción de aceites de hidrocarburo. Ocasionalmente se han encontrado sustancias que contienen hasta 7 millones de microorganismos por mililitro sin señales obvias de descomposición. Pocas personas creerán que productos así pueden venderse para su consumo.

Propiedades de las Pseudomónadas: Al caracterizar un microorganismo como pseudomónada, no se tiene la intención de establecer una auténtica clasificación. Las pseudomónadas son heterotróficas, de flagelación polar, sin o con légamo, sin o con piocianina, sin o con fluorescencia verde amarillenta, sin o con características de colonia amarillo parduzco. Solamente en algunos casos puede reconocerse el género mediante alguna de sus propiedades más notables, como la formación de pigmento. Desde el punto de vista industrial, las pseudomónadas pueden considerarse como bastoncitos gram negativos móviles, con prueba de oxidasa positiva. Las pseudomónadas psicrófilas pueden hallarse en el suelo, agua salada, y

dulce, la piel, los alimentos y en el excremento.

La lectura de publicaciones sobre el crecimiento de las pseudomónadas en los cosméticos y otros productos comerciales revela las posibilidades de este género. Producen lipasas y oxidan los ácidos grasos, fermentan la lactosa, maltosa, celobiosa y melibiosa. Sus enzimas licúan la gelatina, atacan la caseína, producen amilolisis y --son más activas a los 25°C y en su pH de 7-8. Son microaerofílicas; pocos microorganismos tienen su capacidad --para crecer a 0°C.

La susceptibilidad de algunas formulaciones a la --contaminación de las pseudomónadas suele ser específica. Una pseudomónada tomada de una formulación puede no crecer en ninguna otra. Las pseudomónadas aisladas de un --producto de maquillaje, por ejemplo, generalmente sólo --crecen en ese producto específico. Las pseudomónadas aisladas de una crema solo crecerán, por lo general, en ese tipo de crema. En ocasiones ha sido necesario preparar --un medio de cultivo a fin de lograr una proliferación y --después de su adaptación a las condiciones del laboratorio, con frecuencia debe volverse a inocular en la crema original a fin de que recupere su resistencia.

La pseudomoniasis es una enfermedad industrial, el crecimiento de bacterias en un producto se convierte en una infección, la meta de la cual es la destrucción de --ese mismo producto.

B) Staphylococcus aureus

Es un contaminante usual de los cosméticos, normalmente general procede del personal que elabora los cosméticos y se ha encontrado en productos para los ojos, cara, cabello, uñas y manos.

Los estafilococos son las bacterias patógenas por excelencia. Producen inflamaciones y supuraciones en todos los órganos y tejidos del cuerpo. Ocasiona desde lesiones mínimas localizadas hasta infecciones generalizadas, de evolución muy aguda o crónica y tórpidas, apenas perceptible. Da lugar a inflamación, necrosis y formación de abscesos.

Los nombres con los que se conocen a varias de estas enfermedades son panadizo, paroniquias, forúnculos, antrax, septicemias, endocarditis, meningitis, sepsis --uerperal, osteomielitis, enteritis estafilococcocina, emético contagioso, ténfigo neonatorum, intoxicación --alimentaria, acné, etc.

Dentro del género Staphylococcus está la especie aureus o Estafilococo dorado que es la especie patógena --por excelencia.

Características:

Son cocos esféricos o algo aplanados, que se agrupan en racimos. Inmóviles, no esporulados, gram positivos. El diámetro medio es de 0.8 micras, con límites entre 0.5 y 1.2 micras, habitualmente son no capsulados.

Se desarrollan bien en medios simples, a la temperatura óptima de 35°C, con márgenes muy amplios entre 15°C y 40°C. El pH óptimo es de 7.4. Son aerobios y anaerobios facultativos. A las 24 horas se observan colonias grandes, de 2 mm de diámetro, redondas convexas, opacas-brillantes, de borde continuo, con consistencia de mantequilla y fácilmente emulsionables. Las colonias pigmentadas son de color amarillo dorado que varía en tono e intensidad. En agar sangre, algunas cepas son hemolíticas, dejando un halo totalmente incoloro alrededor de la colonia.

Decoloran el azul de metileno y la tinción de tornasol. Reducen los nitratos a nitritos. Son catalasa positivos. No forman indol.

En el laboratorio, las cepas patógenas se clasifican como tales, es decir como Staphylococcus aureus por su capacidad de fermentar el manitol y de coagular el plasma. Son pues características del estafilococo dorado ser manitol positivo y coagulasa positivo.

Las colonias pigmentadas pierden a veces la capacidad de formar pigmento, cambiando de amarillas a blancas sin que esto lleve consigo cambio alguno en el poder patógeno, por lo que es necesario recurrir a las pruebas mencionadas del manitol y de la coagulasa para incluir o no a la cepa aislada en la especie estafilococo dorado.

C) Enterobacterias

Pueden llegar a los cosméticos mediante el personal, el agua, las materias primas, etc. Han sido encontrados en gran variedad de productos para la cara, pies, manos y shampoos líquidos; causan infección en el epitelio, dañando el tracto genito-urinario, conjuntivitis, septicemias, etc. Algunas son resistentes a muchos antibióticos de uso común. Las enterobacterias además causan descomposición de ciertos cosméticos y alteran las propiedades beneficiosas de algunos de ellos, como el caso de los que contienen extractos de proteínas donde ciertos aminoácidos son fácilmente atacados por E.coli, Enterobacterias, Aerógenes, Proteus, etc.

1) Escherichia coli

E.coli es la especie predominante en el intestino grueso; por ello se denomina también "colibacilo", pero también puede causar enfermedades en cualquier otra parte del organismo. Algunas variedades son responsables de la gastroenteritis infantil. Su presencia en el agua indica generalmente la existencia de una contaminación fecal, por lo que las pruebas encaminadas a detectar su presencia son ampliamente utilizadas en los laboratorios de salud pública.

Propiedades generales:

- a) Bacilos gramnegativos
- b) Aerobios
- c) Producen endotoxinas
- d) Fermentan la lactosa con formación de ácido y gas.
- e) Forman Indol
- f) Carecen de cápsula
- g) La mayoría de las cepas son móviles
- h) Carecen de esporas

Propiedades antigénicas y características de cultivo:

Al crecer en caldo, E.coli da lugar a una turbiedad uniforme. La mayoría de estas cepas (aunque no su totalidad) poseen flagelos y por tanto son móviles. Las cepas lisas forman colonias incoloras, convexas y brillantes, pero al ser subcultivadas repetidamente en medio artificial, se convierten en cepas rugosas que forman colonias granulares y opacas. Las variantes encapsuladas producen colonias mucoides, especialmente si son incubadas a baja temperatura, y si crecen en medios con una baja concentración de nitrógeno y de fósforo y una elevada concentración de hidratos de carbono. Las colonias típicas de E-coli son generalmente reconocidas a través de su aspecto característico en ciertos medios diferenciales: estos

microorganismos fermentan la lactosa, y en agar eosina = azul de metileno y agar Endo presentan reflejos metálicos característicos. Sin embargo, existen cepas que fermentan la lactosa tardíamente, de forma irregular, o no lo hacen en absoluto. En agar sangre, ciertas cepas producen una hemólisis β . E.coli produce ácidos y gas a partir de una amplia variedad de hidratos de carbono, pero debe recordarse que existen cepas que fermentan a la glucosa dando lugar a la producción de ácido, pero no a la de gas. En medios que contienen triptofano, E.coli produce Indol y es positiva para el rojo de metilo.

Patogenicidad:

Cualquier variedad de E.coli puede resultar patógena fuera del intestino; se puede encontrar esta bacteria en heridas infectadas, pielitis, o cistitis, y también como factor etiológico de peritonitis y meningitis.

D) Hongos

Los hongos proceden del aire, del agua, de las materias primas tales como: Parafina líquida, petrolato, miristato de isonopilo y aceites hidrogenados; en general de extractos de proteínas, talco, caolín, estearato de zinc, carbonatos de magnesio; algunos como Candida albi-

cans, proceden del personal.

Los hongos patógenos causan infecciones en las uñas, pies, ojos, conductos auditivos externos, bronquitis, - neumonía, aspergilloma, alergia broncopulmonar, endocarditis, etc.

Características generales:

Los hongos han sido tradicionalmente considerados como " semejantes a las plantas". Muchas especies crecen por extensión continua y formando estructuras ramificadas semejantes a yemas. Son inmóviles (excepto los gametos flagelados de algunas especies acuáticas), y sus varedes celulares son muy semejantes en espesor, composición química y estructura ultramicroscópica, a las de -- las plantas.

Los hongos crecen como células únicas (levaduras) o como colonias filamentosas multicelulares (mohos). Las - formas multicelulares no poseen hojas, troncos ni raíces y son mucho menos diferenciadas que las plantas superiores. Sin embargo en comparación con las bacterias, mu -- chas especies de hongos poseen un grado superior de dife --renciación.

Todos los hongos son grampositivos y algunas espe --cies de Nocardia son también ácido resistentes.

Cierto número de hongos no son patógenos para perso --nas sanas, pero pueden serlo en personas que están afec --

tas de diferentes enfermedades (por ejem., linfomas malignos, diabetes grave) y las que han sido intensamente-tratadas con medicamentos antibacterianos de amplio espectro o sometidas a tratamientos inmunosupresores. La mayor parte de las especies de Candida, Aspergillus, Rhizopus y Mucor constituyen este grupo de hongos oportunistas.

1) Candida albicans

C.albicans es dimórfico. En la superficie de los medios sólidos ricos crece como levaduras gemantes ovales, pero cuando lo hace en la profundidad del medio, puede formar hifas, y en los tejidos infectados y muchos cultivos se encuentran característicamente ambas formas. Algunas hifas, pseudohifas, presentan constricciones, y cuando se hallan unidas por los extremos adquieren la forma de salchichas.

C.albicans crece fácilmente en los medios habituales a la temperatura ambiente o a 37°C. En los cultivos en medios sólidos, las colonias recientes se asemejan a las bacterianas, son lisas y cremosas, pero las colonias viejas son grandes y aparecen hundidas y rugosas.

2) Aspergillus

La aspergilosis del oído externo, de los senos nasa

les y de los pulmones es un cuadro bien conocido. En el examen directo del material de esta procedencia, pueden encontrarse fragmentos de hifas acompañadas de pequeñas esporas redondas. El cultivo en medio de Saboraud a temperatura ambiente produce rápidamente colonias blancas - algodonosas, que toman más tarde un color verde más o menos obscuro. El examen microscópico de este cultivo muestra los conidióforos hinchados típicos, que soportan estructuras ensanchadas denominados esterigmas, portadores a su vez, de pequeñas cadenas de esporas.

La aspergilosis es más frecuente en quienes reciben antibióticos o cortisona, o muestran una baja resistencia a las enfermedades, con trastornos como por ejemplo la agranulocitosis.

3) Penicillium

Varias especies de penicillium producen enfermedades de los pulmones y del oído externo.

En agar de Sabouraud a temperatura ambiente, el desarrollo es rápido, produciendo casi siempre colonias verdes aterciopeladas o algodonosas, aunque presentan otros pigmentos. Las preparaciones o los cultivos de Penicillium en portaobjetos muestran, precisamente, un "penicilio" o cepillo característico, con un conidióforo ramificado no extendido. Las ramas pueden mostrar ramas secundarias, en cuyo extremo distal se encuentran este -

rigmas con cadenas de esporas.

Capítulo III

"ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS"

Debido a la presencia de algunos microorganismos en las formulaciones cosméticas ya mencionados en los capítulos anteriores, es importante que los métodos usados para el análisis microbiológico sean efectivos.

Los métodos mencionados en este capítulo, son considerados los más seguros para el examen microbiológico de preparaciones cosméticas.

A) Muestreo y manejo de muestras de materia prima y

producto terminado.

1) Analizar la muestra tan pronto sea posible - después de su llegada, de lo contrario guardar las muestras a temperatura ambiental, no debiendo ser refrigeradas.

2) Examinar las muestras cuidadosamente antes de abrirlas y marcar si hay alguna(s) irregularidad(es) del envase.

3) Limpiar asépticamente la superficie del envase de la muestra con una mezcla acuosa de 80 % de alcohol (V/V) y 1 % de HCl (V/V) antes de abrirlo y remover el contenido. Secar la superficie con una gasa estéril - antes de abrirlo.

4) Usar una porción representativa del contenido Si es posible, unos 10 g (ml) de muestra para el análisis microbiológico. Para productos cuyo peso (volumen) - sea más pequeño de los 10 g (ml), analizar todo el contenido.

5) Si únicamente hay una muestra disponible y -- son necesarios varios análisis, por ejem: Microbiológico, Toxicológico, Químico, tomar la muestra para el análisis microbiológico antes de realizar otro tipo de análisis. En esta situación, la cantidad de submuestra usada para el análisis microbiológico dependerá de los otros análisis que se ejecuten. Por ejemplo, si el total del contenido de la muestra es de 5 ml, usar 1 ó 2 ml para -

el análisis microbiológico y hacer la dilución correspondiente.

B) Preparación de Muestras

1) Equipo y material

Los tipos de Equipo y material necesario para la preparación de muestras y análisis varía con el tipo de formulación o presentación cosmética. La siguiente es una guía de material a usarse en el laboratorio:

- a) Pipetas estériles: 1, 5 y 10 ml. graduadas
- b) Gasas estériles: 4 x 4 vulg.
- c) Solución de 1 % de HCl en 80 % de alcohol
- d) Instrumentos estériles para la preparación de las muestras: Tenazas, o pinzas, tije - ras, bisturí, espátula, y microespátula.
- e) Morteros estériles: Varios tamaños
- f) Botellas de dilución: Conteniendo 90 ml de diluyente.
- g) Balanza: Sensibilidad de 0.01 g
- h) Aceite mineral estéril tween 20 y tween 80
- i) Baño de agua a 45-47°C.

2) Preparación de muestras por categoría de los- productos.

a) Líquidos:

No se requiere una preparación especial de las mues

tras. Adicionar 10 ml de la muestra (si se dispone de ella) directamente a 90 ml del diluyente. Si esta cantidad no es disponible, ajustar el volumen del diluyente a obtener una dilución inicial 1:10, por ejem: 5 ml de muestra adicionados a 45 ml del diluyente.

b) Sólidos y polvos:

Asépticamente remover y pesar una cantidad apropiada de la muestra dentro de un mortero estéril. Lentamente adicionar, 10 ml de tween 20 estéril y mezclar, produciendo una pasta. Adicionar una cantidad apropiada del diluyente a la pasta a obtener una dilución 10^{-1} de la muestra. Mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.

c) Cremas y productos basados en aceite:

Asépticamente remover y pesar una cantidad apropiada de la muestra dentro de un mortero estéril. Adicionar 1.0 ml de aceite mineral estéril y mezclar. Adicionar 1.0 ml de tween 30 estéril. Después de que la muestra formó una pasta, adicionar 4 ó 5 ml del diluyente en porciones de 1 ml hasta formar un homogenado. Lentamente adicionar el resto del diluyente para obtener una dilución 1:10.

d) Aerosoles, de polvos, jabones, líquidos, y otros materiales.

Después de asentizar la boquilla, expeler una cantidad apropiada del producto dentro de una dilución conocida.

e) Independientemente del tipo de cosméticos-

existentes analizados, preparar las diluciones decimales a 10^{-4} .

C) Evaluaciones Microbiológicas

1) Preparación de diluciones

Diluir todas las muestras para análisis por decimales 10^{-1} a 10^{-4} por adiciones de 10 ml de una dilución - previa a 90 ml de diluyente.

2) Cuenta Microbiana Aeróbica total

a) Aparatos, materiales y medio de cultivo:

a') Cajas petri de plástico 15x 100 mm.

b') Pipetas estériles de 1, 5 y 10 ml graduadas.

c') Baño de agua controlado a $45^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

d') Incubadora a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$

e') Agar de soya trinton (TSA)

b) Determinación:

a') Preparar y marcar el marbete en las cajas petri por duplicado para las diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} .

b') Después, mezclar completamente el diluyente con el producto por analizar en las botellas de dilución, pipetear 1ml de cada dilución dentro de cada caja -

petri por duplicado.

- c') Adicionar suficiente TSA fundido (18 - 20 ml a temperatura de 45°C) en cada placa y girar hasta mezclar completamente el inóculo. Después de solidificado el agar, invertir las cajas petri e incubar a 35°C por 48 ó 72 horas.
- d') Contar las colonias encontradas en las placas y registrar los resultados tomando en cuenta cada dilución.
- e') Promediar las cuentas obtenidas, multiplicar por el factor de dilución apropiado y reportar los resultados como Cuenta de placa aeróbica (APC) por gramo (ml) de muestra.

3) Cuenta de placa de Staphylococcus aureus:

- a) Aparatos, materiales y medio de cultivo:
 - a') Cajas petri e incubadora mencionados anteriormente.
 - b') Esterilizar asas de platino (en fuego directo).
 - c') Tubos de vidrio 13 x 100 mm o medidas similares.
 - d') Ágar Vogel- Johnson (VJ)
 - e') Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI)
 - f') Liofilizado de plasma coagulasa de co-

nejo con ácido etilendiamino tetrácetico (ELTA).

b) Determinación:

- a') Transferir alícuotas de 0.5 ml de cada una de las diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} a placas marcadas apropiadamente, por duplicado de agar VJ, previamente templado a temperatura ambiente.
- b') Distribuir el inóculo encima de la superficie con el asa.
- c') Cuando el inóculo fué completamente absorbido por el agar, invertir las placas e incubar por 24-48 horas a 35°C .
- d') Contar las colonias que sean convexas, negro brillante, con o sin una zona - amarilla extendida dentro de la parte-media. Contar las colonias después de 24 y 48 horas de incubación.
- e') De cada placa con crecimiento, escoger una o más de cada una de las colonias-descritas anteriormente. Transferir - las colonias al agar inclinado conteniendo algún medio de mantenimiento conveniente, por ejemplo: TSA. Incubar el inclinado a $35-37^{\circ}\text{C}$ hasta que el crecimiento sea visible.
- f') Dentro de un tubo de 13x 100 mm conte

niendo 0.2 ml de BHI, inocular una cantidad pequeña del crecimiento del tubo inclinado, descrito anteriormente. Incubar 18-24 horas a 35-37°C . Adicionar 0.5 ml de reconstituido de coagulasa plasma de conejo con EDTA y mezclar completamente. Incubar a 35-37°C y examinar si hay grumos o coagulos, a intervalos frecuentes de 1 a 6 horas.

- g') Considerar todos los cultivos obtenidos con una reacción de coagulasa positiva en 6 horas ser Staphylococcus aureus. Con cada serie de pruebas incluir un control conocido de coagulasa positiva y uno de coagulasa negativa.
- h') Calcular el número de S.aureus por determinación de la fracción de colonias analizadas que son coagulasa positiva, multiplicar esta fracción por el número promedio de colonias presentes sobre las placas por duplicado, representadas por las características morfológicas descritas anteriormente. Multiplicar por el factor de dilución apropiado y reportar como el número de S.aureus por gramo (ml) de muestra.

4) Inoculación en caldo enriquecido:

a) Aparatos, materiales y medio de cultivo:

botellas de vidrio con tapa de rosca cont
niendo 90-100 ml de caldo TAT (Tripton-
azolectina tween).

b) Determinación:

a') Inocular 1 ml de las diluciones 10^{-1} a
 10^{-4} adecuadamente dentro de botellas-
membretadas, conteniendo de 90-100 ml-
de caldo TAT.

b') Incubar a 35°C por ≤ 7 días. Examinar
los caldos diariamente por si hay desa-
rrollo. Si hay desarrollo estriar el -
caldo sobre una placa de agar enrique-
cido y una placa de agar MacConkey. -
Incubar las placas a 35°C por 18-24 ho-
ras. (El agar enriquecido puede ser --
agar sangre).

c') Todos los caldos que tengan un desarro-
llo dudoso en 7 días, se les debe ha--
cer la tinción de Gram y estriado como
el descrito en el paso anterior,

d') Muchos productos cosméticos, debido a-
su consistencia o color, causan densa-
turbiedad en el caldo enriquecido y --
por lo consiguiente la determinación -
no puede hacerse por inspección visual

Si esto se presentara, deberá hacerse un subcultivo de 1 ml. del caldo a otra botella conteniendo TAT en dos y cinco días de incubación.

5) Identificación de Bacterias:

Examinar las placas de Agar Mac.Conkey. Las características morfológicas de Escherichia coli sobre medio de agar Mac.Conkey son: Rojo ladrillo, puede estar rodeada de una zona precipitada de bilis. Preparar una tinción de Gram de cada colonia presente de diferente morfología.

E.coli en tinción de Gram son bacilos negativos (coco bacilo).

a) Medio de prueba de movilidad:

- a') Inocular un tubo con medio de prueba de movilidad con una colonia aislada en la superficie del medio.
- b') Incubar aeróbicamente 18-24 horas a 35°C.
- c') Desarrollo desde la línea de estría -- constituye una prueba positiva por movilidad.

b) Examen microscópico:

- a') Inocular una colonia aislada dentro de caldo de triptonsoya u otro caldo enriquecido adecuado.

- b') Incubar aeróbicamente, 18-24 horas a -
35°C.
- c') Colocar una gota de caldo de cultivo -
en un microscopio limpio, deslizar y -
cubrir la gota con un cubreobjetos, cu
yo borde será revestido con una neque-
ña gota de petrolato.
- d') Observar bajo aceite de inmersión para
la movilidad.

Confirmación de Staphylococcus aureus

- a) Inocular lo siguiente con una colonia ais-
lada.
 - a') Agar sal de manitol
 - b') Medio de dextrosa Oxidativo-Fermentatiu
vo.
 - c') TSA, o bien algún medio de mantenimienu
to adecuado para usarlo en la prueba -
de coagulasa.
- b) La mayoría de S. aureus aislados de produc-
tos cosméticos se desarrollará en agar de-
manitol salino, fermentándose el manitol -
(colonias amarillas con zonas amarillas).
- c) Si los aislados no dan reacciones positiu-
vas, deben ser reportados como coagulasa--
negativa, cocos gram-positivo.
- d) Tinción de Gram: Cocos negativos en racimo

Prueba para Salmonella:

En medios de agar Mac.Conkey y S.S. las colonias de 24 horas miden de 2 a 3 mm de diámetro, son circulares convexas, lisas e incoloras, aunque en medio de S.S. pueden mostrar un centro de color negro.

Tinción de Gram: Bacilos negativos (coco-bacilos)

Prueba para Pseudomona aeruginosa:

- a) Inocular una colonia aislada sobre medio de agar cetrimida y otra sobre agar sangre e incubar.
- b) Examinar las placas de agar cetrimida, las colonias de Ps.aeruginosa son generalmente verdosas.
- c) De las colonias sospechosas sobre el medio de agar cetrimida, inocular sobre la superficie de medio de agar de Pseudomonas para detección de piocianina.
- d) Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un mínimo de 3 días.
- e) Examinar la superficie del medio bajo luz ultravioleta. La fluorescencia en luz U.V. es de color azul.
- f) Examinar las placas de agar sangre, colonias grandes, invasoras, con un borde irregular: dan lugar a un pigmento verde o azul verde difusible. En este pigmento se encuentra piocianina.

nina, soluble en cloroformo y agua y, fluorescencia, soluble solamente en agua.

- g) Tinción de Gram: Bacilos o bastones negativos
- h) Otra prueba para confirmar cualquier crecimiento de colonias sospechosas de Ps. aeruginosa puede ser la de la oxidasa; para ello, del medio de cultivo de agar cetrimida se transfieren colonias sospechosas a tiras o discos de papel filtro, que previamente han sido impregnados con dicloro hidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina; si no se produce color rosa que cambie a púrpura, la muestra está ausente de Ps. aeruginosa.

Para verificar el resultado se pueden hacer pruebas Bioquímicas. Ver, más adelante, la tabla I.

6) Cuenta de Placa Aeróbica de Hongos:

- a) Aparatos, materiales y medio de cultivo:
- a') Cajas petri
- b') Incubadora
- c') Agar glucosa de Sabouraud
- b) Determinación:
- a') Transferir alícuotas de 1 ml de diluciones 10^{-1} a 10^{-4} a placas por cuadruplicado, debidamente marbetadas.
- b') Adicionar de 20-25 ml del agar glucosado-

de Sabouraud y girar las placas hasta mezclar completamente el inóculo. Después de solidificar el agar, invertir las placas e incubar la mitad del número de placas a 37°C , el resto a temperatura ambiente por siete días. Revisar las placas diariamente por si hay desarrollo.

c') Examinar las placas:

C.albicans se desarrolla rápidamente, a 37°C ó a temperatura ambiente, formando colonias lisas, brillantes, de un blanco cremoso, con un olor "vinoso" característico.

Aspergillus a temperatura ambiente -- produce rápidamente colonias blancas -- algodonosas, que toman más tarde un color verde más o menos obscuro.

d') Para verificar se puede hacer una tinción y observar al microscopio.

El colorante más útil para este tipo es el azul de algodón de lactofenol. Con una aguja estéril, se recoge del medio una pequeña porción de la colonia, y se pone el material en una gota de colorante sobre un cubreobjetos. Se deja caer un cubreobjetos sobre la go-

ta. El hongo se tiñe de azul intenso y el fondo es azul pálido. Si se quiere, pueden obtenerse preparaciones permanentes sellando los bordes del cubreobjetos con un barniz para uñas.

TABLA I

Rojo de metilo Voges-Proskauer

<u>E. coli</u>	+	-
<u>Citrobacter</u>	+	-
<u>Klebsiella aerogenes</u>	-	+
<u> pneumoniae</u>	+	-
<u>Enterobacter cloacae</u>	-	+
<u>Serratia marcescens</u>	-	+
Grupo <u>Hafnia</u>	d	d
<u>Bacterium anitratum</u>	-	-

d, indica una reacción variable según la cepa.

Características Bioquímicas y otras de algunas Bacterias:

	Indol	Citrato	H ₂ S	Ureasa	Mov	Lactosa	Glucosa	Gelatina	Otras Carac- terísticas
<u>E.coli</u>	+	-	-	-	+	AG	AG	-	
<u>Citrobacter</u>	-	+	+	-	+	AG	AG	-	
<u>Bethesda-Ba- illerus</u>	-	+	+	-	+	Lenta/-	AG	-	
<u>Klebsiella</u>	-	+	-	+	-	AG	AG	-	
<u>"Enterobac- ter cloacae</u>	-	+	-	-	+	AG	AG	Muy len- ta.	
<u>Serratia</u>	-	+	-	-	+	A lenta	A/AG	+	produce pig- mento a 20° C
<u>Hafnia</u>	-	+	+	-	+	Lenta/-	AG	-	
<u>Proteus</u>	Las especies difieren, Todas son positivas a la ureasa								
<u>Ps.acruginosa</u>	-	+	-	d	+	-	A	+	Pigmento
<u>Alc.faecalis</u>	-	d	d	-	+	-	-	-	
<u>Arizona</u>	-	+	+	-	+	A lenta	AG	Muy len- ta.	Negativa al dulcitol
<u>Salmonella</u>	-	+	+	-	+	-	AG	-	
<u>Shigella</u>	d	-	-	-	-	d	A	-	
<u>Providencia</u>	+	+	-	-	+	-	d	-	

D) Formulación de Medios y Preparación de Reactivos y Colorantes.

Se recomienda que los ingredientes usados para preparar los medios sean adquiridos de algún proveedor que, por pruebas comparativas, presente sus productos como satisfactorios en su uso. Los carbohidratos estarán químicamente puros y apropiados para su uso biológico; los químicos inorgánicos serán reactivos graduados, los colorantes estarán certificados. Por conveniencia, hay que usar medios deshidratados de una calidad equivalente a la formulación, a no ser de que esté indicado no usarlos

Determinar la concentración de ión hidrógeno (pH), usando un aparato electrónico estandarizado frente a un buffer conocido, preparado a 50.007 (6). Ajustar el pH cuando sea necesario por adición suficiente de NaOH 1N ó HCl 1 N.

Como una práctica general, se recomienda inocular un determinado control de microorganismos en cada lote de medio. Esto se recomienda especialmente para los empleados en investigación o que están desarrollando nuevos métodos de análisis que dependen de la caracterización bioquímica específica de microorganismos.

1) Agar Sangre:

Suspender 15 g de tripticasa (o trinton), 5 g de -

phytona (o soytona), 5 g de cloruro de sodio, y 15 g de agar en un litro de agua, mezclar completamente. Calentar con frecuente agitación y hervir un minuto para disolver completamente. Meter en autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH final 7.3 ± 0.1 , templar el agar a $46-48^{\circ}\text{C}$. Adicionar 5 % de células de sangre roja de carnero al agar, con la temperatura anteriormente dicha, y mezclar cuidadosamente. Distribuir en cajas petri estériles 15-20 ml por placa, esperar a que solidifique.

2) Caldo Infusión Cerebro Corazón:

Disolver 200 g de infusión cerebro de ternera, 250g de infusión corazón de res, 10 g de proteosa pentona o gelysate, 5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de fosfato disódico(anhidro) y 2 g de dextrosa en un litro de agua, calentar ligeramente si es necesario. Distribuir en botellas o tubos y colocarlos en autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH final , 7.4 ± 0.1

3) Medio de Agar Ceftrimida:

Digerido pancreático de gelatina.....	20.0 g
Cloruro de magnesio.....	1.4 g
Sulfato de potasio.....	10.0 g
Agar.....	13.6 g
Cetil bromuro de trimetilamonio(ceftrimi- da)	0.3 g

Glicerina.....10.0 ml

Agua.....1000.0 ml

Todos los componentes se disuelven en agua y se agrega la glicerina. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH final 7.2 ± 0.2 . Distribuir en cajas petri estériles, 15-20 ml por placa, esperar a que solidifique.

4) Agar citrato (Simmon's)

El medio de citrato de Koser, modificado por Simmons, contiene citrato de Sodio y azul de timol como indicador. La única fuente de carbono en este medio es el citrato. Los microorganismos que utilizan el citrato como fuente de carbono se desarrollan bien y el indicador se vuelve azul. Los demás microorganismos no prosperan y el medio conserva su color verde.

Preparación: Pesar 2 g de citrato de sodio, 5g de cloruro de sodio, 1g de fosfato dibotásico, 1 g de fosfato de amonio, 0.2 g de sulfato de magnesio, 0.08 g de azul de bromotimol y 15 g de agar en un litro de agua, calentar ligeramente con agitación ocasional. Hervir de 1-2 minutos para disolver los ingredientes. Llenar 1/3 de tubos de 13 ó 16 X 150 mm y cubrir para que las condiciones aeróbicas sean mantenidas durante su uso. Meter al autoclave a 121°C por 15 minutos. Dejar solidi

ficar en posición inclinada.

5) Diluyente : MSB diluido con tween 20:

Dissolver 1.7 g de neptona triniticasa, 0.3 g de neptona nhytona, 0.5 g de cloruro de sodio, 0.25 g de fosfato dinotásico y 0.25 g de dextrosa en un litro de agua. Calentar el caldo base y 50 ml de tween 20 por separado a 48-50°C. Mezclar y meter al autoclave a 121°C por 20 minutos. pH final, 7.3 ± 0.1

6) Tinción de Gram:

El método de Gram es el más ampliamente usado en Bacteriología y la mayoría de los microorganismos son clasificados según su reacción a la tinción de Gram.

Soluciones:

Cristal violeta al 0.5 por 100 en agua destilada

Solución yodada de Gram:

yodo 1 g

yoduro de potasio 2 g

agua destilada 300 ml

Alcohol etílico de 70 por 100

Carbolfucsina diluida:

carbolfucsina de Ziehl-Neelsen un volumen, --

agua destilada nueve volúmenes.

Método:

- 1) Se prepara y se fija un frotis (las pelícu - las secadas al aire se fijan por calor suave - sobre flama de un mechero de Bunsen y luego - pasadas a través de ella. Debe tenerse cuida - do para evitar el calor excesivo, que puede - alterar la forma bacteriana. El calor recomen - dable es aquel en que el portaobjetos coloca - do sobre el dorso de la mano se sienta apenas demasiado caliente).
- 2) Se tiñe con cristal violeta durante un minuto y luego se lava con yodo.
- 3) Se aplica como mordiente yodo durante un minu - to más.
- 4) Se decolora con alcohol hasta que ya no escu - rra líquido azul.
- 5) Se lava con agua.
- 6) Se vuelve a teñir con carbolfucsina diluída - durante un minuto.
- 7) Se lava con agua y se seca.

En muchos laboratorios se realizan algunas modifica - ciones a la tinción de Gram, algunas de las cuales se -- anotan a continuación:

Acetona, o un volúmen de acetona con dos volúme - nes de alcohol; es un decolorante mucho más rápido que -- el alcohol etílico de 70 por 100. La decoloración rápida puede ser desventajosa en ciertas bacterias o cuando los microorganismos escasean en el frotis.

Rojo neutro (un gramo de rojo neutro, 2 ml de -- ácido acético al 1 por 100 y 1000 ml de agua destilada). Puede ser utilizado para la tinción de contraste: es ven tajoso para teñir microorganismos intracelulares y no en mascara los crompositivos débiles. Sin embargo, el color que deja este colorante es ligeramente café rojizo, por lo que no resalta tanto como la carbolfucsina diluída.

Safranina (al 0.5 por 100 en agua destilada). Se usa también para la tinción de contraste, pero no tiene ventajas evidentes.

Los siguientes microorganismos comunes son crompositivos, o sea que se tiñen de azul oscuro; estafilococos estreptococos, neumococos, difteroides, ántrax.

7) Medio de Prueba Indol (Ewing):

a) Caldo. Disolver 20 g de peptona y 5 g de cloruro de sodio en un litro de agua. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

b) Prueba de reactivo. Disolver 5 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 75 ml de amilalcohol, y lentamente adicionar 25 ml de HCl. A la prueba para indol, adicionar 0.2-0.3 ml de reactivo a 5 ml de un cultivo de bacterias de 24 horas en caldo de indol. Un color rojo oscuro en la superficie, constituye una prueba positiva para Indol.

8) Medio de MacConkey

Contiene peptona como base nutriente, una sal biliar que impide el desarrollo de microorganismos que no sean entéricos; agar como solidificante, lactosa que es el azúcar que caracteriza al grupo entérico, y rojo neutro como indicador de la fermentación de la lactosa.

Preparación: Suspender 3 g de peptona proteosa - (o polipeptona), 17 g de peptona (o gelysote), 10 g de lactosa, 1.5 g de sales biliares # 3 (o sales biliares-mezcladas), 5 g de cloruro de sodio, 0.03 g de rojo neutro, 0.001 g de cristal violeta, 13.5 g de agar en un litro de agua, y mezclar hasta homogeneidad. Calentar con agitación ocasional y hervir de 1-2 minutos, hasta que los ingredientes se disuelvan. Meter al autoclave 15 minutos a 121°C, enfriar a 45-50°C, y colocar porciones de 20 ml dentro de cada caja petri 15x100 mm. Dejar secar \geq 2 horas con las placas cubiertas. No usar placas húmedas. pH final 7.1 \pm 0.2

9) Agar S.S.

Es semejante al anterior, pero además de una sal biliar, también contiene verde brillante, que impide el crecimiento de los coliformes aunque permite el de Salmonella y Shigella (con la posible importante excepción S. typhosa).

10) Agar Sal de manitol:

Suspender 1 g de extracto de carne, 10 g de proteo-
sa peptona # 3, 75 g de cloruro de sodio, 10 g de D-mani-
tol, 15 g de agar, 0.025 g de rojo de fenol en un litro-
de agua. Mezclar completamente, calentar con agitación-
frecuente y hervir por un minuto. Distribuir y esterili-
zar en autoclave a 121°C por 15 minutos. pH final, 7.4

11) Medio de prueba de Movilidad (medio semisólido)

Suspender 3 g de extracto de carne, 10 g de peptona
(gelysate), 5 g de cloruro de sodio, y 4 g de agar en un
litro de agua. Calentar ligeramente con agitación ocasio-
nal. Hervir 1-2 minutos para disolver. Distribuir en por-
ciones de 3 ml dentro de tubos con tapa de rosca. pH fi-
nal 7.4

12) Gelatina:

La licuefacción de la gelatina por gelatinasa bacteria-
na se reconoce fácilmente empleando discos de gelatina-
con carbón (Oxoid, London, England). Son discos de gela-
tina desnaturizada con formol, que contienen gran can-
tidad de gránulos de carbón. La gelatina desnaturizada
no se licúa a 37°C , de manera que si la incubación se -
acompaña de licuefacción, se debe a producción bacteria-

na de gelatinasa. La licuefacción deja escapar los gránulos de carbón que, con una ligera agitación, se dispersan y ennegrecen el medio. Los discos de gelatina con carbón se colocan en un pequeño volumen (1ml) de agua -- hervida caliente (37°C) que se inocula con el material. La licuefacción a veces no requiere más de algunas horas

13) Medio de prueba Oxidación-Fermentación:

Este medio contiene pentona y azul de timol como indicador. Generalmente se añade glucosa, pero pueden emplearse otros carbohidratos. Los tubos se siembran por picadura, uno de ellos se cubre con petrolato estéril, y el otro se deja expuesto al aire. Este medio permite distinguir entre Oxidación y Fermentación del carbohidrato. Este estudio es importante para identificar el género de un microorganismo.

	Tubo abierto	Tubo con petrolato
Oxidación	Amarillo	Verde
Fermentación	Amarillo	Amarillo

Preparación: Disolver 2g de pentona, 5 g de cloruro de sodio, 0.3 g de fosfato de potasio dibásico, 3 g de agar y 3 ml de azul de bromotimol (solución acuosa al 1%) en un litro de agua. Ajustar el pH a 7.1. Distribuir el medio base en tubos de 13x100 mm, de 3-4 ml por tubo y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Después de la esterilización, adicionar 1 % de carbohidrato (dextrosa, --

glucosa, maltosa, etc.) a cada tubo. (Una solución al 10 % del carbohidrato en agua, esterilizado por filtración, es el conveniente para este propósito). Inocular dos tubos de medio (por picadura) con el cultivo por analizar. Después de la inoculación , adicionar cerca de 10 ml de petrolato fundido estéril o aceite mineral estéril a uno de los tubos. El otro tubo se deja expuesto al aire. Incubar a 35°C y observar diariamente por 3 ó 4 días. Formación de ácido en el tubo abierto, solo indica Oxidación, utilización del carbohidrato, Formación de ácido en los tubos abierto y sellado indica una reacción de fermentación. La falta de producción de ácido en los tubos, indica que el microorganismo existente analizado no utiliza el carbohidrato.

14) Agar glucosado de Sabouraud:

El medio puede comprarse deshidratado en el comercio, su fórmula es la siguiente:

Glucosa.....	40 g
Agar.....	35 g
Peptona.....	10 g
Agua destilada.....	1000 ml

el pH se lleva a 5.5

Si se desea, pueden añadirse 20 unidades de penicilina, 40 microgramos de estreptomycin e 50 microgramos de cloramfenicol para cada ml de medio, cuando la mezcla

ya se ha enfriado pero todavía esté líquida. Los antibióticos impiden el posible desarrollo de contaminantes bacterianos, aunque el pH ácido del medio también ayuda a este respecto. Los medios de Sabouraud con antibiótico que existen en el comercio contienen actidiona (cicloheximida) y cloromicetina (cloramfenicol); pero debe recordarse que estas sustancias inhiben el desarrollo de *Aspergillus* y *Cryptococcus*. El agar maltosado de Sabouraud es otro medio que tiene aplicaciones similares, sin embargo, es aconsejable que se utilice el medio de maltosa o el de glucosa, pero no los dos, pues los pigmentos y la coloración de una colonia de hongos puede diferir según el azúcar del medio.

15) Medio de Agar para Pseudomonas, para la detección de Piocianina.

Exudado pancreático de gelatina.....	20.0 g
Cloruro de magnesio anhidro.....	1.4 g
Sulfato de potasio anhidro	10.0 g
Agar.....	15.0 g
Glicerina.....	10.0 ml
Agua.....	1000.0 ml
pH después de la esterilización 7.2 ⁺ 0.2	

Disolver los componentes sólidos en el agua, antes de adicionar la glicerina. Calentar con frecuente agitación, hervir por un minuto para disolver.

16) Agar-azúcar triple fierro:

a) Medio I : Suspender 20 g de polipeptona, 5g de cloruro de sodio, 10 g de lactosa, 10 g de sacarosa, 1 g de glucosa, 0.2 g de sulfato ferroso, 0.2 g de tiosulfato de sodio, 0.025g de rojo de fenol y 13 g de agar en un litro de agua, mezclar completamente, calentar con agitación ocasional. Hervir por un minuto para disolver los ingredientes. Llenar un tercio de tubos de 16x100 mm tapar con corcho, para que las condiciones aeróbicas sean mantenidas durante su uso. Meter al autoclave a 118°C por 15-17 minutos. Antes de solidificar el medio, colocar los tubos en posición inclinada de tal forma que un extremo sea de 2-3 cm y el otro sea de 4-5 cm, y una inclinación adecuada sea formada en la solidificación. pH final, 7.3 ± 0.2

b) Medio II: Suspender 3 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levadura, 15 g de peptona, 5g de peptona proteosa, 1 g de glucosa, 10 g de lactosa, 10 g de sacarosa, 0.2 g de sulfato de fierro, 5 g de cloruro de sodio, 0.3 g de tiosulfato de sodio, 0.024 g de rojo de fenol, y 12 g de agar en un litro de agua, mezclar completamente, calentar con agitación ocasional. Hervir durante un minuto para disolver los ingredientes. Llenar 1/3 de tubos de 16x150 mm y tapar de tal forma que las condiciones aeróbicas sean mantenidas durante su uso. Meter al autoclave a 121°C por 15 minutos. Antes de solidificar el medio, colocar los tubos en posición in--

clinada como se mencionó anteriormente. pH final 7.3 ± 0.2

Procedimiento: Tomar las colonias sospechosas por medio de una asa de platino para inoculación y pasarlas a un tubo con Medio de agar-azúcar-triple fierro-inclinado. La siembra se hace rayando primero la superficie y atravesándola después con el asa (piqueta). Se incuba. Si se descubre que no hay evidencia de la formación de ácido en los extremos o en los límites del tubo (cambio a color amarillo), con o sin acompañamiento de burbujas de gas debajo de la superficie, de color oscuro, debido a la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) declives en la superficie alcalinos (de color rojo), el resultado es negativo de H_2S (ausencia de *Salmonella*).-- Ver tabla I

17) Agar soya-triptona:

Suspender 15 g de tripticasa (triptona), 5 g de phytona (o soytona), 5 g de cloruro de sodio, 15 g de agar en un litro de agua, mezclando completamente. Calentar con agitación frecuente y hervir por un minuto para disolver completamente. Meter al autoclave 15 minutos a $121^{\circ}C$. pH final 7.3 ± 0.1

18) Caldo soya-triptona:

Suspender 17 g de tripticasa (o triptona), 3 g de phytona (o soytona), 5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de fosfato dinotásico, y 2.5 g de dextrosa en un litro de - agua, y calentar ligeramente para disolver, si es que es necesario. Distribuir dentro de tubos de 16-20 mm de diá- metro, de tal modo que sean 5-8 cm de fondo de caldo. Meter al autoclave por 15 minutos a 121°C. pH final 7.3- ± 0.1

19) Caldo triptona azolectina tween:

Disolver 5 g de azolectina en 500 ml de agua fría. Adicionar 20 g de triptona, 40 ml de tween 80 y 500 ml - de agua. Colocar en un baño de agua a 48-50°C por 30 minutos. Mezclar y ajustar el pH a 7.5 ± 0.1 . Distribuir- y esterilizar por autoclave a 121°C por 20 minutos. pH - final, 7.2 ± 0.1

20) Agar con Urea:

El medio de Christensen contiene glucosa y peptona, que permite el desarrollo de gran variedad de microorga- nismos entéricos, y también urea y rojo de fenol. Los mi- croorganismos que producen ureasa dan lugar a carbonato- de amonio, y el indicador se vuelve rojo.



21) Medio de Agar Vogel-Johnson:

Disolver 10 g de digerido pancreático de caseína, - 5 g de extracto de levadura, 10 g de manitol, 5 g de fosfato dibásico de potasio, 5 g de cloruro de litio, 10 g de glicina, 16 g de agar y 0.025 g de rojo de fenol en un litro de agua. Meter al autoclave a 121°C por 15 minutos, enfriar a 45-50°C. Adicionar 20 ml de una solución estéril de telurito de sodio.

22) Prueba del rojo de metilo:

El microorganismo se cultiva en 5 ml de neptona fosfato de glucosa (Difco, Baltimore, Oxoid), y se incuba cinco días a 30°C. Se añaden entonces al medio cinco gotas de indicador de rojo de metilo (0.1 g de rojo de metilo, 300 ml de alcohol al 95 por 100, y 200 ml de agua destilada). Un color rojo indica una reacción positiva-- (ácida).

23) Prueba de Voges-Proskauer:

Suspender 5 g de fosfato dipotásico, 7 g de poli-- neptona, 5 g de glucosa en un litro de agua, calentar lentamente para disolver. Distribuir en tubos y meter al autoclave a 121°C por 10 minutos.

a) Reactivos prueba:

a') Solución α naftol: Disolver 5 g de α naftol en 100 ml de alcohol absoluto.

b') Solución al 40 % de hidróxido de potasio. Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua a 100 ml.

b) Prueba Voger-Proskauer:

A temperatura ambiente, transferir 1 ml de un cultivo de 48 horas a un tubo con el medio de VP y adicionar 0.6 ml de solución de α naftol (a') y 0.2 ml de solución al 40 % de hidróxido de potasio (b'). Agitar después de cada adición de solución. Intensificar y acelerar la reacción, adicionando 2-3 cristales de creatinina al medio de prueba. Interpretar los resultados 4 horas después de adicionar los reactivos. El desarrollo de un color rosa de eosina indica una prueba positiva VP, debida a producción de acetilmetilcarbinol a partir de glucosa.

E) Límites microbiológicos:

El control del contenido microbiológico en cosméticos es congruente con el control de otros aspectos de calidad y es deseable, para minimizar alguna posibilidad de peligro humano.

Existe una gran discusión sobre si los cosméticos -

pueden o no contener microorganismos sin peligro para el consumidor, y en que nivel es permisible este contenido. Todos están de acuerdo en que ningún cosmético debe contener ninguna cantidad de microorganismos patógenos tales como Salmonella, E.coli, Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus. Sin embargo, este último término no está debidamente aclarado, ya que se pueden presentar -- "patógenos oportunistas", es decir, microorganismos que solo en condiciones especiales muestran estas características. Con respecto al contenido de gérmenes inocuos, -- llamados saprofiticos, Lunnigan propone que cualquier -- preparación que se aplique directamente a la piel humana debe tener un nivel de contaminación de menos de -- 100 microorganismos por gramo. Tenenbaum por su parte -- opina que para considerar el grado de contenido microbia -- no que debe ser controlado en cosméticos, debe tomarse -- en cuenta para que y como son usados. Que la prepara -- ción de cosméticos estériles es costosa y resulta inútil si se toma en cuenta que la piel contiene varios millares a varios millones de St.epidermidis por centímetro cua -- drado en la región de la axila, que el cuero cabelludo -- contiene una basta flora incluyendo levaduras y hongos, -- que la piel contiene de varios cientos de C.acné por cen -- tímetro cuadrado y que la saliva contiene normalmente -- millones de gérmenes por mililitro. Esta misma opinión -- la comparten Jungermann, Wallhousser y Most entre otros

La Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexica

nos y la Farmacopea XIX de los Estados Unidos no contienen límites microbianos para cosméticos o productos de perfumería y únicamente la CTFA (The cosmetic, toiletry and fragrance Association) publicó en 1973 unos lineamientos para límites microbianos en productos cosméticos y de tocador. El comité (CTFA) está basado en recomendaciones sobre:

- 1) El grado variable del riesgo potencial relativo al uso designado.
- 2) En los estándares existentes o recomendaciones para productos de otras áreas por ejemplo: Alimentos y Farmacéuticos.
- 3) En conocimientos de factores ambientales,
- 4) Límites microbiológicos de las compañías:
- 5) Variación inherente en pruebas microbiológicas.

Mientras un estándar es una regulación administrativa con la fuerza de ley, un límite es una sugerencia de un número máximo aceptable de microorganismos, determinado por métodos prescritos. La guía de la CTFA se preparó para ofrecer ayuda a los fabricantes para juzgar la calidad microbiológica de sus productos. Los límites no son el único criterio para la aceptabilidad: el fabricante deberá tomar en cuenta la naturaleza específica de su producto, estableciendo criterios microbiológicos para su seguridad.

Los cosméticos y artículos de tocador usados por el

público, en general no son y no necesitan ser fabricados en condiciones estériles. Por consiguiente, los microorganismos establecidos en el medio ambiente en general, - en las materias primas, y demás componentes pueden ser - incorporados en el producto durante la fabricación; por ello es importante que las materias primas, componentes y lote procesado sean manejados y almacenados en buenas condiciones, para impedir la proliferación microbiana.

La CIFA recomienda que las compañías examinen sus productos, particularmente los envasados en su contenido microbiano sobre bases específicas. El programa tomará en cuenta materias primas, producto en proceso, y el crecimiento potencial que soporta cada preparación, designará procedimientos microbiológicos convenientes en productos específicos, periódicamente examinará los procedimientos de fabricación, interpretando los resultados

Los límites no son el único criterio, y el fabricante deberá tomar en cuenta la naturaleza específica del producto, estableciendo criterios microbiológicos. Por ejemplo, contar con una simple muestra puede ser un límite muy severo. Cuentas en porciones de un lote puede mostrar aún grandes variaciones, por lo que el fabricante deberá considerar tales variaciones para establecer criterios propios de la compañía. Materias primas de origen natural (Vegetales o minerales), pueden contener un número considerable de microorganismos inocuos. Cuando se sobrepasa el límite es responsabilidad del fabri-

cante satisfacerse así mismo que el producto no represente un peligro para el consumidor.

El fabricante tiene la responsabilidad de hacer un producto adecuadamente preservado. La preservación adecuada para el producto deberá ser determinada por pruebas apropiadas durante el desarrollo del producto.

Los límites recomendados para los diferentes tipos de cosméticos, están basados en un procedimiento de cuenta en placa estándar, el cual es un método para determinar el contenido microbiano.

Criterios específicos:

Productos para bebé:

no más de 500 microorg. por gramo o por ml.

Productos usados alrededor de los ojos:

no más de 500 microorg. por gramo o por ml.

Producto orales:

no más de 1000 microorg. por gramo o por ml.

Todos los demás productos:

no más de 1000 microorg. por gramo o por ml.

Un método de cuenta en placa, aceptable para un producto en particular, puede permitir el crecimiento y detección del desarrollo de microorganismos. La ausencia de microorganismos dañinos puede ser determinado por la identificación de colonias emitidas en placas usando medios selectivos apropiados, los cuales ya se han mencionado anteriormente.

En general, para realizar el análisis microbiológico-

co correspondiente y establecer estándares microbiológicos, se deben considerar los siguientes factores:

- A) Cuenta total de bacterias, incluyendo hongos y levaduras.
- B) Naturaleza de la flora microbiana
- C) Naturaleza de la materia prima
- D) Naturaleza del producto final.

Capítulo IV

"PRINCIPALES METODOS DE ESTERILIZACION EN MATERIA PRIMA- Y COMPONENTES PRIMARIOS"

Primero se definirá Esterilización y Ausencia, para después describir los principales métodos de esterilización.

La esterilización es definida como la completa destrucción o eliminación de la vida microbial, y sus formas de resistencia.

El término aséptico indica un proceso controlado o condición, en el cual el nivel de contaminación micro--

bial se reduce al grado de que los microorganismos pueden excluirse de un producto durante su procesamiento. - Esto puede definirse también como un "aparente" estado estéril.

Los individuos seleccionados para llevar a efecto los procedimientos de esterilización deben de estar completamente enterados tanto del grado de efectividad como de las limitaciones de cada uno de los procesos de esterilización, ya que dichos procesos pueden tener efectos perjudiciales o nocivos sobre el material que se va a esterilizar.

Los microorganismos exhiben una resistencia variable a los procedimientos de esterilización. El grado de resistencia varía con el organismo específico. En consecuencia las esporas, la forma que conservan ciertos organismos durante condiciones adversas, son más resistentes que las formas vegetativas de un organismo. Por lo tanto, las condiciones requeridas para un proceso de esterilización deben planearse para que sean efectivas a las esporas resistentes de los microorganismos encontrados normalmente.

Los procesos de esterilización se dividen en dos grupos:

A) Procesos Físicos de Esterilización:

1) Métodos térmicos

El calor constituye un método de destrucción para los microorganismos. La efectividad del calor es dependiente del grado o intensidad con que es aplicado, el período de exposición de los materiales a esterilizar y la humedad presente. Dentro de la escala de temperatura de esterilización, el tiempo requerido para producir un efecto mortal es inversamente proporcional a la temperatura empleada, y la temperatura requerida está inversamente relacionada a la humedad presente.

Los métodos térmicos pueden ser de dos tipos: aquellos que se efectúan por el calor seco y aquellos por calor húmedo.

a) Esterilización por calor seco

Las sustancias que resisten la degradación a las temperaturas aproximadas a 140°C (284°F) pueden esterilizarse por medio de calor seco. La exposición a una temperatura de 180°C (356°F) durante dos horas o, cerca de 45 minutos a 260°C (500°F), normalmente elimina bien tanto esporas como formas vegetativas de todos los microorganismos.

Este proceso se lleva a cabo en esterilizadores diseñados específicamente para este fin, que son calentados por medio de electricidad o de gas, llamadas estufas y hornos.

El tiempo de exposición y a la temperatura que se -

utiliza son específicos para cada producto: cuando la na turaleza de este lo permite, se alarga el primero, como medida de seguridad, para compensar las diferencias durante el tiempo de calentamiento y para disminuir otros factores que pueden afectar el ciclo de esterilización. Este ciclo de tiempo total normalmente incluye un período razonable para que el material alcance la temperatura de esterilización de la estufa y una apropiada retención de la misma para lograr una adecuada esterilización y fi nalmente un período de enfriamiento para que el material regrese a la temperatura ambiental.

La cuenta del tiempo del período de exposición empe zará después de que la estufa haya alcanzado la temperatura de esterilización. Esto hace que una estufa normalmente sea cargada con el material que se va a esterilizar cuando esté a la temperatura ambiente, período que no se considera para empezar a contar el tiempo de exposición.

La elevación de la temperatura requerida para la es terilización por calor seco tiene efectos adversos sobre muchas sustancias. Los materiales de celulosa empiezan a quemarse, muchos productos químicos se descomponen a estas temperaturas, las gomas se oxidan rápidamente y los materiales termoplásticos se funden; por lo tanto, este método se destina casi siempre para cristalería y material metálico, para aceites anhidros y productos químicos que soportan altos valores de temperaturas sin de-

gradarse.

La ventaja que da este método de esterilización es el estado anhidro que se logra para proveer de material seco, tanto de vidrio como de metal, al final de un ciclo adecuado de calentamiento.

El material de laboratorio que se esteriliza por calor seco se envuelve previamente en papel (cuando se trata de frascos, matraces, tubos de ensayo, etc.), y se tapa con torundas de algodón, cubriéndolas con papel de estaño para evitar la contaminación.

Finalmente, es de mencionar que el empleo de calor seco para esterilizar es menos eficiente que el calor húmedo, por lo cual en este método se usan temperaturas más altas y períodos de exposición más largos que en el de Vapor bajo Presión.

b) Esterilización por Calor húmedo o con Vapor bajo presión.

El calor húmedo es un medio más efectivo que el calor seco para la esterilización térmica.

El calor húmedo causa la coagulación de las proteínas de las células a una temperatura mucho más baja que el calor seco, por lo que la capacidad térmica del vapor es mucho más grande; consecuentemente, el objeto a esterilizarse se calienta más rápidamente por vapor.

Este proceso se lleva a cabo en los aparatos llama-

dos Autoclaves, los cuales emplean vapor saturado bajo -- presión. Se utiliza en la mayoría de los casos en que el producto o material para esterilizar resiste la humedad y la temperatura elevada, característico de este tipo de esterilización.

La temperatura con la que se opera en autoclave es -- generalmente de 121°C . El calor húmedo también se usa para procedimientos de esterilidad a baja temperatura, --- 100°C (212°F). Se mide con un termómetro situado en la línea de descarga del vapor del aparato, y se verifica un registro permanente de la misma, en cada ciclo de esterilidad.

Antes de iniciar el proceso, el operador debe estar seguro que todo el aire ha sido desalojado de la cámara del autoclave por medio del vapor, lo cual permitirá la salida del mismo a través de una válvula abierta, durante el tiempo que sea necesario, hasta que la corriente sea-- continua.

La densidad del vapor es más baja que la del aire, -- por lo que el vapor entra a la cámara del autoclave y asciende a la cabeza, desplazando aire hacia abajo. Los objetos pueden colocarse en la cámara con espaciamentos -- adecuados para una buena circulación del vapor alrededor de cada objeto, y de esta manera el aire es desplazado hacia abajo y afuera de la línea de descarga de la cámara, -- Cualquier trampa de aire, como el que se queda en contenedores con orillas y fondos continuos o en paquetes de en-

voltura estrecha, atajan o evitan la penetración del vapor a estas áreas y, por lo tanto, impiden la esterilización. El vapor, para ser efectivo, debe estar íntima y completamente en contacto con todas las superficies a ser esterilizadas.

Las esporas y las formas vegetativas de una bacteria pueden ser destruidas efectivamente en un autoclave durante un tiempo de exposición de 20 minutos a 15 libras de presión (121°C) (250°F) o durante 3 minutos a 27 libras de presión a 132°C (270°F).

El tiempo de exposición varía también con la naturaleza del producto y con el tamaño y tipo de los envases de que se trate. Los intervalos de tiempo de exposiciones decir, que sean cortos o largos, están basados sobre la suposición de que el vapor ha alcanzado el hueco más profundo del material que se va a esterilizar, y además en que dicha temperatura se mantiene hasta la fase final de dicho período.

En general, se acepta que el método de esterilización térmico más seguro y de confianza es el uso de calor húmedo o con vapor bajo presión; por lo tanto, este método deberá emplearse siempre que sea posible.

La esterilización por calor húmedo es también aplicable al equipo y suplementos tales como tapón de goma o caucho, material de vidrio y otro equipo en asociación con goma o caucho.

El inconveniente de este método es que generalmente-

el material esterilizado no queda completamente seco, → por lo que se puede secar en una estufa de vacío antes de su uso.

2) Métodos No térmicos:

a) Esterilización por luz ultravioleta.

La luz ultravioleta se emplea normalmente para ayudar a la reducción de la contaminación aerobia, y para proteger las superficies estériles dentro del procesamiento en el medio ambiente.

Cuando la luz ultravioleta pasa a través de la materia, se libera energía a las órbitas de los electrones dentro de los átomos constituyentes. Esta energía absorbida causa un estado energizado muy alto de los átomos y altera su reactividad. Cuando tal excitación y alteración de la actividad de los átomos esenciales ocurre dentro de las moléculas de los microorganismos o de sus metabolitos esenciales, el organismo muere o es incapaz para reproducirse; es por esto que algunos investigadores han visto que los efectos principales sobre el metabolismo de microorganismos, a causa de la absorción de energía ultravioleta, reside en los ácidos nucleicos celulares.

La efectividad germicida de la luz ultravioleta es una función de la intensidad de la radiación y del tiem-

no de exposición. Esto también varía con la susceptibilidad del organismo. Cuando la intensidad de la radiación, se incrementa, el tiempo requerido para un efecto letal decrece y viceversa. Dicha intensidad puede ser medida por medio de un metro especial de luz que contenga un fototubo sensible a una longitud de onda de 2573 \AA .

Algunos ejemplos de lo anterior son los siguientes:

Microorganismos	Energía (Micro-watts-seg/cm ²)
<u>Bacillus subtilis</u>	11,000
Esporas de <u>B. subtilis</u>	22,000
<u>Escherichia coli</u>	6,000
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	10,000
<u>Sarcina lutea</u>	26,000
<u>Staphylococcus aureus</u>	6,600
<u>Aspergillus niger</u>	330,000

La intensidad de radiación es de 2537 \AA , necesaria para la destrucción completa de los microorganismos anteriores.

Sin embargo, también se ha mostrado que los organismos expuestos a las radiaciones ultravioleta pueden algunas veces recuperarse; esto suele suceder debido a la variación del pH del medio, o a la exposición a la luz visible después de la exposición a las radiaciones ultravioleta.

Para conseguir un mayor efecto por este método, se recomienda mantener las lámparas de luz ultravioleta libres de polvo, grasa y raspaduras; su instalación requiere de una cuidadosa planeación para una mayor eficiencia.

El personal presente en áreas donde haya luz ultravioleta deberá estar protegido tanto de rayos directos como de rayos reflejados, ya que dichos rayos causan teñido de rojo de la piel e intenso dolor e irritación de los ojos.

El uso de la luz ultravioleta es principalmente, para su efecto germicida, sobre superficies o para su efecto penetrante, a través de aire limpio y agua; las lámparas son frecuentemente instalados en cuartos, ductos de aire y equipo grande donde las radiaciones atraviesan e irradian el aire y logran llegar a las superficies.

b) Esterilización por radiaciones ionizantes.

Las radiaciones ionizantes son de alta energía, emitidas por isótopos radiactivos tales como Cobalto 60 y Cesio 137 (rayos gamma) o producidas por aceleración mecánica de electrones o muy altas velocidades y energía (rayos catódicos y rayos beta):

Los rayos gamma tienen la ventaja de ser de absoluta confianza y seguridad, pero tienen el inconveniente de que debido a su origen radioactivo es relativamente difícil conseguirlos.

Los aceleradores de electrones, que es la otra fuente de radiación, tiene también la ventaja de suministrar una dosis alta y uniforme en su velocidad de rendimiento pero tienen también el inconveniente de proveer de electrones con poco poder penetrante y su uso requiere minucioso control de las variables que afectan la eficiencia de la esterilización, tales como la energía del electrón, la corriente del mismo, la amplitud de su recorrido y el tiempo de exposición.

Sin embargo, los aceleradores de electrones son frecuentemente más empleados para la esterilización por irradiación.

Las radiaciones ionizantes destruyen los microorganismos por la detención de su reproducción como un resultado de mutaciones letales. Estas mutaciones son efectuadas por una transferencia de radiaciones de haces energéticos a moléculas receptoras en su trayectoria. Pero también se pueden hacer indirectamente, en la cual el agua de las moléculas se transforman en entidades altamente energizadas (Iones hidrógeno e hidroxilo) llevando por todos lados cambios de energía en ácidos nucleicos principalmente; de esta manera eliminan la disponibilidad para el metabolismo de la célula bacterial.

Las esporas bacteriales y virus, que generalmente son 4 ó 5 veces más resistentes que a una bacteria vegetativa, se eliminan con una dosis de 2.0 a 2.5 megarads, dosis que generalmente se administra cuando ya se ha de

terminado el grado de contaminación.

Los electrones pueden usarse para esterilizar productos selectos por un proceso continuo, no en todos. -- Los procesos continuos de esterilización requieren de un control, exacto, así como de que no haya lapsos momentáneos para garantizar una esterilización efectiva.

Esta técnica es conveniente para productos sensibles al calor, envasados y sellados herméticamente y su aplicación es limitada por los efectos potenciales de las radiaciones sobre la estabilidad de los productos y sobre sus envases.

La esterilización efectiva sin consecuencias adversas ha sido alcanzada para la administración de plásticos endurecidos y un gran número de vitaminas, antibióticos y hormonas en estado seco.

c) Esterilización por Filtración

La filtración es un método no térmico que se utiliza para esterilizar soluciones selectas sensibles al calor y consiste en la separación física de los microorganismos que las contaminan; para ser efectivo lo anterior los filtros que se utilizan deben a la vez de remover los microorganismos de la solución, permitir el paso de todos los componentes deseados en dicha solución, es decir, sin alteración substancial en la composición del líquido.

Función: Los filtros remueven los microorganismos por un proceso de "malleo" y los retienen en su superficie, por entrambamiento en las rendijas del filtro o por efectos electrostáticos. En contraste con otros procedimientos de esterilización, la filtración elimina los microorganismos "in situ".

Para que lo anterior sea efectivo, la medida del poro debe ser lo suficientemente pequeña para prevenir que los microorganismos en movimiento pasen a través del filtro. El diámetro de los poros usados para la esterilización segura o confiable de una solución por un filtro de membrana es aproximadamente de 0.2 micrones. Los filtros usados pueden ser clasificados en dos tipos: el tipo permanente (re-utilizables), tal como la tierra de diatomeas, vidrio sintético, o porcelana sin vidriar; y el tipo desechable tal como las almohadillas o cojinetes de asbestos o membrana de éster celulósico. Los filtros-re-utilizables pueden ser usados repetidamente sin destrucción y son, por lo mismo, menos costosos; pero en necesario rasparlos con el uso, para, de esta manera, tener la seguridad de que están limpios perfectamente y que no ocurra la contaminación cruzada de naturaleza química, por lo que es muy recomendable reservarlos para usarlos únicamente con un tipo de solución.

En contraste con los anteriores, los filtros desechables son descartados después de usarlos, y no hay problema de limpieza con el medio mismo del filtro; no obs-

tante el mango y el soporte para el filtro deben ser limpiados completamente después de cada uso.

La solución para esterilizar se pasa a través del filtro y se recibe en un recipiente esterilizado, aplicando presión positiva sobre ella, o succión del lado del filtrado. Se debe evitar el exceso de presión, tanto positiva como negativa, ya que es perjudicial para la esterilización, sin olvidar que la filtración prolongada favorece a la contaminación.

Los filtros que se utilizan son 6 principalmente: - Cojinete de asbestos disponible, Membrana de éster celulósico, Membrana de policarbonato, Re-utilizable Bujías o velas de tierra de diatomeas, Velas o discos de vidrio incrustado, Velas de porcelana sin vidriar.

Los filtros de membrana son los más recomendados, ya que tienen menos problemas de manipulación y su velocidad de flujo es mayor.

En general, las membranas de policarbonato de celulosa son más resistentes que las de nitrato de celulosa.

Además de los filtros ya mencionados, se utilizan también los materiales plásticos, tales como el cloruro de polivinilo, nylon, teflón, y metales incrustados, entre ellos el acero limpio y plata, particularmente cuando se necesitan características de alta durabilidad.

B) Procesos Químicos

1) Esterilización por medio de gas

Algunos productos sensibles al calor pueden ser esterilizados exponiéndolos a los gases.

El gas esterilizador no es nuevo. Los gases tales - como el formaldehído y el dióxido de azufre han sido usados para esterilizar por muchos años.

Estos gases son, sin embargo, altamente reactivos - químicamente, por lo que su uso es limitado.

Los nuevos gases, el óxido de etileno y β propiolactona, tienen pocas desventajas, por lo que asumen un importante lugar en el área de esterilización. Sin duda, - es una ventaja para los materiales plásticos y para responder a la necesidad de un método práctico de esterilización, el haber desarrollado uno basado en el uso de -- los agentes gaseosos esterilizadores, particularmente el óxido de etileno.

La esterilización con gases nace de la necesidad de esterilizar una gran cantidad de materiales u objetos -- que no pueden ser sometidos ni al calor, ni a las radiaciones.

Actualmente, dadas las ventajas que la esterilización con gases ofrece, se le ha empleado también en la esterilización de materiales u objetos susceptibles de - ser esterilizados por otros métodos.

Algunas de estas ventajas son las siguientes:

- Se efectúa a temperatura y humedad relativa bajas

- Los esterilizantes gaseosos llegan a lugares donde no llegan los esterilizantes líquidos.
- La gran difusión de algunos de estos gases a través de materiales plásticos, de papel, de telas, etc., elimina el problema de eliminar al agente esterilizante, y en algunos casos, permite la esterilización de productos dentro de sus propios envases o empaques.
- Con algunos gases la esterilización se lleva a cabo aún en presencia de grandes cantidades de materia orgánica.
- Como cámaras esterilizantes se puede hacer uso de equipos simples, tales como bolsas de plástico, y de hule, etc.

a) Esterilización con Oxido de Etileno

El óxido de etileno, es un éster cíclico y un gas a temperatura ambiente; sólo es altamente inflamable, y -- dentro de una amplia gama de concentraciones forma mezclas explosivas en el aire. Este inconveniente se supera empleando mezclas adecuadas de óxido de etileno con gases inertes tales como dióxido de carbono, hidrocarburos fluoroclorados, nitrógeno, bromo, etc.

Las mezclas de este tipo más empleadas son las siguientes:

Carboxide	10% óxido de etileno 90% dióxido de carbono	Unión Carbide
Cartos o Etox	10% óxido de etileno 90% dióxido de carbono	Fa. Dagesh, Ffm.
Oxyfume 20	20% óxido de etileno 80% dióxido de carbono	Unión carbide
Steroxide 20	20% óxido de etileno 80% dióxido de carbono	Wilmot Castle Co.
Sterivit-Gas	12% óxido de etileno 88% dióxido de carbono	Fa. Sterivit, Mainz
T-Gas	90% óxido de etileno 10% dióxido de carbono	Fa. Dagesh, Fim.
Freoxide	10% óxido de etileno 90% freón 12	
Cry Oxide	11% óxido de etileno 79% Freón 11 10% Freón 12	Beh Benue Labs.
Cry Oxide (Benvicide)	11% óxido de etileno 54% Freón 11 35% freón 12	Pennsylvania Engi- neering.
Oxifume	12% óxido de etileno 88% freón 13	Unión Carbide
Steroxide 12	12% óxido de etileno 88% freón 12	Wilmot Castle

La proporción de óxido de etileno respecto al gas - inerte se recomienda sea menor de 17 %.

Propiedades de algunas de estas mezclas:

Oxido de etileno-dióxido de carbono 10:90

Es la que ha permanecido durante más tiempo en el mercado; es barata, de relativamente baja toxicidad para el hombre, no es corrosiva ni dañina para la mayoría de los materiales, no deja olor ni sabor, su densidad es una y media veces mayor que la del aire, lo que favorece su penetración en grietas y rendijas en equipos, envases y empaques. Su acción no es particularmente rápida.

Oxido de etileno-dióxido de carbono 20:80

Es una mezcla de precio medio, no corrosiva ni dañina para los materiales. Se prefiere en muchos casos a la anterior debido a que su mayor concentración de óxido de etileno, permite tiempos de exposición más cortos. Es una mezcla ligeramente más peligrosa que la anterior.

Oxido de etileno-dióxido de carbono 90:10

Es una mezcla de gran potencia esterilizantes, debido a su alta concentración de óxido de etileno, pero tiene el inconveniente de ser una mezcla explosiva en la que la pequeña proporción de dióxido de carbono reduce sólo débilmente la inflamabilidad del óxido de etileno.

Estas mezclas se introducen, generalmente ya formadas, al espacio donde se va a llevar a cabo la esterilización o la fumigación, para evitar riesgos y obtener re

sultados satisfactorios.

Oxido de etileno-hidrocarburo halogenado 11:89

Es una mezcla de baja toxicidad para el hombre, no corrosiva y no daña para la mayoría de los materiales, sus propiedades penetrantes son excelentes. Permite tener presiones relativamente bajas tanto en los recipientes en que se almacena como en la cámara de esterilización. Sus propiedades esterilizantes son magníficas, ya que aún a presiones relativamente bajas la concentración de óxido de etileno es alta, reduciéndose así el tiempo de exposición.

Oxido de etileno-hidrocarburo halogenado 12:88

Esta mezcla presenta las mismas propiedades que la mezcla anterior.

Actividad:

El óxido de etileno es capaz de matar a un gran número de microorganismos aeróbicos grampositivos y gramnegativos, así como de bacilos esporulados aeróbicos y anaeróbicos.

Philips y Kaye, en su revisión a este respecto, reportan una larga lista de microorganismos para los cuales es letal este gas. (B. globiggi, Staphylococcus aureus, Micobacterium Phlei, Gaffkya tetragena, Serratia marcescens, Eberthella typhosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli).

Isao Shibasaki ha publicado una revisión de los -- efectos del óxido de etileno sobre Escherichia coli, -- Streptococcus, Staphylococcus aureus, Clostridium, B. anthracoides, Flavobacterium, Mycobacterium.

Botto reporta la completa destrucción de A. niger, - Mucor después de una exposición de 3 horas a 24°C y 140 mg por litro de óxido de etileno.

Proceso de Esterilización

La esterilización con óxido de etileno generalmente involucra el uso de un autoclave modificada. El material que se va a esterilizar se coloca en la cámara, previamente calentado cerca de 55°C (131°F), y a un vacío inicial de aproximadamente 27 pulgadas de mercurio.

Enseguida se introduce una humedad relativa de 50 a 60 % para un período de cerca de 60 minutos. Bajo estas condiciones se introduce la mezcla de óxido de etileno a la presión requerida que da la concentración deseada de óxido de etileno, la cual es mantenida por todo el período de exposición.

siguiendo un período de exposición de 6 a 24 horas, dependiendo del grado de contaminación y de la penetración del material, el gas se agota a un vacío de aproximadamente 25 pulgadas y se detecta fácilmente.

El aire que se introduce a la cámara se filtra, para alcanzar la presión atmosférica nuevamente, después *

de la esterilización.

Se usa un precalentamiento de la cámara para disminuir el tiempo requerido para el proceso de esterilización, y se ha visto que una temperatura de 55°C (131°F) no tiene efecto adverso en muchas sustancias.

Se ha encontrado que la humedad ejerce un efecto significativo en dicho proceso, y se ha demostrado que una humedad relativa de no menos del 30 % favorece una rápida reducción de la actividad bacterial. Se ha mostrado también, por medio de estudios que los microorganismos deben ser hidratados, si estos van a ser eliminados por óxido de etileno dentro del tiempo usual.

La humedad introducida dentro de la cámara del esterilizador junto con el gas puede no hidratar adecuadamente al microorganismo; la humedad debe ser absorbida por el material circundante y después penetrar al microorganismo. Es, por lo tanto, recomendable que una humidificación del período de residencia o estancia sea la primera etapa en cada ciclo de esterilización, como una ayuda en la distribución y absorción de la humedad del material para esterilizarse. La humedad relativa recomendada para este período de estancia es de 55 a 60 %.

Todo lo anterior pone en claro que un control inadecuado de humedad es uno de los problemas que contribuyen al fracaso de la esterilización con óxido de etileno.

Mecanismo de Acción y Aplicación.

Se piensa que el óxido de etileno ejerce un efecto letal sobre los microorganismos por una alquilación esencial de los metabolitos, afectando particularmente el -- proceso de reproducción. Dicha alquilación probablemente ocurre por el reemplazo de un hidrógeno activo en un grupo sulfhidrilo, amino, carboxilo o hidroxilo por un radical hidroxietilo. De esta manera, el metabolismo es alterado por lo que el medio no es favorable para el microorganismo y muere sin reproducirse.

La esterilización con óxido de etileno en la Industria Farmacéutica y Cosmética generalmente se limita a -- polvos secos, pues la alquilación que desarrolla el método puede intervenir en moléculas de sustancias activas de los productos a esterilizar, particularmente líquidos

Su uso se ha extendido a materiales de plástico, hu- les e instrumentos ópticos delicados, así como para limpiar equipo de acero.

La efectiva penetrabilidad del óxido de etileno ha- ce posible la esterilización de productos que se distri- buyen en empaque de cartón o plástico, como los produc- tos parenterales.

b) Beta-propiolactona

La beta-propiolactona es una lactona cíclica, es un

líquido no inflamable a temperatura ambiente, tiene una presión de vapor baja; sin embargo, se ha visto que es un agente bactericida contra una amplia variedad de microorganismos a concentraciones bajas.

Es un agente alquilante y, por lo tanto, actúa contra los microorganismos de una manera similar al óxido de etileno. Es efectiva a una concentración de vapor de aproximadamente 2 a 4 mg/lt, a una temperatura menor a 24°C (75°F) y a una humedad relativa de no menos de 70 % con un período de exposición de 2 horas mínimo. La penetrabilidad del vapor de la Beta-probiolactona se ha encontrado pobre; por lo tanto, su principal uso es para la esterilización de superficies en grandes espacios tales como cuartos completos.

c) Proceso aséptico

Un proceso aséptico es técnicamente un método no estéril; sin embargo, sus fines se involucran con los procesos de esterilización, pues el término es aplicado a las técnicas que llevan a cabo manipulaciones bajo condiciones cuidadosamente diseñadas y controladas para prevenir la entrada de microorganismos a un producto; es utilizado en materiales que no pueden ser esterilizados terminalmente, esto es, esterilizarlos después de que han sido sellados en el envase final.

Capítulo V

"CONSERVALORES Y SU IMPORTANCIA"

El conservador de un cosmético deberá preservarlo - de la contaminación secundaria y de acuéllas contamina-- ciones primarias normales.

Independientemente de los métodos sanitarios de fa- bricación, un producto deficientemente preservado ofrece muchas oportunidades a la infección microbiana.

Como se dijo antes, una emulsión de aceite en agua- con pH de 7-8 que contenga no-iónicos suministra un po-- tencial especialmente adecuado al crecimiento pseudomoná

dico. Los preservativos que restringen el crecimiento son los bien conocidos fenólicos, parabenos, bisfenoles, organometales y ácidos orgánicos.

Algunos no iónicos inactivan la acción bacteriostática de los bisfenoles. El producto comercial Tween 80, por ejemplo, es un antídoto más efectivo que el suero sanguíneo para nulificar las propiedades antibacterianas de esos compuestos. Los estudios han demostrado que la aeruginosa es capaz de crecer en soluciones y dispersiones de surfactantes no-iónicos del tipo tween y puede dividir los enlaces de éster de esos agentes.

Se determinó, mediante un estudio de 35 no-iónicos y 26 preservativos, que los surfactantes no-iónicos disminuyen la eficiencia de todos los preservativos cuando la proporción de surfactantes a preservativos pasa de ciertos niveles críticos.

Las emulsiones del tipo agua en aceite son relativamente resistentes a los ataques de la Pseudomónada natural, ya que la fase continua de aceite actúa como barrera a la penetración del organismo en la fase acuosa e impide que el crecimiento se esparza por el sistema. Sin embargo, los rasgos que evitan la invasión también demoran la actividad microbiana de los conservadores de modo que una emulsión de agua en aceite, aún cuando es más difícil de contaminar, también parece ser más difícil de preservar.

Los factores que afectan la actividad de los preserva

vativos son los que controlan también su accesibilidad en la fase acuosa, en particular el coeficiente de partición de aceite en agua del preservativo, la proporción fase/volumen y la temperatura. Los compuestos antimicrobianos con elevados coeficientes de partición de aceite en agua a menudo se concentran en la fase oleosa con cantidades insuficientes presentes en la fase acuosa para inhibir el crecimiento microbiano.

En el proceso de preservación de un producto con frecuencia se pasa por alto la calidad nutritiva de la formulación. Los productos cosméticos y farmacéuticos a menudo fluctúan entre simples soluciones a base de agua hasta sopas con alto contenido de proteínas. Cada ingrediente añade o quita parte del crecimiento del producto y, desde luego, el potencial de crecimiento mismo es un agente primario que influye en la facilidad o dificultad de la preservación, ya que un producto sin nutrientes es más fácil de preservar que otro que los contenga. Los "ingredientes mágicos" que ahora aparecen en muchas formulaciones pueden, ocasionalmente, ser nutrientes que estimulan el crecimiento de microorganismos y obstruyen la acción de los preservativos.

Los requisitos que debe cumplir un agente conservador o una mezcla de conservadores ideales son los siguientes:

- A) Efectivo a bajas concentraciones contra una amplia variedad de microorganismos.

- B) Soluble en la formulación y compatible con -- otros ingredientes de la fórmula.
- C) Toxicológicamente aceptable a las concentra - ciones usadas y además a las mismas concentra - ciones no debe producir irritación o sensibi - lización.
- D) Que sea total o ligeramente inodoro e incolo - ro-
- E) Activo y estable en una amplia gama de pH y - temperatura.
- F) Fácil y económico de formular en el producto.

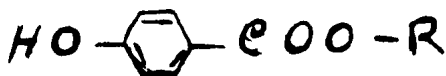
Para cada producto hay un sistema de conservación - que es el mejor y deberá elegirse tomando en cuenta su - capacidad bactericida y el tiempo de actividad; que siem - pre será preferible a una capacidad bacteriostática. Eva - luando la capacidad conservadora específica, sobre algu - nos gérmenes que se consideran totalmente indeseables al cosmético y la capacidad alérgica o fotosensibilizado - ra que pueda presentar.

A) Diferentes tipos de conservadores

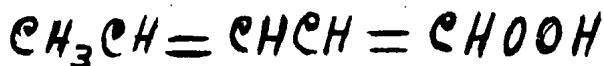
Se han utilizado una gran variedad de sustancias - como conservadores en cosméticos de los cuales se men - cionarán algunos a continuación, junto con sus propieda - des más importantes.

1) Derivados del ácido p-hidroxibenzoico

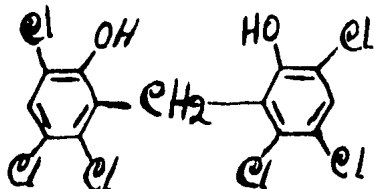
Son bacteriostáticos y fungistáticos, poco solubles en agua; más efectivos en pH ácido. Forman complejos -- emulsificantes no-iónicos.

2) Acido Sórbico

Activo contra hongos, efectivo a pH ácido, forma - complejos con emulsificantes no-iónicos, se presta para formar compuestos con otros conservadores incluso con an tibióticos.

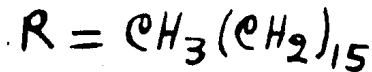
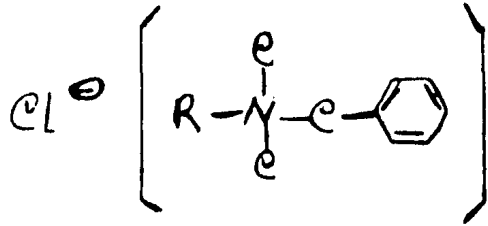
3) Hexaclorofeno

Activo contra bacterias Gram (+), poco soluble en - agua, actualmente prohibido en varios países.

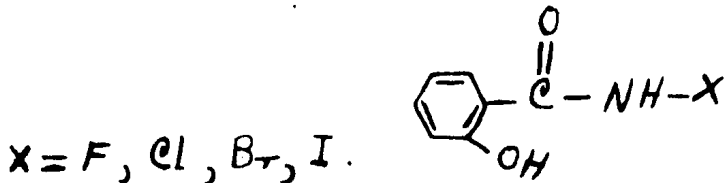


4) Compuestos cuaternarios de Amonio

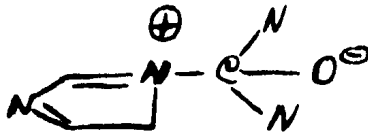
Incompatibles con algunos ingredientes: activos contra bacterias gram positivas y negativas; pero no contra todas las Pseudomonas. Ejemplo: Cloruro de cetil-dimetil bencil, amonio.

5) Salicilamidas halogenadas

Son fotosensibilizadoras, activas contra hongos.

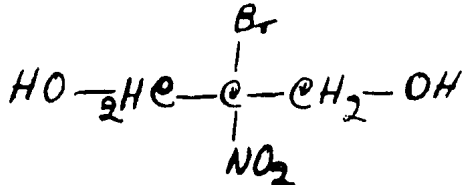
6) Imidazolidin-Urea (Germall 115)

No tóxico, no irritante, de amplio espectro: de efecto sinérgico con otros conservadores. Solubles en agua y activas a un pH de 4 a 9.

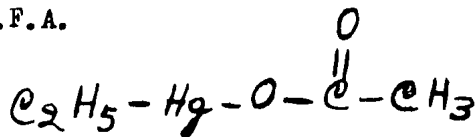


7) 2, Bromo-2 nitropropano 1,3 diol (Brononol)

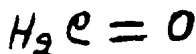
Muy efectivo, actúa a pH bajo; efectivo contra bacterias Gram (-). No tóxico y no es incompatible con emulsi-
sificantes no-iónicos: es más estable a pH ácido y neu-
tro.

8) Compuestos Orgánico-mercuriales

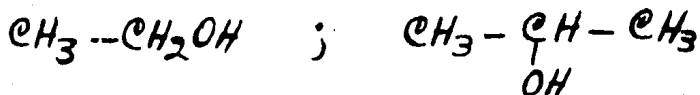
Son fuertemente tóxicos, se han prohibido últimamen-
te por la C.F.F.A.

9) Formaldehído

Es efectivo contra hongos, pero es de poca duración
por ser volátil e irritante y puede ser incluso alérgeni-
co.

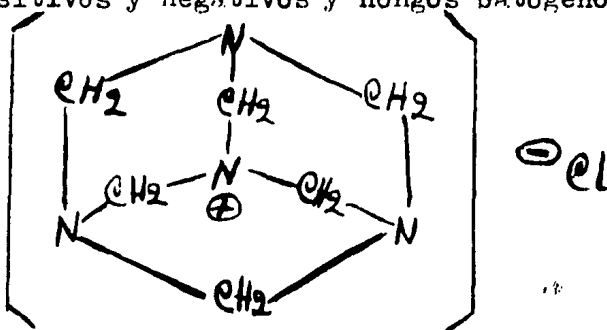
10) Alcoholes Etilico e Isopropilico

Son muy efectivos a las concentraciones adecuadas, -
mayores del 15 %, actúan a un rango de pH entre 4 y 9.



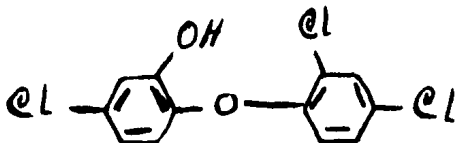
- 11) Derivados de Hexameten-tetra-amina (Dowicil 200).

Su actividad es independiente del pH y de los no-iónicos de la formulación. Es particularmente efectivo contra *Pseudomonas*; no fotosensible, no tóxico, efectivo -- contra Gram positivos y negativos y hongos patógenos. Es muy soluble.



- 12) 2,4,4-Tricloro 2-hidroxifenil éter (Triclosan o Irgazan).

Bacteriostático, activo contra Gram positivos y negativos; poco tóxico. También actúa sobre hongos dérmicos, etc.



B) Clasificación y Niveles de Concentración de Conservadores en Cosméticos.

Grupo I: FENOL

Niveles de Concentración %

	Como: <u>Antiséptico</u>	<u>Conservador</u>
1. Paraben esterés		0.3-0.05
2. Fenol		1.0-0.20
3. Cresol (o.m.p.)		1.0-0.20
4. Timol		1.0-0.10
5. o-fenil-fenol		0.3-0.05
6. Butil-hidroxitolueno		0.5-0.05
7. Butil-hidroxianisol		0.5-0.05

Grupo II: FENOL HALOGENO

1. Hexa-clorofeno	2.0-0.10	0.1-0.01
2. Diclorofeno	2.0-0.10	0.0-0.01
3. Bromo-clorofeno	1.0-0.25	
4. Triclosan	2.0-0.10	
5. Bi-timol	2.0-0.25	
6. Tri-bromosalan	2.0-0.01	
7. Fluorofeno	2.0-0.25	
8. p-cloro, m-xilol(PCMC)		0.3-0.10
9. Di-cloro, m-xilol(DCMA)		0.3-0.10

Niveles de Concentración %

	Como: <u>Antiséptico</u>	<u>Conservador</u>
10. p-cloro, m-cresol (PCMC)		0.3-0.10

Grupo III: HALOGENOS

1. Triclorocarban (TCC)	2.0-0.25	
2. Clorofucarban	2.0-0.05	0.05-0.01
3. Triclorobutanol		0.80-0.25
4. Cloracetamida		0.40-0.15
5. Captan	2.0-0.25	
6. Cloramina T	0.5-0.20	

Grupo IV: ACIDOS

1. Acido Benzoico		0.25-0.10
2. Acido Sórbico		0.25-0.10
3. Acido Salicílico	2.0-0.25	0.25-0.10
4. Ac. Undecílico y sus derivados	2.0-0.25	

Grupo V: <u>FORMALDEHIDO</u>	0.2-0.00	0.20-0.03
------------------------------	----------	-----------

Grupo VI: MONOMEROS DEL FORMALDEHIDO

Niveles de Concentración %

	Como: <u>Antiséptico</u>	<u>Conservador</u>
1. Hexamina		0.50-0.10
2. Imidazolidin-Urea		0.50-0.02
3. Hidroximetil, dimetil hidantoina		0.50-0.05
4. Dovicill 200		0.10-0.02
5. Bronopol		0.50-0.02
6. Bronidox		0.50-0.02

Grupo VII: ORGANO-MERCURIALES

1. Componentes Fenil-mercurícos		
-Acetato		0.005-0.002
-borato		
-nitrato		
2. Timersol (Merthiolate)		0.005-0.002

Grupo VIII: COMPONENTES AMONIO-QUATERNARIOS

1. Cloruro de N-cetil-piri dinio.	2.0-0.2	0.02-0.02
--------------------------------------	---------	-----------

Grupo IX: OTROS ANTIMICROBIANOS

Niveles de Concentración %

Como: <u>Antiséptico</u>	<u>Conservador</u>
1. Dimetoxano	0.50-0.07
2. Clorhexidina	0.50-0.07
3. Omadina (hidroxiviridi tionato) 2.0-0.2	
4. E.D.T.A.	0.10-0.005
5. 2, fenoxi-metanol (fenoxetol)	1.00-0.500

C) Factores que influyen en la actividad de los Conservadores.

Son diversos los factores a cuya influencia están sujetos los conservadores; a continuación se mencionan los más importantes.

1) Concentración del agente conservador.

Es determinante la concentración a la que se utiliza el conservador y en consecuencia la determinación de la "Concentración efectiva" en el producto terminado.

2) Solubilidad

El conservador debe ser soluble en el vehículo que-

se emplee, cuando se trata de soluciones.

Para estar seguros de la efectividad del germicida se debe uno asegurar de su homogeneidad en el medio, disolviéndolo en la fase acuosa.

3) Coefficiente de partición

El coeficiente de partición del antimicrobiano en la fase acuosa y oleosa cuando se desee formular una emulsión es de vital importancia para mantener la concentración necesaria en la interfase aceite/agua.

En sistemas emulsificantes, el coeficiente de partición puede afectar la actividad del conservador de las siguientes formas:

- Por disociación constante del conservador
- Por cierta cantidad de conservador no disociado entre las fases del producto.
- El pH del producto.
- Volúmenes relativos entre las fases
- Concentración mínima no disociada del conservador en la fase acuosa necesaria para la acción conservadora.

Solo una fracción molecular no disociada del conservador tiene la forma de agente químico, el cual conserva la acción germicida mientras que la porción ionizada no es penetrada por los microorganismos.

4) Relación Estructura-Química-Estabilidad

Hay que tomar en cuenta la estabilidad que posea la estructura química del conservador que se está formulando; el pH del producto cosmético y el carácter ácido-base del antimicrobiano. Evaluando todo esto, se podrá diseñar un sistema de conservadores apropiado.

Hay un gran número de productos químicos que son inestables a ciertos pH, (por ejem. Bronopol a pH mayor de 7, se descompone en derivados bromados y formaldehído) o son inferiores en actividad cuando la concentración de iones hidrógeno es lo suficientemente baja para que el contenido de antimicrobiano esté presente como anión (inactivo) en su mayoría y menor cantidad de moléculas no disociadas, como en el caso de Ácidos orgánicos y fenoles.

5) Efecto de los Surfactantes

Se pueden encontrar cuatro tipos de agentes activos surfactantes en productos que requieren conservación y son Aniónico, Cationico, No iónico, y Anfótero, siendo las cargas respectivas de la porción activa, las siguientes: negativa, positiva, sin carga y con ambas dependiendo del pH.

Se sabe que algunos de los compuestos aniónicos son sinérgicos, ejemplo, los antisépticos, unos más que --

otros.

Algunos surfactantes aniónicos son Germicidas y -- otros son bacteriostáticos.

6) Calidad Microbiológica de las materias primas

El contenido microbiológico existente en las mate-- rias primas y en los materiales de empaque influirá en la actividad del conservador ya que, a mayor número de microorganismos contaminantes, más tiempo tomará el conservador en dar cuenta de ellos a un nivel arbitrario ba-- jo, por ejemplo menos de 100 ger/ml , ya que hay reaccio-- nes típicamente químicas o físicas entre las moléculas del conservador y los microorganismos, en las que el con-- servador puede ser afectado por excesiva contaminación-- microbiana. La contaminación microbiana masiva puede so-- brepasar cualquier siste,a conservador practicable.

7) Tipo de Formulación Cosmética

Dependiendo de cual sea el tipo de formulación, los cosméticos serán más o menos susceptibles de contamina-- ción.

Las soluciones acuosas y emulsiones aceite/agua, -- son las más propensas al crecimiento rápido de microorga-- nismos.

Las bacterias prefieren un alto contenido de agua,--

en general, por encima del 15% y la fase acuosa continua de una emulsión o/w permite un esparcimiento más fácil - que la fase discontinua de la emulsión w/o.

Los cosméticos anhidros también se deben proteger, - pues por lo general no se encuentran exentos de agua.

Algunos tipos de microorganismos prefieren un medio alcalino, como las bacterias, mientras que otros requieren de un medio ácido como los hongos y las levaduras.

8) Combinación de Conservadores.

El efecto esterilizador rápido que se requiere en - productos cosméticos puede obtenerse por altas concentra- ciones de un conservador o por combinaciones binarias y - terciarias de agentes antimicrobianos. Esto último resul- ta recomendable teórica y prácticamente, ya que la conta- minación comprende a menudo gran variedad de microorga- - nismos de diferente susceptibilidad a un solo conserva- - dor y la combinación proporciona un espectro de activi- dad más amplio.

Si la concentración de un conservador no puede au - mentarse por razones de solubilidad o toxicidad, es reco - mendable el uso de sistemas binarios o terciarios con me - nor riesgo de irritación o alergia.

Algunas de las combinaciones que dan mejor resulta- do son las siguientes:

1. Metilparabeno + Propil parabeno.

2. Bronopol + Omadina de Na (2-Diol, hidroxipiridionato de sodio).
3. MLNH (Hidroximetil-dimetil-hidantoína) + Omadina de sodio.
4. Preservativo 68 + Formol.
5. Vancidina 89 + Fenoxetol.
6. Formol + Metilparabeno + Propil parabeno
7. Germall 115 + Metilparabeno + Propil parabeno
8. Bronopol + Propilparabeno + Metilparabeno

Dichas combinaciones son activas dentro de un amplio margen de pH , en concentraciones mínimas y funcionan en productos no-iónicos y aniónicos.

9) Inactivación por incompatibilidad

Se ha estudiado ampliamente la incompatibilidad de algunos conservadores con componentes químicos diversos. Aunque se trata de inactivación, esta no es absoluta y más bien se trata de reducciones de la actividad microbiana por factores tales como pH, coeficiente de distribución entre fases, solubilización del conservador por efecto de emulsificantes, unión a superficies macromoleculares no activas y a materiales de empaque.

Por lo general son más activos para gérmenes Gram positivos a pH neutral o alcalino y contra Gram negativos a un pH más o menos de 4.

Cuando se presenta en concentraciones bajas el ni--

vel de inhibición estimula el metabolismo bacteriano.

Los antisépticos o germicidas cuaternarios son cationicos. Mientras que la carga de un antiséptico anfótero depende del pH del medio, es cationico a pH ácido y aniónico a pH alcalino.

D) Mecanismo de Acción de los Conservadores

Los conservadores son considerados como métodos químicos mediante los cuales una sustancia química puede inhibir o destruir microorganismos bajo condiciones normales de formulación, fabricación, almacenamiento y usos. Generalmente un simple agente inhibidor a grandes concentraciones puede ser germicida.

Los preservativos interfieren con el crecimiento microbiano, multiplicación o metabolismo, por alguno de los siguientes mecanismos:

1. Modificación de la permeabilidad de la membrana celular.
2. Acción enzimática competitiva en algunas proteínas celulares.
3. Oxidación o Reducción de los constituyentes celulares.
4. Hidrólisis.
5. Interferencia con sus metabolitos esenciales (Deaminación, descarboxilación, fosforila --

ción, difosforilación).

Posible mecanismo de acción de algunos conservadores muy conocidos:

Conservador

Mecanismo de Acción

- | | |
|-------------------------|--|
| 1. Ac. Benzoico | Acción a nivel de membrana, competencia con coenzimas. |
| 2. Ac. Bórico | Inhibición de enzimas fosfato. |
| 3. Ac. Dehidroacético | Inhibición del sistema ciclofosforasa en anaerobios. |
| 4. Parahidroxibenzoatos | Igual que el Ac. Benzoico. |
| 5. Ac. Salicílico | Acción a nivel de membrana, competencia con coenzimas y con el metabolismo de aminoácidos. |
| 6. Fenoles | Acción en la membrana. |
| 7. Ac. Monocloroacético | Acción a nivel de membrana. |
| 8. Ac. Sórico | En organismos catalasa post-oxidación supresiva del fumarato. |
| 9. Cuaternarios | Acción lítica en la membrana |
| 10. Sulfitos | Inactivación de puentes -S-S- en porciones proteínicas y enzimas. |

ConservadorMecanismo de Acción

- | | |
|-----------------|--|
| 11. Formol | Reacciona con la porción proteica de las enzimas dependiendo del pH y de los grupos -SH. |
| 12. Alcoholes | Acción en la membrana. |
| 13. Mercuriales | Reaccionan formando mercaptanos. |

E) Reducción de la Actividad Antimicrobiana (causas)

Se ha determinado que algunos polímeros grandes con propiedades mucilaginosas (gomas) inactivan a los conservadores, Ejem. goma de tragacanto, PVP, metilcelulosa y carboximetil. celulosa, ya que en una solución de Carbovol 934 al 2 % conteniendo 0.2 % de Nibagin como conservador es posible el crecimiento de Aspergillus niger.

También se afirma, en trabajos muy serios, que las sales neutras obtenidas por deshidratación favorecen la inactivación de fenol polímeros; la presencia de alcohol incrementa la tendencia a la formación del complejo. El complejo formado por el conservador y el no-iónico es un compuesto inactivo.

Las propiedades no iónicas del solvente están determinadas por la formación de las micelas e incorporan el conservador a las mismas. El conservador se ve involucra

do en unas reacciones de equilibrio lipofílico-hidrofilo y la formación de la micela.

Algunos autores han estudiado la actividad antimicrobiana de los metil, etil, propil y butil para hidroxibenzoatos y han determinado que dicha actividad disminuye en presencia de tween 20, cuando se usa disuelto en la formulación, mientras que el grado menor de actividad es diferente para cada éster, el grado de solubilidad de la concentración antifúngica es aproximadamente constante en el parahidroxibenzoato y este valor es pequeño en el p-hidroxibenzoato con el menor número de átomos de carbono (metilo); el agente es fácilmente soluble en la fase acuosa y fuera de la micela posee gran eficiencia.

Algunos complejos inactivos llegan a formarse gracias a un puente de hidrógeno, el cual se une a la micela; esto ha sido comprobado por métodos cromatográficos con los que se ha detectado el nuevo compuesto formado entre los dos materiales.

La presencia de propilén glicol arriba del 5 %, y alcohol etílico arriba del 12 % al lado de perfume o aceites esenciales, tienden a inactivar al conservador.

1) Antagonismo

En el caso de conservadores, la acción antagónica será la que los inactive o bloquee en su acción bactericida o bacteriostática. Algunas proteínas reaccionan di-

rectamente con cuaternarios de amonio, derivados fenólicos, mercuriales, parabenos y formaldehídos antagonizándolos.

Macromoléculas, tales como gelatinas, metilcelulosa, silicatos, etc. tienen la capacidad de complejar parabenos y derivados de amonio cuaternarios.

El grado de inactivación o también de activación -- del conservador depende, entre otros factores de la naturaleza y concentración del tensoactivo, fuerza iónica -- del medio y la presencia de no-electrolitos; pues como -- ya se vió anteriormente, todos estos factores afectan directamente al conservador.

El material de empaque como: goma, plástico y en especial polietileno provocan una lenta migración del -- agente antimicrobiano hacia las paredes del envase, de -- tal forma que este no cumple con su función.

2) Sinergismo

En conservadores, el sinergismo potencializa la -- acción preservativa del conservador; además, al emplear -- mezclas de antimicrobiano se garantiza la acción siner -- gística de algunos conservadores como salicilanilidas, -- omadina de zinc y cloruro de -- cetilviridinio con aceites -- saborizantes, (tales como citral, lonalol, timol y euca -- liptol para enjuagues bucales por ejemplo). Es intere -- sante mencionar que la adición de etanol, propilenglicol

u otros polioles ayudan a evitar la inactivación de los conservadores no iónicos alcoxilados.

3) Otros factores

Como ya se había mencionado, algunos de los conservadores más usados tienen ciertos inconvenientes o desventajas que deben considerarse antes de ser usados; a continuación se mencionan los casos más comunes:

1. El formaldehído puro es muy activo contra bacterias gram positivas y gram negativas y levaduras, pero no es recomendable debido a su alta reactividad química con muchos componentes de los cosméticos, es incapaz de acción sostenida y la potencialidad existentes es muy grande.

2. Los conservadores ácidos (sorbico, benzoico, dehidroacético, etc.), solo son efectivos a pH bajo y son de moderada actividad.

3. Los conservadores con un hidrógeno activo pueden formar complejos con otros compuestos, principalmente macromoléculas como polímeros y compuestos etoxilados; ^mevitando a inactivarse; tal es el caso de los parabenos que abarcan un amplio margen de actividad, pero pueden ser inactivados por diversos compuestos de la for

mulación.

Se utilizan con compuestos que potencializan su acción o combinados entre sí.

4. Los bis-fenoles, tales como el hexaclorofeno, fluorofeno, bromoclorofenos y otros; tienen excelente actividad antimicrobiana contra Gram (+), exclusivamente y pueden emplearse en una amplia gama de pH de 4 a 9.

5. Germall 115 (imidazolidin-urea): Es de buena actividad contra las bacterias y moderada contra hongos y levaduras, pero se puede utilizar combinado con parabenos y otros germicidas ya que es sinérgico.

6. Los derivados de amonio cuaternarios son más efectivos a pH mayor de 5.0 exclusivamente.

Aunque todos los artículos que se refieren a conservadores mencionan los posibles incompatibilidades con los componentes más comunes, el gran número de parámetros que determina esta acción hace recomendable que se pruebe definitivamente en el producto, antes de desechar o aprobar un conservador.

F) Evaluación de la actividad Antimicrobiana

La única prueba concluyente de la actividad de un conservador es la que se realiza en el producto mismo y a las concentraciones a las que va a ser usado en la práctica.

Hay en cosméticos una prueba muy completa en la que se trata de someter al conservador a condiciones especialmente drásticas para determinar su eficacia. Se le conoce como "Prueba del reto o de la exigencia" (challenge test) y consiste en preparar una muestra del producto final e inocularla con diferentes clases de microorganismos, para ver si el conservador es capaz de evitar la contaminación.

La Farmacopea Mexicana, la Farmacopea Americana, la CIFA, La Sociedad de Químicos Cosmetólogos de Inglaterra y numerosos autores han propuesto diferentes formas de realizar esta prueba. Con objeto de hacer un análisis crítico de las diferentes modificaciones, se revisará paso por paso la prueba, haciendo las observaciones pertinentes.

1. Tipo de Microorganismo

La farmacopea Mexicana y la Americana recomiendan como microorganismos de prueba Ps.aeruginosa, E.coli, St.aureus, C.albicans, y A.niger; la CIFA adiciona P.lyteum y B.subtillis y la SCQ considera que deben usarse cepas aisladas de productos contaminados. Se discute la

ventaja de usar cultivos tipo (ATCC) especialmente sensibles, en lugar de cepas resistentes aisladas de productos contaminados. Cowen y Steiger han encontrado que microorganismos aislados de un producto no crecen en otro con el mismo conservador y por otro lado si se quiere obtener resultados reproducibles, se debe establecer con exactitud contra que gérmenes debe hacerse la prueba. No hay duda de que todas las pruebas pueden modificarse por alguna razón, lo que se tiene que decidir es si es posible obtener resultados satisfactorios sin complicar el método de tal forma que resulte prácticamente inaplicable.

2. Medio de Cultivo

La resistencia de un microorganismo depende de la calidad del medio en que se desarrolla; algunos proponen usar detergentes para dar resistencia, hacer crecer Pseudomonas en agua, agregar agentes antimicrobianos del producto en baja concentración en el medio de cultivo para conservarlos. Generalmente se usan medios de Soya-Caseína, agar nutriente o medio de Sabouraud.

3. Inóculo simple o mezclado.

En virtud de que se ha reportado que cuando se inoculan mezclas de microorganismos son más susceptibles, =

se recomienda inocularlos a partir de cultivos puros.

4. Tamaño de Inóculo

La Farmacopea Mexicana y la Americana recomiendan - 0.1 ml de un cultivo conteniendo de 125 000 a 500 000 mi croorganismos por ml. a 20 ml de la muestra por valorar. Otros recomiendan cultivos conteniendo hasta 10 millones de gérmenes por ml. pero hay que tener en cuenta que entre más se agregan, aumenta el número de células resis - tentes al mismo tiempo de que se va inactivando el con - servador.

5. Temperatura de Incubación

Varios autores recomiendan de 32-37°C para bacte -- rias y de 27-32°C para hongos. Hay que tener en cuenta - que estas temperaturas no son típicas y, aunque favore - cen el crecimiento, es posible que el efecto del conser - vador sea diferente, por lo que se recomienda que la in cubación se haga a temperatura ambiente. La Farmacopea - Mexicana recomienda 30-32°C y la Americana 20-25°C en ca so de que el producto no traiga especificada temperatu - ra de almacenamiento.

6. Concentración de Conservadores

Para las pruebas en que se trata de establecer el nivel adecuado de conservador, se recomiendan concentraciones variables en proporción geométrica.

7. Número de inoculaciones

La Farmacopea Mexicana y la Americana utilizan una sola inoculación inicial, la CIFA recomienda una segunda con 7 días de intervalo y la SCQ varía según el producto pero recomienda dos. La ventaja de la inoculación múltiple es que previene de la inactivación del conservador con el tiempo, debido a reacción con ingredientes, con el empaque, o con materiales extraños.

8. Método de muestreo

El método para analizar las muestras generalmente es el de placa, aunque puede usarse el de tubo múltiple; es importante agregar agentes neutralizadores del conservador, para que la prueba sea efectiva.

9. Duración de la prueba

En la Farmacopea Mexicana y Americana recomiendan 28 días con dos observaciones con una diferencia de 7 días entre una y otra, la CIFA recomienda también 28 días con observaciones a 0, 1, 2, 7, 14 y 23 días y la-

SCQ recomienda observaciones a 0, 1, 2, 3, 4 y hasta 8 - semanas según el producto. La importancia de este dato - es que algunos conservadores son solo bacteriostáticos, - además de que ciertas especies en ocasiones disminuyen - mucho su concentración para luego recuperar su viabili-- dad.

10. Criterio de Efectividad

La Farmacopea Mexicana y Americana consideran un -- conservador como apropiado para productos de uso oftálmico o parenteral si no hay aumento apreciable en el número de microorganismos C.albicans y A.niger y si el número de microorganismos vegetativos es reducido a 0.1% cuando más del número inicial y permanece bajo ese nivel durante 7 días, dentro del período de 28 días de la prueba. La CIFA exige cuentas reducidas después de la segunda inoculación y la SCQ que la cuenta sea cero en los -- shampoos durante dos semanas, en cremas y lociones cuentas reducidas en 3 pruebas semanales y en cosméticos para los ojos esterilidad en 16 horas.

Capítulo VI

"PARTE PRACTICA"

Análisis Microbiológico de:

- A) Materia Prima
- B) Equipo de Manufactura
- C) Medio Ambiente
- D) Producto en proceso
- E) Producto envasado
- F) Materiales de empaque

A) Materia Prima

Se analizaron tres materias primas representativas de su origen: Vegetal, Animal y Mineral, y considerando que son usadas en una gran gama de cosméticos. Aparte se analizaron muestras de agua, por ser una de las materias primas más importantes en la elaboración de cosméticos.

a) Aceite de Coco (Vegetal)

A temperatura ambiente es de un color blanco. Es -- muy empleado en la fabricación de jabones para tocador y para afeitarse, preparaciones para afeitar, debido a su abundante espuma. En los últimos años se ha hecho muy popular como un shampoo "emulsificado" (después de la saponificación con potasa); además por su aplicación a la piel, debido a su rapidez para broncear.

b) Aceite de Castor (Animal)

Es un importante ingrediente en la fabricación de - lápices labiales, no sólo por su acción como solvente -- parcial de la eosina, sino por impartir una apariencia aterciopelada, que no es obtenida con otra substancia.

Entre los cosméticos en que se utiliza el aceite de castor están: removedor oleoso de cutícula, barniz para uñas, lociones, lociones para el cuero cabelludo, reseco,

adhesivo para pelucas, rubores en gel,quita esmalte de uñas etc.

c) Talco (Mineral)

Es un silicato hidratado de magnesio cuya fórmula es $H_2Mg_3Si_4O_{20}$. El mejor talco es de color blanco (usualmente el italiano) , mientras que los grados inferiores son grises. Las muestras deben tener un "desliz" comparable con el polvo del ácido bórico, pero con una apariencia no muy lustrosa. La prueba final de un buen talco es la del HCl. La solubilidad de la muestra en este ácido no debe exceder al 4 %. Estas cualidades son necesarias para que el talco actúe como un perfecto lubricante y preventivo de irritación. Además, de existir un exceso de solubilidad en el HCl, determina que el talco cause deterioro de la mayoría de los perfumes empleados en polvos de tocador y talcos desodorantes, así como la decoloración de maquillajes, rubores compactos y sombras para los ojos entre otros productos a los que se adiciona talco en diferentes proporciones

d) Agua

Como ya fué descrito anteriormente, el agua es de gran importancia como materia prima, además como solvente, para limpiar y enjuagar.

El agua es ampliamente utilizado en la fabricación de cosméticos en re los cuales se pueden citar: Removedores de cutícula, colonias, perfumes, acondicionadores de cabello, shampoos, cremas depilatorias, tintes para cabello, preparaciones para afeitar, maquillajes compactos y en polvo, rubores, antiperspirantes en barra, etc.

El manejo, preparación y análisis de las muestras - fué realizado de acuerdo al capítulo III "ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS" (págs.41-56), por lo que sólo - se darán los resultados obtenidos.

a) Aceite de coco

Cuenta total aeróbica de bacterias	10 Col/g Gram (+)
Cuenta total de hongos y levaduras	0 Col/g
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	negativo
<u>Escherichia coli</u>	negativo

b) Aceite de castor

Cuenta total aeróbica de bacterias	20 Col/g Gram (+)
Cuenta total de hongos y levaduras	0 Col/g
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	negativo
<u>Escherichia coli</u>	negativo

c) Talco

Se analizó el talco sin esterilizar y el esterilizado con Oxido de etileno.

	<u>Talco sin Est.</u>	<u>Esterilizado</u>
C.T. aeróbica de bacterias	40 Col/g	0 Col/g
C.T. de hongos y levaduras	200 Col/g	0 Col/g
Tinción de Gram	(+)	-
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	negativo	-
<u>Escherichia coli</u>	negativo	-

B) Equipo de Manufactura

Las muestras fueron analizadas antes y después de sanitizarlas con vapor y son las siguientes:

- a) Manguera de transferencia de agua
- b) Contenedor de **materia prima**
- c) Equipo mezclador de shampoos

Para el muestreo se hizo pasar agua estéril por el equipo, y ésta se analizó posteriormente.

Antes de Sanitizar

	Col/ml		
	a)	b)	c)
C.T.A. de bacterias	100	50	20

	Col/ml		
	a)	b)	c)
C.T.de hongos y levaduras	0	0	0
Tinción de Gram	(+) (-)	(+)	(+)(-
<u>Staphylococcus aureus</u>	Neg.	Neg.	Neg.
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Neg.	Neg.	Neg.
<u>Escherichia coli</u>	Neg.	Neg.	Neg.

Después de Sanitizar

El vapor estuvo en contacto durante 30 minutos.

	Col/ml		
	a)	b)	c)
C.T.A.de bacterias	0	0	0

C) Medio Ambiente

Para este tipo de análisis, se procedió a exponer - placas de agar nutritivo por 30 minutos en el área co - rrespondiente. Se analizaron las placas en el Area antes de sanitizarla y después de ella. Esto se llevó a cabo - en las áreas de proceso y de envasado.

Antes de Sanitizar el Area

Proceso

Envasado

	<u>Proceso</u>	<u>Envasado</u>
C.T.A.de bacterias	230 Col.	400 Col.
C.T.de hongos y levaduras	10 Col.	10 Col.
Tinción de Gram	(+)(-)	(+)(-)
<u>Staphylococcus aureus</u>	Neg.	Neg.
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Neg.	Neg.
<u>Escherichia coli</u>	Neg.	Neg.

Después de sanitizar el área

La sanitización se llevó a cabo con Propilen glicol

	<u>Proceso</u>	<u>Envasado</u>
C.T.A.de bacterias	10 Col.	30 Col.
C.T.de hongos y levaduras	0 Col.	0 Col.
Tinción de Gram	(+)	(+)
<u>Staphylococcus aureus</u>	Neg.	Neg.
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Neg.	Neg.
<u>Escherichia coli</u>	Neg.	Neg.

L) Producto en proceso

Se analizaron cinco tipos de cosméticos:

- a) Crema para manos
- b) Shampoo
- c) Máscara para pestañas
- d) mascarilla facial
- e) Talco desodorante

	Colonias/gramo				
	a)	b)	c)	d)	e)
C.T.A.de bacterias	0	0	0	0	0
C.T.de hongos y levaduras	0	0	0	0	10

E) Producto envasado

Se analizaron los mismos tipos de cosméticos mencionados anteriormente.

- a) Crema para manos
- b) Shampoo
- c) Máscara para pestañas
- d) Mascarilla facial
- e) Talco desodorante

	Colonias/gramo				
	a)	b)	c)	d)	e)
C.T.A.de bacterias	0	0	0	0	0
C.T.de hongos y levaduras	0	0	0	0	0

F) Materiales de empaque

Se analizaron los siguientes materiales:

- a) Tarros de plástico
- b) Tapas de plástico
- c) Botellas de plástico
- d) Aplicadores de máscaras de pestañas.

Para los tarros, tapas, y botellas se hizo pasar -- agua estéril por ellos, posteriormente se analizó el -- agua.

Para los aplicadores de máscaras de pestañas se tomaron 10 muestras y se pesaron para hacer una dilución - 1:10.

	Colonias/gramo		
	a)	b)	c)
C.T.A.de bacterias	10	0	0
C.T.de hongos y levaduras	0	0	0
Tinción de Gram	(+)	-	-
<u>Staphylococcus aureus</u>	Neg.	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Neg.	-	-
<u>Escherichia coli</u>	Neg.	-	-

Los aplicadores de máscara para pestañas se analizaron antes y después de la sanitización con Oxido de etileno. Los resultados son los siguientes:

	<u>Antes</u>	<u>Después</u>
	Colonias/gramo	
C.T.A.de bacterias	200	0
C.T.de hongos y levaduras	10	0
Tinción de Gram	(+)(-)	-
<u>Staphylococcus aureus</u>	Neg.	-

	<u>Antes</u>	<u>Después</u>
	Colonias/gramo	
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Neg.	-
<u>Escherichia coli</u>	Positiva	-

"CONCLUSIONES"

A) De las materias primas analizadas, los aceites de coco y castor fueron aprobados, debido a que los resultados obtenidos estuvieron bajo el límite aceptado de microorganismos de acuerdo a las normas recomendadas por la C.T.F.A (The cosmetic, toiletry and fragrance association) y las normas establecidas en la compañía en la que se trabajó.

El talco contenía un alto número de microorganismos y al ser esterilizado con óxido de etileno que es el tratamiento que se da normalmente se obtuvieron resultados satisfactorios, lo que indica la importancia de efectuar este proceso y el hecho de que se está efectuando adecuadamente.

B) Las muestras analizadas correspondientes al equipo de manufactura se realizaron antes y después de la sanitización del mismo, encontrándose aceptables lo que in

dica la limpieza adecuada de este equipo.

C) Respecto al medio ambiente en las áreas de proceso y envasado, las placas expuestas mostraron un gran número de microorganismos, pero después de la sanitización periódica los resultados demostraron la efectividad del sanitizante, en este caso propilen glicol.

D) De los productos en proceso se analizaron 5 tipos de cosméticos, siendo aprobados para su posterior envasado.

E) Los resultados de los productos envasados analizados no mostraron contaminación alguna, por lo que fueron aprobados.

F) De los materiales de empaque; los tarros, tapas y botellas de plástico, los resultados fueron acepta --bles, en cambio los aplicadores de máscaras de pestañas mostraron estar contaminados por un gran número de microorganismos, además la prueba de E.coli fué positiva. Este lote de aplicadores sanitizado y analizado nuevamente mostró resultados satisfactorios, lo que indica la necesidad de efectuar un mayor control en este tipo de material.

Recomendaciones:

Un control microbiológico adecuado de todos los posibles orígenes de contaminación, garantiza un cosmético de calidad.

Con base a lo anterior y los resultados obtenidos es recomendable dar más atención al personal que labora

en el área de proceso y envasado que puede ser una fuente importante de contaminación, por otra parte las características de los aplicadores de máscaras de pestañas determinan que el proceso de desinfección sea más tardado por lo que se recomienda ampliar el tiempo de exposición al proceso de sanitización para asegurar la eliminación de microorganismos en este tipo de material.

Considerando que el costo del análisis microbiológico es mínimo y los efectos negativos de la contaminación tanto desde el punto de vista de la salud del consumidor como de las pérdidas económicas para el productor por alteraciones de los productos se recomienda efectuar este tipo de análisis.

437

"BIBLIOGRAFIA"

1. Alguirre D.E.
"100 % ethylene oxide sterilization of dry cosmetic ingredients"
Cosm. and Perf. 90, 21 (Noviembre 1975)

 2. Cosmetic Toiletries Fragrance Association, Inc.
"Microbiological Limit Guidelines for Cosmetics and Toiletries"
CTFA 1973.

 3. Cosmetic Toiletries and Fragrance Association, Inc.
"Microbiological Guidelines for Process Water"
CTFA Inc. (1972)

 4. Cosmetic Toiletries and Fragrance Association, Inc.
"Microbiological Aspects of Quality Assurance"
CTFA Inc. (1971)
- 438

5. Cosmetic Toiletries and Fragrance Association, Inc.
"Microbiological Quality Assurance Guidelines for the
Cosmetic Industry".
CTFA Inc. (1978)

6. Cown, R.W. and Steiger, B.
"Antimicrobial activity a Critical review of Test Me-
thods of preservative efficiency"
J. Soc. Cosm. Chem. 27, 467, 1976.

7. Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg, Wood.
"Tratado de Microbiología"
2a. ed., Salvat Editores, S.A. (1980)

8. De Navarre, Maison G.
"The Chemistry and Manufacture of Cosmetics".
Vol. III y IV
2a. ed. Continental Press, Orlando Fl. 1976

9. De la Paz, Alvaro
"Microbiología en Cosméticos"
Perfumería Moderna, 96, (6), mayo 1977.

10. Funnigan, A.P.
"Microbiological control of Cosmetics"
Drug and Cosm. Ind. 102, 4 (43), 1968.

11. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
4a.edición 1964, S.S.A. Dirección General de Control
de alimentos, bebidas y medicamentos.
12. United States Pharmacopeia XIX Revision, July 1975
Marck Publishing Co. Easton, Pa.
13. Jawets Ernest, Melnick, Adelbery.
"Manual de Microbiología Médica"
5a. ed., El Manual Moderno, S.A. (1973)
14. Lachman L., Lieberman H. and Kaning J.
"The theory and Practice of Industrial Pharmacy"
Second edition, Lea & Feliger Philadelphia, (1976)
15. Lynch, Raphael, Mellor, Spare, Inwood.
"Métodos de Laboratorio"
2a.ed., Interamericana, (1972)
16. Olson J.C.
"Some considerations relative to microbial contamina
tion of Cosmetics"
Am. Perf. and Cosm. 85, 43 (agosto 1976)
17. Sagarin "L".
"Cosmetic Science and Technology"
Interscience Publishers Inc. New York 1957

18. Senzel Alan J.
"Manual of Cosmetic Analysis"
2a.ed. Sylvan H. Newburger (1977)
19. Tenenbaum, Saul.
"Pseudomonads in Cosmetics"
Journal Society Cosmetic Chemist 18, 797-807
Dic. 1967
20. Tenenbaum Saul
"Microbial Content of Cosmetics and Sterile Drugs"
Drys, Cosm. and Perf. 88, 49 (Febrero 1973)
21. Tenenbaum Saul
"Consideraciones acerca del Desarrollo de las Bases-
del Límite Microbiano de la CTFa"
Cosmetic and Toiletries, 92, marzo 1977.
22. Urbanski, J.
"Ethylene oxide in the chemical industry"
Przemyst Chem. 31 (8), 288-95 (1952)
23. Wallhouser, K. H.
"The Problems of preserving Cosmetics"
Cosmetic and Toiletries, Vol.81 (45), sent.1976

24. Woodward C.R.

"Some Microbiological aspects of Cosmetic manufacturing"

Am. perf. and Cosm. 36, 45 (agosto 1971)

25. Yablonski J.I.

"Fundamental Concepts of preservation"

Cosm. and Perf. 38, 39 (agosto 1973).