



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DETERMINACION DE UREA POR  
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA  
EN UNA LOCION CREMA.

MA. DE LOURDES CARRILLO GOMEZ

Químico Farmacéutico Biólogo

1980

M-21645



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

PRESIDENTE	Prof. Etelvina Medrano de Jaimes
VOCAL	Prof. Andrés Zúñiga Padilla
SECRETARIO	Prof. Héctor Jara Farjeat
1er. SUPLENTE	Prof. Luz del Carmen Camacho Susunaga
2do. SUPLENTE	Prof. Cristina Vargas Nava

Esta tesis se desarrolló en los Laboratorios Oftasa, S.A. por MARIA DE LOURDES CARRILLO GOMEZ bajo la dirección de la Sra. Q.F.B. Etelvina Medrano de Jaimes y la supervisión técnica de la Srta. Luz del Carmen Camacho Susunaga.

CON CARIÑO:

A MI MADRE

SRA. MARIA DOLORES GOMEZ DE C.

Como una pequeña muestra de  
agradecimiento por sus  
sacrificios.

A MI HERMANA

LUZ

CON AGRADECIMIENTO :

A LA SRA. Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE J.

A LA SRITA. Q.F.B. LUZ DEL CARMEN CAMACHO S.

A MIS MAESTROS

## C O N T E N I D O

- 1 INTRODUCCION
- 2 GENERALIDADES
  - 2.1 PIEL
  - 2.2 CREMAS LIQUIDAS CON UREA
  - 2.3 CONTROLES MICROBIOLÓGICOS
  - 2.4 IRRITANTES Y SENSIBILIZANTES
  - 2.5 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
- 3 PARTE EXPERIMENTAL
  - 3.1 EQUIPO Y MATERIAL
  - 3.2 SISTEMAS UTILIZADOS
  - 3.3 DETERMINACIONES EN CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
- 4 DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS
- 5 CONCLUSIONES
- 6 BIBLIOGRAFIA

## I INTRODUCCION

El objeto de esta tesis es realizar un estudio sobre la estabilidad de las cremas faciales conteniendo en su formulación urea.

En este tipo de cremas se ha observado que poco tiempo -- después de fabricadas, presentan pH elevado al que inicialmente tienen cuando se fabricó, provocando alcalinidad en las mismas que producen alteraciones en la piel como prurito, escoriación, inflamación etc.

Se realizaron pruebas en Cromatografía en Capa Fina para probar si en dichas cremas presentaban degradación de sus diferentes componentes.

Así como también se efectuaron análisis microbiológicos del producto con el fin de saber la cantidad de microorganismos presentes y los efectos que éstos podrían causar en la degradación de la misma.

## II GENERALIDADES

### 2.1 PIEL.

La piel o epidermis ( esquema ) es el órgano destinado a la protección del cuerpo, lo reviste por entero y en correspondencia con los orificios naturales que conducen a cavidades, - continúa en forma de membranas mucosas. En su complejo desarrollo una superficie de 15,000 cm.<sup>2</sup> aproximadamente además, - es un órgano termorregulador, secretor, excretor y de absorción. Según los individuos, sexo, edad, zona, varía el grosor.

Sobre la piel se advierten las crestas cutáneas separadas por surcos epidérmicos, punteadas por poros sudoríparos, que son las aberturas de las glándulas sudoríparas. Las crestas, - en determinadas zonas forman vértices convexos, llamados eminencias como pueden notarse en la yema de los dedos.

La parte mas externa de la piel constituye la epidermis, - que es semitransparente, de color variable, entre el amarillo-pajizo y el moreno, de un grosor comprendido entre 0.01 y 2 mm está surcada profundamente por numerosos hoyuelos papilares -- que acojen las papilas del derma. Perpendicularmente a tales hoyuelos superficiales, discurren los surcos epidérmicos que limitan las crestas glandulares atravesadas por conductos sudoríparos y que corresponden superficialmente a las crestas -- epidérmicas.

Estructuralmente la epidermis se divide en una capa germinativa y otra córnea unidas a otras dos capas secundarias: la granulosa y la lisa.



La capa germinativa es la capa mas profunda y está constituida por células basales que forman el estrato basal; las células están dotadas de tonofibrilla, que se extienden por la dermis y da lugar a la fijación de la epidermis.

El estrato basal comprende también el estrato espinoso, - constituido por células homónimas, dotadas así mismo, de fibrillas dispuestas radialmente y que entrelazándose entre sí mantienen la cohesión de la capa, a través de la cual circulan -- los jugos nutritivos, el citoplasma de las células contienen -- la melanina que es la substancia colorante de la dermis.

Con la reducción de los espacios interespinosos se forma la capa granulosa, consistente en granulaciones brillantes de queratohialina, que se transforma fluidificándose, en queratoelaidina en el siguiente estrato translúcido, caracterizado -- por las células ocultas y por el núcleo casi atrofiado. La -- queratoelaidina se transforman después en queratina en la capa córnea, cuyas células se adhieren fuertemente; cediendo mecánicamente a continuación de la germinación inferior, ocasionando la caída y descamación del tejido, con una pérdida cotidiana -- de células córneas de 10 g. aproximadamente.

La capa córnea tiene considerable importancia, ya que --- siendo la más externa, cae directamente bajo la observación -- visual. En el epitelio córneo las células de los estratos medios, mientras van siendo empujadas hacia la superficie, se modifican transformándose gran parte de su protoplasma en escleroprótidos, que les confieren particular dureza. La cornificación viene ligada a procesos de congelación y deshidratación -- con un aumento de azufre y nitrógeno. Estos procesos ocurren --

por grados sucesivos, ya que a una profundidad donde las células no están aún muy ocultas, aparecen dentro del protoplasma características granulaciones basófilas de queratohialina, que se transforma en elaidina en la capa lisa y en queratina en la capa córnea. Esta capa puede estar más o menos desarrollada y superar en mucho el grueso de las inmediatas ( estrato de Malpighio ), el núcleo de las células va contra la evolución y -- desaparece.

La capa más profunda de la epidermis está constituida por la dermis blanquecina, teniendo un grosor variable de 0.3 a -- 2.5 mm. Su parte más superficial constituye el cuerpo papilar de la dermis formado por sobresalientes cónicos denominados pa pilas dérmicas, las cuales se encuentran separadas de los surcos dérmicos, por las crestas dérmicas anchas y bajas, termi-- nando con las crestas papilares. Las crestas epidérmicas co--- rresponden en profundidad a los surcos dérmicos, mientras que los surcos epidérmicos corresponden a las crestas dérmicas.

Inmediatamente bajo el cuerpo papilar de la dermis tiene asiento la capa dérmica constituida por haces conjuntivos fi-- brosos o redes de fibras elásticas, por hacecillos musculares- erectores de los pelos. En el tejido conjuntivo compacto de la dermis se encuentran corpúsculos nerviosos y discurren vasos y nervios. Las arterias y venas forman dos redes : una subpapi-- lar y otra subdérmica. Los linfáticos se derraman en una red - subpapilar, en una segunda cituada en la capa propia y una ter cera red subtérmica. Los nervios pertenecientes al sistema ce- rebro espinal tienen una función sensitiva y sus ramificacio--- nes llegan a la capa germinativa de la epidermis, mientras que las pertenecientes al simpático tienen función basomotora, mo- tríz de la musculatura lisa y secretoria por intervenir en las

glándulas cutáneas.

De la epidermis derivan los productos cutáneos de naturaleza córnea y glandular.

Situado bajo la dermis, en relación con la cara profunda en la cual se compenetra, existe el tejido conjuntivo fibroso y adiposo que recibe el nombre de Hipodermis o Tejido Subcutáneo. Tiene un grosor variable desde unos milímetros hasta 8-10 cm. está dotado de considerable elasticidad y resistencia, puesto que presenta mucha travezón fibrosa o reticular, debido a lo cual se desprenden laminillas llamadas membranas interlobulares, dispuestas en forma reticular, en cuyas mayas están retenidas la adiposidad que proporciona al tejido un color variable desde el blanquecino al amarillo pajizo.

Bajo la formación queratínica se encuentra el tejido conjuntivo, el cual participa eminentemente en la turgencia y trofismo de la superficie cutánea, también determina la coloración de la piel y da lugar a su color encarnado. Químicamente está constituida principalmente por glucoprotidos y mucoprotidos. Estas sustancias son consideradas como fundamentales en la química de los tejidos por que, como un cemento celular --- reúne las unidades estructurales aisladas de los tejidos epiteliales. En la piel se encuentran bajo forma de gel, como un resultado de un complejo formado por glúcidos y mucoprotidos, --- con predominio de hidratos de carbono. A través de variaciones de polímeros aumentan o disminuyen de turgencia y de viscosidad y por deshidratación se convierten en indispersables. La modificación en su hidratación influye no solo en su Consisten

cia, sino también en su grado de permeabilidad, el comporta---  
miento coloidal de los gluco y mucoprotidos condicionan la ---  
elasticidad, el aterciopelamiento y la suavidad de la piel.

La piel posee glándulas sudoríparas que secretan sudor y  
glándulas sebáceas, generalmente en la base de los pelos, que  
secretan sebo cutáneo, capa grasa relativamente impermeable al  
agua que recubre la superficie de la piel.

La piel constituye uno de los órganos más grandes del ---  
cuerpo en un adulto pesa cerca de 4 Kg., tiene unos dos millo-  
nes de glándulas sudoríparas y contiene al rededor del 30% de  
líquido extracelular del organismo.

#### CONCEPTO DE HIDRATACION DE LA PIEL.

La capa córnea tiene contacto en su superficie con la lla-  
mada "emulsión epicutánea"; la face acuosa de ésta contiene --  
electrolitos, azúcares, productos nitrogenados ( urea y ácidos  
aminados ) en donde el agua proviene de los fluidos existentes  
en las capas inferiores de la piel y de la secreción sudoral.  
La face lipídica procede de la liberación de constituyentes ce-  
lulares en el proceso de la queratinización córnea y también -  
de la secreción sebácea; por lo tanto la composición química -  
de los lípidos de la capa córnea es distinta al la del sebo, -  
conteniendo fosfolípidos ( lecitina ), ácidos grasos libres y-  
combinados y esteroides ( colesterol, fundamentalmente libre ).

Esta emulsión desempeña un papel importante en la preven-  
ción de la sequedad cutánea y en el control microbiano merced-  
a su pH ácido.

La capa córnea posee en su composición queratina, lípidos y un complejo de sustancias solubles e higroscópicas que cuando funcionan adecuadamente la piel en estado turgente y flexible; la concentración acuosa crítica se considera de acuerdo a lo informado por Blank del 10%; encontrándose en la piel joven aumentada el 13% y descendiendo hasta el 7% en pieles envejecidas. Se ha demostrado que la pérdida de humedad trae aparejada la aparición de arrugas a la disminución de la elasticidad.

La disminución de la humedad puede deberse a factores extrínsecos e intrínsecos. Entre los primeros, los factores ambientales, climáticos, son primordiales ( rayos ultravioleta, temperatura, humedad, vientos y gases ) y van conformando los síntomas característicos de la piel agraviada. Los compuestos químicos, jabones, detergentes sintéticos, también modifican la interrelación entre los lípidos y las sustancias higroscópicas de la capa córnea, la cual al disminuir la concentración normal de los principios mencionados pierde su capacidad plena de retención de agua.

Entre los factores internos, mencionaremos que toda distorsión en el metabolismo orgánico general tiene su consiguiente implicancia cutánea : variadas afecciones ( estados carenciales, anemias ), medicamentos ( diuréticos ) y muchos otros motivos pueden condicionar la aparición de signos de involución cutánea, al favorecer la pérdida del contenido acuoso orgánico.

El mismo proceso de envejecimiento, acentuado en las áreas expuestas, con la modificación estructural de la dermis-

( donde las fibras colágenas y elásticas sufren un proceso degenerativo, y el tenor en mucopolisacáridos disminuye ), producen una merma en la retención hídrica.

Para restablecer la humectación pueden emplearse :

- 1) Sustancias químicas capaces de retener humedad en su superficie ( higroscópicas ) como la glicerina, poliglicoles, sorbitol, etc.
- 2) Sustancias higroscópicas intracelulares ( azúcares, aminoácidos, ácido láctico y urea ).
- 3) Sustancias oclusivas: vaselinas, parafinas, silicones ceras, perhidroescualeno o también con sustancias oclusivas higroscópicas como la lanolina, etc. algunos derivados de lanolina, miristato y palmitato de isopropilo, colesterol y lecitina. Ciertos coloides oclusivos higroscópicos, como los derivados celulósicos y la polivinilpirrolidona, tienen real importancia hidratante al poseer ambos grupos la capacidad de formar películas bloqueantes ( máscaras ).

Pese a la dificultad de discernimiento en variados casos, se ha propuesto llamar HUMECTANTES a los cuerpos higroscópicos que actúan pasivamente, y en cambio HIDRATANTES a los que intervienen en el proceso en forma activa. Para obtener una hidratación o humectación cutánea se indica como las más adecuada a la emulsión por su composición hidrolipídica y también a las máscaras por su efecto oclusivo. El uso combinado de estos dos recursos con la reiteración debida produce satisfactorios resultados en tratamientos de cutis secos.

La piel normal constituye una barrera mecánica elástica-- y resistente, merced a su capa córnea es prácticamente imper-- meable al agua y soluciones acuosas, y algo permeable a subs-- tancias solubles en lípidos, no así en la piel desnuda, que-- absorbe tan fácilmente como las mucosas. Es mala conductora -- del calor y por lo tanto protege al organismo de las variacio-- nes térmicas; por su pigmento de la melanina, protege a los -- tejidos subyacentes de la luz, especialmente ultravioleta.

#### METABOLISMO DEL AGUA.

La piel es un órgano importante de eliminación de agua, -- lo que realiza por dos mecanismos:

- a) Perspiración insensible, es decir el agua que atraveie sa la epidermis entre las células, desde la dermis y -- que se evapora sin ser visible.
- b) El sudor secretado por las glándulas sudoríparas.

Junto con el agua, las glándulas sudoríparas excretan --- Cloruro de Sodio a una concentración de 0.35% y pequeñas cantiti dades de Urea y Acido Láctico.

Funciones Antiinfecciosas.- La piel, especialmente la -- epidermis constituye una barrera mecánica de primer orden frente a los gérmenes infecciosos y por otra parte, la piel posee-- una reacción ácida pH 5.5 ( por el ácido láctico del sudor ),-- que retarda el desarrollo bacteriano.

Por lo antes mencionado, la piel se ve afectada por proceso s inflamatorios, los cuales disminuyen o desaparecen con la-

aplicación de determinados fármacos, cuyo objeto es el de modificar favorablemente dichos procesos, que representan la reacción local de los tejidos frente a los agentes patógenos tales como: microorganismos, sensibilización, alergias y otros factores conocidos y desconocidos.

En las inflamaciones agudas lo primero en presentarse es el eritema, vaso dilatación cutánea, que puede continuar en un edema, si el proceso es intenso, aparecen vesículas y ampollas ( exudación ) como resultante de aquel y más tarde costras y -escamas; cuando la inflamación se hace crónica la epidermis se engrosa y se pigmenta.

Existen numerosas enfermedades de la piel, pero las que se observan comunmente son las siguientes:

ECZEMA.- O Dermatitis Eczematosa, es un proceso inflamatorio dermoepidérmico - epidermodermatitis -, caracterizado por la congestión y edema dérmico y epidérmico intercelular, que origina vesículas microscópicas luego macroscópicas. Se manifiesta como una erupción eritematosa, vesicular y pruriginosa, y cuando las vesículas se abren, rezumante - exsudación -, con formación de costras por coagulación - fibrina - y desecación del exsudado; queda interferido el proceso de queratinización normal, lo que origina descamación. Estas lesiones pueden ser agudas, subagudas y crónicas.

El eczema puede deberse a fenómenos de sensibilización -- alérgica - eczema o dermatitis atópica - a alimentos, fármacos y productos de origen indeterminado. Algunos corresponden a la afección que a continuación se describe.



**DERMATITIS DE CONTACTO.**- Es una erupción eczematosa producida generalmente por sensibilización de la piel por contacto previo con ciertas sustancias que luego son capaces de provocar la citada erupción en el sitio de aplicación - alergia cutánea - produciendo después diceminación en otras partes del cuerpo.

Son muchas las sustancias capaces de originar esta sensibilización, algunas de las cuales se emplean en la industria - dermatosis ocupacionales - ; las principales son : trementina, tolueno, derivados del petróleo, caucho y derivados, resinas, ceras, colorantes, distintas plantas ( cáñamo, margarita) insecticidas ( piretro, clorofenotano ), jabones cosméticos -- (esmaltes de uñas, lápiz de cejas, de labios, cremas ), seda, rayón, lana, tabaco, compuestos de mercurio, azufre, resorcinol, penicilina, estreptomycin, sulfas entre otras. En esos casos la eliminación de las sustancias casuales lleva a la curación del proceso.

**PSORIASIS.**- Es una enfermedad inflamatoria crónica, no pruriginosa, caracterizada por placas rojas, multiformes, cubiertas de escamas micáceas imbricadas, secas y adherentes; - afectan los codos, rodillas, cuero cabelludo especialmente, en forma por lo general simétrica. Es una afección de todas las edades y evoluciona con períodos de desaparición y residiva, - durante muchos años. Es una enfermedad de causa desconocida y generalmente incurable, pero muy atenuable con medicación local.

**PITIRIASIS ROSADA.**- Erupción aguda eritematoescamosa, que forma medallones diseminados, evoluciona y cura en pocas semanas. Su etiología es desconocida pero sugiere un proceso infecc

cioso.

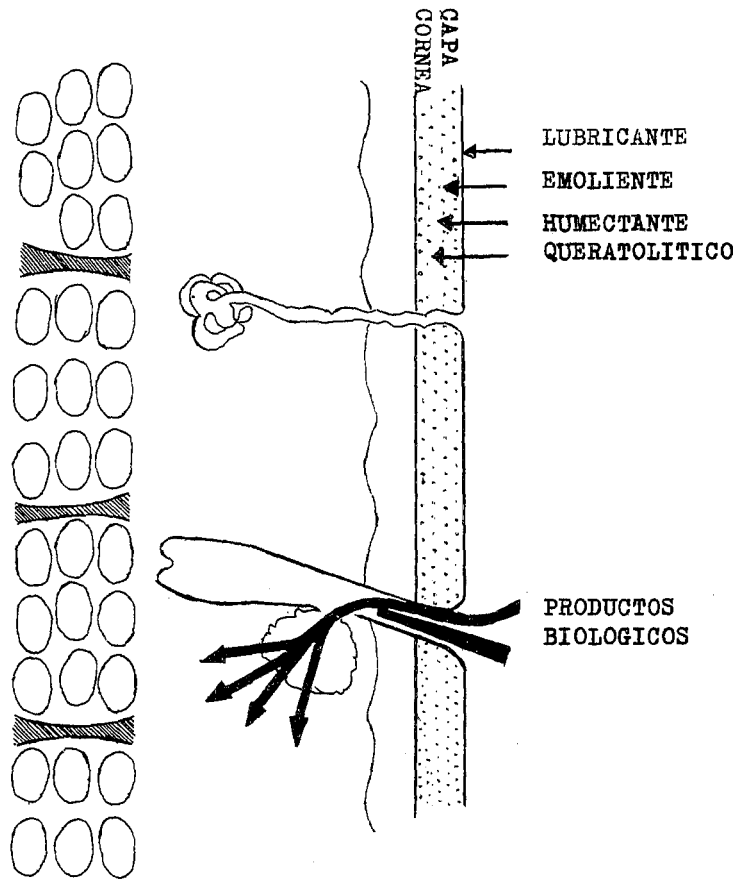
ACNE.- Consiste en una hiperactividad de las glándulas - sebáceas con cornificación ( hiperqueratosis ) del folículo pi loso, que origina la formación del comedón, pequeña masa cór-- nea engastada en el orificio folicular, que se infecta e infla ma secundariamente, produciéndose pápulas, pústulas, módulos y luego cicatrices. Se observa en personas jóvenes y su etiolo-- gía es desconocida, interviniendo factores endocrinos cuya na-- turaleza no está dilucidada. Por otra parte, el acné puede ser producido o favorecido por la ingestión de bromuros o ioduros.

DERMATITIS SEBORREICA.- Es un proceso inflamatorio que - se observa en los casos de seborrea - hipersecreción sebácea - y que se manifiesta por manchas rojas congestivas - eritema -- y descamación, que afecta al cuero cabelludo, oído externo, -- párpados, cara, cuello, centro del pecho; puede ser bastante - pruriginosa. Tampoco se conoce la etiología de esta afección,- pero es probable su naturaleza infecciosa, aunque el germen no se ha identificado.

HIPODERMIS

DERMIS

EPIDERMIS



ESQUEMA No. 1

## 2.2 CREMAS LIQUIDAS CON UREA.

La crema en la que se realizó el presente estudio con características emolientes, humectantes y absorbente, está integrada por las siguientes sustancias:

Urea

Monoestearato ácido de glicerol

Acido esteárico

Propilparabeno

Metilparabeno

Polímero de carboxivinilo

Agua deionizada c.b.p.

100 ml.

Las características de esta crema son las de una crema -- líquida cuyas propiedades son las siguientes:

### EMOLIENTE. -

Se denomina emolientes a sustancias grasas o de consistencia que, al aplicarlas sobre la piel tienen la propiedad de ablandarla aumentando su flexibilidad.

Las sustancias emolientes o bases para cremas se clasifican en: Oleaginosas, Absorbentes, Emulsivas e Hidrosolubles.

Bases Oleaginosas.- Las bases oleaginosas o grasas son -- anhidras no absorben agua, son insolubles en ella y no lava--- bles, se clasifican a su vez en : hidrocarburos, grasas animales, aceites vegetales y ceras.

Dentro de los aceites vegetales encontramos los trigli--- céridos líquidos provenientes de los ácidos palmítico, estéari

co, oleico y linoleico.

Bases Absorbentes.- Son anhídras e insolubles en agua pero tienen la propiedad de fijar agua - hidrófila - formando -- emulsiones del tipo agua en aceite, por lo que pueden incorporársele substancias en solución acuosa; habitualmente no son - lavables.

Entre estas bases encontramos: los alcoholes cetílico y-- esteárico o estearílico, los cuales son alcoholes sólidos obtenidos por hidrogenación de los ácidos correspondientes y tienen la ventaja de no poseer olor desagradable.

Bases Emulsivas.- Absorben agua aunque son insolubles en ella, formando emulsiones agua en aceite, no lavables, o aceite en agua, en cuyo caso se pueden quitar fácilmente de la --- piel, es decir son lavables. Comprenden los agentes humectantes o superficialmente activos, que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua - agentes tensoactivos-surfactantes - de manera que ella se extienda y moje más fácilmente la superficie.

Los jabones o sales de ácidos grasos emulsificantes o surfactantes aniónicos, ya que el grupo lipofílico es un anión, - en este caso se preparan generalmente por la combinación del - ácido estearico y del ácido oleico con bases o álcalis tales - como hidróxido de potasio y la trietanolamina.

Bases Hidrosolubles.- Son anhídras, absorben agua y son completamente solubles en ella, no grasosas y lavables, además de que no manchan la ropa.

Por ejemplo los polietilenglicoles que son polímeros sintéticos constituidos por condensación del óxido de etileno, -- siendo los principales el polietilenglicol 400 - líquido - el polietilenglicol 1540 ( carbowax 1540 ) - semisólido - y el -- polietilenglicol 4000 ( carbowax 4000 ) - sólido - donde los -- números indican el peso molecular aproximado.

La crema como se ha mencionado anteriormente, está constituida por emulsionantes, espesantes, ingredientes grasos, agua y el principio activo que es el objeto de este estudio, es decir la urea.

Las materias grasas constituyen la " Fase Dispersa " de la emulsión. Así pues una emulsión es un sistema que consta por -- lo menos de dos líquidos inmiscibles uno de los cuales se encuentra disperso en el otro en forma de pequeñas gotitas. La -- estabilización de este sistema se logra mediante la adición de ciertas sustancias que constituyen la " Fase Emulgente o Emulsificadora ".

Esta Fase Emulsificadora la forman los agentes emulgentes o superficialmente activos que hacen disminuir la Tensión Superficial, la cual se explica como una fuerza de contracción -- que actúa sobre la superficie de los líquidos y tiende a reducirla a un mínimo, como consecuencia de esto las gotas de la -- fase dispersa toma la forma esférica que permite que se extiendan y moje más fácilmente la superficie. La molécula de estas sustancias consta de dos partes : una se une o disuelve en el agua - Grupo Hidrófilo o Polar - generalmente formado por ---- hidróxilo, carbóxilo o sales de éste último, mientras que la --

otra lo hace con el aceite - Grupo Lipófilo o no Polar -. De manera que el agente superficialmente activo o emulsificante junta las dos moléculas de agua y de aceite formando una película al rededor de las gotitas de la fase dispersa, originando así las emulsiones.

La estabilidad de las emulsiones puede determinarse por los siguientes puntos :

- 1.- Floculación y Formación de Crema.
- 2.- Coalescencia y Destrucción de la Emulsión.
- 3.- Diversas Alteraciones Físicas y Químicas tales como:
  - a) Hidrólisis
  - b) Contaminación y formación de microorganismos
  - c) Temperatura
  - d) pH
  - e) Viscosidad

**Espesante.**- Son sustancias coloidales que tienen por objeto aumentar la viscosidad de la fase externa.

Todas las sustancias que se han descrito hasta aquí son generalmente inertes al aplicarlas sobre la piel, poseen una acción protectora debido a que forman una capa más o menos impermeable sobre la piel, impidiendo así la desecación de la epidermis en su capa córnea al retardar la evaporación del agua de la superficie cutánea; en esta forma la piel queda más blanda y flexible finalmente estas sustancias que sirven como excipientes del principio activo en estudio es decir, la urea, tienen una acción local cuyos efectos son prolongados por la lenta liberación de la misma.

Es importante señalar que además de las propiedades de la crema antes citadas es también un astringente.

Se denomina astringente a las sustancias que precipitan las proteínas en la superficie celular formando una capa protectora de proteína coagulada.

Los queratolíticos o astringentes se emplean en las dermatosis escamosas, como Psoriasis, Eczemas crónicas. Se ha observado que estos padecimientos se eliminan o atenúan aplicando crema que contenga urea al 10%.



## LA UREA COMO HIDRATANTE.

La urea o carbamida, cuerpo descubierto en el año 1773, - en la orina y luego sintetizado en 1828 por Wohler ha sido uti- lizado tanto en medicina como en cosmética.

Desde el punto de vista de su utilización tópica en huma- nos, su historia nace en los primeros años de este siglo. Ya - en 1900 Spiro demuestra que las soluciones fuertemente concen- tradas disuelven proteínas y en 1902 Ramsden observa que una - rana sumergida en una solución saturada de urea, se macera y - se desintegra en pocas horas.

Pejú y Rajat en 1906 y Wilson en ese mismo año, informan- que la urea se comporta como un buen inhibidor bacteriano. --- Kligman en 1957 ratifica el efecto macerante del cuerpo en --- cuestión sobre los tejidos humanos y en 1969 Swanbeck descubre que sumergiendo trozos de capa córnea de pieles normal, ictiós- tica y psoriática en soluciones de urea al 30% se incrementa - considerablemente la capacidad de retener agua. Esta propiedad " humectante " de la urea, sumada a su capacidad de penetra--- ción y su efecto antiprurítico ( Swanbeck y Rajat en 1970 )- lo hace realmente interesante en el tratamiento de la piel al- terada como también en la involución cutánea.

Stewart en 1969, estudia comparativamente una crema con - urea al 10% y otra conteniendo hidrocortisona al 1% utilizando pacientes con ictiosis, xerosis y atrofia senil. Sus resulta-- dos fueron equivalentes.

Las simples soluciones de urea al 10% en agua manifiestan

características muy gratas con sensación hidratante; son viscosas, penetrantes ligeramente anestésicas y mejoran la turgencia de los tejidos a nivel epidérmico aportando mayor flexibilidad a la capa córnea. Su tolerancia ( comportamiento dermatológico ) es muy buena, siendo considerada la urea, no irritante, sensibilizante o tóxica en concentraciones del 3 al 10% -- variando entre 6.5 y 7.5 ) y provocan un efecto macerante de la capa córnea mucho más evidente que el agua sola. Como integrante de fórmulas humectantes o dermatotróficas, podrían utilizarse en concentraciones de 3 al 5%.

Recordamos que la urea concentrada participa en la integración de la capa córnea como un componente principal ( 7% ) del llamado " Factor de Humectación natural " o " Cuerpo Jacobi " .

La absorción cutánea es rápida ya que una buena absorción cutánea se presenta con aquellas sustancias que son solubles en agua ( la urea es sumamente soluble en agua ) y en grasas; en este caso tienen las propiedades suficientes para penetrar, ya que los productos tensoactivos modifican la permeabilidad cutánea favoreciendo la absorción en virtud de su estructura, en parte liposoluble y en parte hidrosoluble.

Su vida media biológica es de 1.17 horas.

En los estudios realizados con la crema en diferentes pacientes, se han encontrado los siguientes resultados: la crema con urea se ha empleado al 10% para el tratamiento de Ictiosis como un hiperqueratolítico para desórdenes de la piel; también es un bactericida y sus propiedades queratolíticas dependen --

probablemente del incremento de hidratación.

Excelentes resultados se observaron en 17 pacientes con Ictiosis tratados con la crema con urea al 10% y 9 de 10 pacientes con hiperqueratosis de pies y manos. Pocos pacientes con dermatitis atópica difundida con neurodermatitis y dermatitis en las manos respondieron y no hubo respuesta en pacientes con Psoriasis, Queratitis solar o Dermatitis Perioral.

Cuatro grupos con cerca de 20 pacientes con Ictiosis vulgaris fueron tratados respectivamente con crema de urea al 10% y con una crema que contenía Acido Salicílico; el estudio se realizó con el método de doble ciego. Los pacientes demostraron no sentir ninguna diferencia entre las dos cremas, pero clínicamente se encontró que la crema de urea es significativamente más efectiva.

En 14 pacientes con Ictiosis tratados durante tres semanas con la crema con urea al 10% causó un incremento del 100% en la rehabilitación de la piel por la retención del agua. Esta recuperación se debió probablemente al efecto higroscópico.

También se han realizado estudios con una doble comparación con el método de doble ciego en 50 pacientes con la crema con urea al 10% e hidrocortisona al 1%; fue efectiva en el tratamiento de eczema atópica. Seis pacientes con piel escorreada, reportados con escozor y dolor, cuando se les aplicó la crema de urea e hidrocortisona.

Otro estudio es con el método de doble ciego triple en 55 pacientes a los cuales se les aplicó crema con urea al 10% , -

no fue más efectivo que una crema acuosa en el tratamiento de hiperqueratosis.

Sobre un período de tres años, 112 pacientes con células-basales escamosas y piel carcionoma fueron tratados con inyecciones de urea al rededor de la lesión, así como también con polvo de urea. Una completa recuperación ocurrió en 65 pacientes y considerable mejoría en 27 pacientes.

### 2.3 CONTROLES MICROBICLOGICOS.

Antes de iniciar el tema del que tratará el siguiente capítulo, es importante mencionar el término contaminación, el cual se limita a la presencia de microorganismos patógenos o de otro tipo siempre y cuando representen un peligro para la integridad física del individuo.

Todos los investigadores que han abordado el tema de la Microbiología en cosméticos y productos farmacéuticos de aplicación tópica, 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 color, olor, de viscosidad, formación de gas, etc.

Existe una gran discusión sobre si los cosméticos y productos farmacéuticos de aplicación cutánea, pueden o no contener microorganismos sin el peligro para el consumidor, y en que nivel es permisible este contenido. Todos están de acuerdo en que ningún producto debe contener ninguna cantidad de microorganismos patógenos, 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 saprofíticos. Dunnigan 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 microbiano que debe ser controlado en los productos debe tomarse en cuenta para --

que y como son usados. Que la preparación de productos de aplicación tópica estériles es costosa y resulta inútil si se toma en cuenta que la piel contiene de varios millares a varios millones de *Estreptococos epidermidis* por centímetro cuadrado 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 a varios millares de *Clostridium acné* por centímetro cuadrado y que la saliva contiene normalmente millones de gérmenes por mililitro. Esta misma opinión la comparten Jungermann, Wallhousser y Most entre otros.

La CTFA publicó en 1973 unos " Lineamientos para límites-microbianos en productos de aplicación tópica " donde recomienda no más de 500 microorganismos por gramo o mililitro en productos para niños, no más de 500 microorganismos por gramo o mililitro en productos usados alrededor de los ojos, no más de 1000 en productos restantes, especificando que en adición a estos límites ningún producto deberá tener un contenido microbiano no reconocido como peligroso a los usuarios determinado por la cuenta estandar de placa.

Wallhousser en su magnífico estudio sobre el problema de preservar productos de aplicación tópica, menciona que gérmenes correspondientes a 17 géneros diferentes pueden provenir del aire, 31 géneros provienen del agua y 9 de otras fuentes de contaminación. De estos algunos pueden destruirse mediante calentamiento a 70 - 80° C. por 20 - 30 minutos, otros resisten hasta 100° C. y algunos requieren 120° C. y una atmósfera de presión durante 30 minutos para ser destruídos.

Prácticamente en todas las etapas por las que pasan los -

productos durante su vida están sujetos a la contaminación; si agregamos a esto que la composición de muchos de ellos es un medio rico en nutrientes que pueden aprovechar los microorganismos para su desarrollo y tendremos el panorama completo al que se debe enfrentar. En forma concreta se revisarán los diferentes factores que contribuyen en la contaminación de los productos.

a) MATERIAS PRIMAS.- De los varios miles de ingredientes que se pueden usar para fabricar productos con acción dermatológica, algunos de ellos muestran frecuentemente niveles de contaminación peligrosa. En primer lugar debemos mencionar el agua, considerada como el contaminante número uno, que como ya se mencionó anteriormente puede contener hasta 31 géneros diferentes de gérmenes, pero lo más importante es que es la fuente más frecuente de contaminación de Pseudomona aeruginosa sobre todo cuando se trata de agua deionizada o desmineralizada que se ha mantenido en almacenamiento.

b) MEDIO AMBIENTE.- Las condiciones higiénicas del local de manufactura, necesariamente repercutirán en los productos que se elaboren en él. Contar con pisos, paredes y techos limpios y sin superficies rugosas o permeables, mantener un control efectivo de roedores e insectos, evitar la circulación de aire y polvo etc.

c) HIGIENE PERSONAL.- Ya se mencionó que la piel y el cuero cabelludo de las personas normales está fuertemente contaminado, además el polvo que se adhiere a sus ropas constituye otra contaminación adicional que se puede introducir al pro

ducto que se fabrica si no se tienen las precauciones adecuadas. Es recomendable el lavado frecuente de las manos con soluciones desinfectantes, el uso de guantes protectores, cofias para retener el cabello así como exámenes periódicos que aseguren la condición sanitaria de los operadores.

d) MATERIALES DE EMPAQUE.- El empaque primario suele ser también una fuente de contaminación aunque originalmente se fabrican prácticamente estériles. Su contaminación proviene principalmente del polvo, por lo que deberán ser conservados en lugares limpios y secos y de preferencia en envases cerrados 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 conservación en condiciones antihigiénicas.

e) EQUIPO DE MANUFACTURA.- El equipo de fabricación, almacenamiento, llenado, mezclado, homogenización, etc. constituye la segunda fuente de contaminación en importancia, sobre todo en aquellos productos que durante su proceso de manufactura no incluyen ningún calentamiento. Es indispensable la limpieza y desinfección de todo el equipo mediante agentes físicos o químicos que garanticen su conservación en condiciones apropiadas entre una fabricación y otra.

f) CONTAMINACION SECUNDARIA.- Con este nombre se conoce a la que se produce durante el uso del producto 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. La única solución posible a este tipo de contaminación, es la presencia de un buen sistema conservador aunque puede ayudar el uso de aplicadores, atomizadores, tubos colapsibles, sistemas en aerosol y cualquier tipo de envase que evite el contacto directo del producto con la persona.

De los microorganismos que han sido reportados como contaminantes aislados pueden citarse 17 géneros de bacterias, 13 -- géneros de hongos y 3 géneros de levaduras.

De todos ellos, Pseudomona aeruginosa es de los más frecuentes y peligrosos en emulsiones farmacéuticas y cosméticas -- ya que es patógeno para el hombre donde se le ha asociado a procesos supurativos y de otra naturaleza. Se le ha encontrado como huésped común del agua aún después de tratamientos de cloración. Se produce fácilmente en válvulas, tubos en U, filtros de cerámica, medidores de flujo, equipos de desmineralización y en general en cualquier parte del equipo que no pueda desinfectarse con frecuencia. Una de las razones por las que este micro--organismo 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 -- que puede competir con ellas en el desarrollo favoreciéndolo en forma indirecta. Por esta misma razón las personas con grandes--áreas afectadas por quemaduras o afecciones dérmicas estén expuestas a infecciones por Pseudomonas contenidas en cremas. También se consideran peligrosas la presencia de Protens, Estafilococos, Estreptococos, Serratia, Penicillium, Aspergillus y Candida.

Sobre la contaminación microbiológica de productos cosméticos y farmacéuticos la FDA reportó lo siguiente: 7 unguentos contaminados de 79 conteniendo antibióticos, 19 envases conteniendo Pseudomonas de 20 muestras de cremas.

Resulta evidente que ante la amplia posibilidad de contaminación que presentan los productos farmacéuticos y cosméticos tanto derivada de sus ingredientes conservadores efectivos en adición a buenas prácticas de manufactura y diseño apropiado de envase.

Además de las posibles fuentes de contaminación que se ha revisado, influye en el tipo y cantidad de microorganismos presentes, otros factores como la humedad del medio, el contenido de agua del producto, el pH de la fase acuosa, la temperatura, la actividad superficial, el efecto osmótico, el valor nutritivo, el grado de aereación, la disponibilidad de oxígeno y el volumen.

El efecto esterilizador rápido en productos cosméticos y farmacéuticos, que es necesario para cumplir con los niveles de contenido microbiológico requeridos por las autoridades, -- puede ser obtenido por altas concentraciones de un conservador o por combinaciones binarias o terciarias de agentes antimicrobianos. Esto último resulta recomendable teórica y prácticamente ya que resulta menos costoso. La contaminación comprende a menudo gran variedad de microorganismos de diferente susceptibilidad a un solo conservador y la combinación proporciona un espectro de actividad más amplio. Si la concentración de un -- conservador no puede aumentarse por razones de solubilidad o --

toxicidad, el uso de sistemas binarios o terciarios resulta recomendable con menor riesgo de irritación o alergia.

El conservador de un producto deberá preservarlo de la --contaminación secundaria y de aquellas contaminaciones prima--rias normales, pero nunca puede ser substituta de una buena --práctica de manufactura.

Aunque se trata de inactivación, esta no es absoluta y --más bien se trata de reducción de la actividad antimicrobiana--por factores tales como pH, coeficiente de distribución entre--fases, solubilización del conservador por efecto de emulsifi--cantes, unión a superficies macromoleculares no activas o a materiales de empaque. Aunque todos los artículos que se refie--ren a conservadores mencionan las posibles incompatibilidades--con los componentes más comunes, el gran número de parámetros--que determinan esta acción, hace recomendable que se pruebe de finitivamente en el producto antes de desechar o aprobar un --conservador.

Una propiedad que debe ser demostrada experimentalmente --con todo conservador, es su incapacidad para provocar reaccio--nes alérgicas, o de tal manera moderadas que no representan un peligro para el usuario normal. En realidad no hay ningún con--servador que sea totalmente no alérgico o sensibilizante cuan--do un número suficiente de personas se exponen repetidamente a él. Por esto es necesario que el concepto seguridad se esta---blezca sobre bases por todos aceptadas y reconocidas como ade--cuadas para juzgar la inocuidad de un producto.

El método y las condiciones que se requieren para realizar un análisis microbiológico es el siguiente:

1. Tipo de Microorganismo.- La Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos y la U.S.P recomiendan como microorganismos de prueba *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Estreptococos aureus*, *Clostridium albicans*; la CTFA adiciona *Protens leteum* y *Basilo subtilis* y la SCQ considera que deben usarse cepas aisladas de productos contaminados. Cowen y Steiger han encontrado que microorganismos aislados de un producto no crecen en otro con el mismo conservador.

2. Medio de Cultivo.- La resistencia de un microorganismo depende de la calidad del medio en que se desarrolla. Generalmente se usan medios de Soya, Caseina, Agar Nutriente o Medio de Sabouraud.

3. Inoculo 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 del Inoculo.- La Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos y la U.S.P recomiendan 0.1 ml. de un cultivo conteniendo de 125,000 a 500,000 microorganismos por ml. a 20 ml. de la muestra por valorar. Otros recomiendan cultivos conteniendo hasta 10 millones de gérmenes por ml. pero debe tenerse en cuenta que entre más se agregan aumenta el número de células resistentes al mismo tiempo que se va inactivando el conservador.

5. Temperatura de Incubación.- Varios autores recomiendan de 32 - 37° C. para bacterias y de 27 - 32° C. para hongos. Hay que tener en cuenta que estas temperaturas no son típicas y aunque favorecen el crecimiento es posible que el efecto del conservador sea diferente, por lo que se recomienda que la incubación se haga a temperatura ambiente. La Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos recomienda de 30 - 32° C. y la U.S.P de 20 - 25° C. en caso de que el producto no traiga especificada la temperatura de almacenamiento.

6. Número de Inoculaciones.- La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y la U.S.P utilizan una sola inoculación inicial, la CTFA 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 la reacción con ingredientes con el empaque o con materiales extraños.

7. 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.

8. Duración de la Prueba.- En la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos y la U.S.P recomiendan 28 días con dos observaciones con una diferencia de 7 días entre una y otra, la CTFA recomienda también 28 días con observaciones a 0, 1, 2, 7, 14, y 28 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 dis-

minuye mucho su concentración para luego recuperar su viabilidad.

9. **Criterio de Efectividad.**- La Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos y la U.S.P consideran un conservador como apropiado para productos de uso oftálmico o parenteral si no hay aumento apreciable en el número de microorganismos *Clostridium albicans* y si el número de microorganismos relativos 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 CTFA exige cuentas reducidas después de la segunda inoculación de la SCQ que las cuentas sean reducidas en tres pruebas semanales para cremas.

#### 2.4 IRRITANTES Y SENSIBILIZANTES.

Los daños que pueden surgir por la aplicación de substancias a la piel, son diversos, por lo que se desea emprender una clasificación de tipos de daños y substancias responsables.

Las dos clases en las que las substancias se clasifican dependiendo del modo como dañan a la piel son:

- a) Irritantes
- b) Sensibilizantes

La diferencia esencial consiste en el mecanismo de acción, a través de los efectos que producen, los cuales en algunas reacciones son semejantes.

En general los irritantes empiezan a actuar sobre la piel inmediatamente al contacto produciendo efectos rápidamente ( Irritantes Primarios ), o en unas cinco horas, ( Irritantes Secundarios ).

Los sensibilizantes son generalmente definidos como substancias que producen efectos dañinos en la piel, en un segundo o subsecuente al inóculoso primer contacto, ( algunas substancias son capaces de producir ambos efectos con lo cual difficultan la clasificación.

SINTOMAS.- Los síntomas de irritación y sensibilización alérgica pueden ser idénticos y son descritos como variaciones suaves las que finalmente resultarán en francas dermatitis.

tis clínicas, cuando el contacto es prolongado y razonablemente abundante, o cuando el alivio de los síntomas no se efectúa

Usualmente se observa un eritema o ruborizante en la inmediata aplicación de la sustancia, seguida por un tumor o edema de la misma ligera área rojiza al rededor del sitio. Estas pueden progresar en prurito ( comezón ) ulceración en casos extremos.

Estos síntomas caracterizan la respuesta de la piel tanto los irritantes como sensibilizantes, sin embargo frecuentemente el tiempo puede dejar un rastro como el tipo de respuesta - que puede ser observada.

Los síntomas se deben a la liberación de sustancias, de las cuales la más importante es Histamina, liberada por las -- células de la dermis ( Células Mast ); las cuales son miembros normales de la población dermatológica. Estas células son frágiles y contienen gránulos, que se liberan en la dermis cuando las células son rotas ( lisadas ), a través de los gránulos -- que son los agentes involucrados en la liberación de histamina. La histamina, se deriva del aminoácido Histidina, el cual se -- presenta en el medio ambiente normal de la dermis. La histamina produce todos los síntomas de la respuesta triple en la --- piel.

MECANISMOS DE ACCION.- Son irritantes por medio de los - efectos externos producidos directamente en las células mast,- por virtud de aquellas propiedades físicas y químicas. Un irri



tante puede definirse por consiguiente como un compuesto el --  
cual es capaz de lisar células mast al penetrar en la dermis.--  
Los sensibilizantes por otra parte no son capaces de causar la  
relación de histamina en las células mast por lo tanto, no ne-  
cesariamente producen la triple respuesta al primer contacto -  
con la piel.

Los procesos de sensibilización pueden describirse como -  
un sensibilizador reacciona químicamente con un cuerpo pro----  
técnico para producir un antígeno. Estos procesos ocurren en -  
el primer contacto con el sensibilizador, sin embargo no produ-  
cen un efecto visible. Durante cinco días posteriores los an--  
tígenos estimulan la producción de un anticuerpo específico --  
contra el mismo en la corriente sanguínea. El siguiente paso -  
es cuando el sensibilizador aplicado a la piel, es decir una -  
nueva cantidad del mismo antígeno se forma y éste neutraliza -  
la proción del anticuerpo produciendo un precipitado del com--  
plejo antígeno-anticuerpo en el sitio de aplicación. Se cree -  
que este complejo es culpable del rompimiento de las células -  
mast, de este modo relacionando histamina en la dermis y gene-  
rando la triple respuesta en la vía como un irritante. La ----  
síntesis de anticuerpos como respuesta a los antígenos especí-  
ficos esparcidos en el cuerpo normalmente como una defensa con-  
tra infecciones, toma tiempo para crear la misma efectividad -  
( como 24 días ).

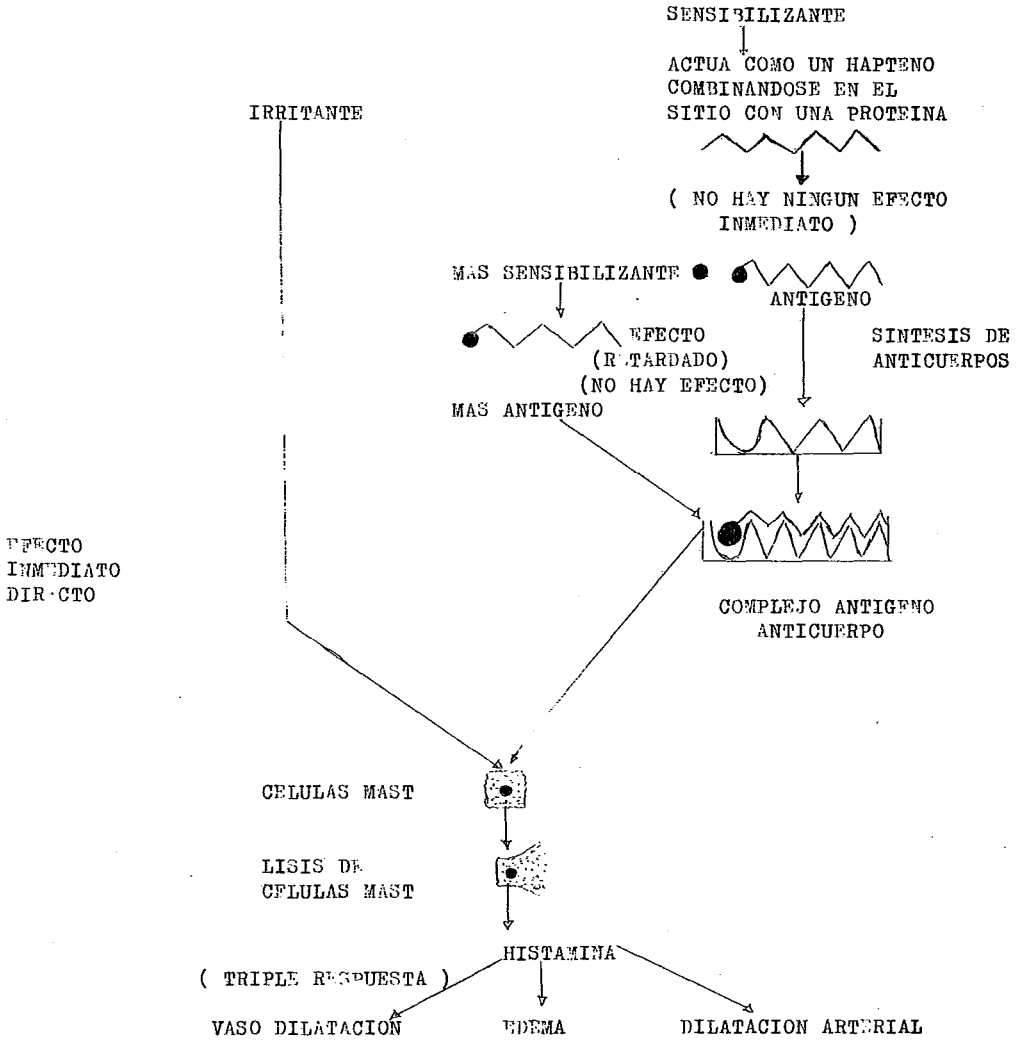
Numerosas pruebas han sido sometidas en animales y huma--  
nos los cuales se han sujetado a variaciones biológicas y sus-  
ceptibilidades de varias pruebas de dosis, duración del contac-  
to, frecuencia de aplicación, difíciles de decidir, ya que ---

solo el 0.01% de las referencias de daños producidos por las -  
substancias con lo cual en la mayoría de las pruebas implica -  
la carencia de irritación lo que significa que en una pobla---  
ción de cinco millones, el 5% de la población es adversamente-  
afectada. Inicialmente cada prueba requiere cerca de 30,000 su-  
jetos para ser satisfactoria.

El concepto de índice de sensibilización debe definirse -  
como la capacidad relativa de un producto químico para causar-  
sensibilización alérgica en la piel humana; el segundo concep-  
to es la diferencia entre el comportamiento de la piel normal-  
y el de una piel que sufre dermatitis de contacto causada por-  
irritación primaria o por alergia a otra sustancia previa; el  
tercer concepto es el uso correcto y la interpretación de las-  
pruebas de parche empleados en el diagnóstico de alergias cu-  
táneas. El uso de individuos normales y de concentraciones ---  
inadecuadas, ha hecho creer que algunos conservadores son to-  
talmente inocuos. Esto se debe a errores involuntarios en los-  
que se creyó necesario solo utilizar pacientes sanos y concen-  
traciones similares a aquellas recomendables para uso indus---  
trial, y a la creencia equivocada de que el producto debería -  
ser totalmente inocuo para ser útil. En la actualidad esto no-  
pasa de ser un ideal y el conocimiento de la capacidad aler---  
génica real de los conservadores ha proporcionado más ventajas  
que inconvenientes a los dermatólogos que tienen que tratar --  
los padecimientos ocasionales provocados por su utilización.

Algunos de los datos reportados en la literatura médica -  
sobre la alergenicidad o índice de sensibilización de conserva-  
dores establecidos sobre pacientes con dermatitis previas, son  
0.8% para derivados del ácido p-hidroxibenzoico, 0.3% en pa---  
cientes con eczema para ácido sórbico, 0.3% hexaclorofeno.

ESQUEMA No. 2



## 2.5 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Hasta hace poco La Cromatografía en Capa Fina se usaba -- solo para separar e identificar compuestos, esto se debía en -- parte por la falta de equipo adecuado para su desarrollo, obteniéndose determinaciones solo semicuantitativas. Conforme ha -- pasado el tiempo, se han diseñado técnicas más específicas pa-- ra cada caso obteniéndose buenos resultados.

Es por esta razón que se ha realizado este estudio en Cromatografía de Capa Fina, ya que es un método de separación de-- una mezcla en varios componentes. Esto crea un equilibrio heterogéneo estabilizador durante el flujo del solvente llamado -- " Fase Movil " a través de una " Fase Fija o Estacionaria ", -- para separar dos o más componentes del material a estudiar llevados por el solvente.

La Cromatografía por Adsorción, requiere un adsorbente el cual se aplica a un sostén o apoyo, que pueden ser :

- a) Placas de Vidrio ( más comunes )
- b) Placas de Plástico
- c) Placas de Aluminio

Cuyo tamaño varía, siendo las más generalizadas las de -- 20 x 20 cm.

Los adsorbentes o Fase Estacionaria pueden ser de diferentes clases :

- 1) Sílica Gel G
- 2) Sílica Gel G F <sub>254</sub> ( con indicador fluorecente )

- 3) Celulosa
- 4) Alúmina
- 5) Tierras Diatomeas.

Los materiales empleados para la Fase Estacionaria deben tener un tamaño de partícula uniforme; así como al distribuir el adsorbente sobre la placa, deben tener un determinado grosor que va de 0.1 a 1 mm. dependiendo del tipo de placa que se requiera emplear, para que puedan reproducirse los estudios a realizar.

En la Cromatografía por Capa Fina, la acción capilar en la fase estacionaria provoca el movimiento de la fase móvil a través del medio y a este proceso se le denomina desarrollo.

Adsorción Cromatográfica.- Es el proceso por el cual una muestra es separada por interacción entre fuerzas adsorbentes de un medio ( fase estacionaria ) y un solvente ( fase móvil ) La separación se logra pasando un solvente o fase móvil a través de la placa y la sustancia en estudio que se encuentra sola o en una mezcla de componentes es más fuertemente adsorbida por la fase estacionaria que los otros componentes de la mezcla. Ya que la adsorción es un fenómeno de superficie, el grado de separación depende del área de la superficie del adsorbente deseado. De aquí el énfasis de que las partículas del adsorbente sean de tamaño pequeño.

La naturaleza y composición química de la fase móvil se le determina por el tipo de sustancia a separar y el adsorbente

te empleado para la separación. La composición de la fase móvil puede ser simple como un solo solvente o como un complejo de tres o cuatro solventes conteniendo proporciones definidas. También se requiere del conocimiento de la polaridad de los solventes, un compuesto polar es aquel que se encuentra en la fase estacionaria puesto que una substancia no polar tiende a moverse apresuradamente en la fase móvil por lo que es menor en la fase estacionaria. De aquí la importancia en escoger adecuadamente el solvente o mezcla de solventes a emplear para obtener un buen desarrollo.

El cromatograma se desarrolla durante un determinado tiempo hasta la mitad de la placa o hasta el final de la misma, dependiendo del Rf. de la substancia.

El Rf. es un valor conveniente para expresar la posición de una substancia en un cromatograma desarrollado y es calculado como :

$$\text{Rf.} = \frac{\text{Distancia del origen al centro de la mancha}}{\text{Distancia del origen al frente del solvente}}$$

Los valores del Rf. se encuentran entre 0 y 0.999

Para elegir el tipo de fase estacionaria y fase móvil, hay que examinar las características de la muestra. La naturaleza de la muestra determina el adsorbente, sin embargo frecuentemente la muestra se sujeta a varias separaciones tales como extracción, filtración, centrifugación etc. para obtener una buena separación en Cromatografía de Capa Fina.

La muestra se aplica de 2 a 3 cm. de la orilla de la placa con micropipetas o con microjeringas, éstas últimas son las que más se emplean para trabajos cuantitativos.

Después el cromatograma es deshidratado o evaporado adecuadamente y las manchas pueden observarse bajo la luz ultravioleta o bien rociarse con una selección de reactivos específicos y no específicos con los cuales reaccionan las sustancias produciendo una coloración visible o fluorescente.

La urea comenzó a investigarse en combinación con aminoácidos, indoles e imidazoles, en sangre y orina de primates en Cromatografía de Papel. Posteriormente se fueron separando cada grupo y observaron que la urea interfería con los otros grupos por lo que se trató de investigar si se separaba mejor con otro tipo de cromatografía y así se estudió en Cromatografía de Capa Fina empleando placas de Celulosa. Se obtuvo una buena separación, solo que variaba un poco el Rf. cuando provenía de materiales naturales; sin embargo con una mezcla de materiales sintéticos muestra una buena correspondencia. Obteniendo una comparación de ambos métodos en urea encontramos que:

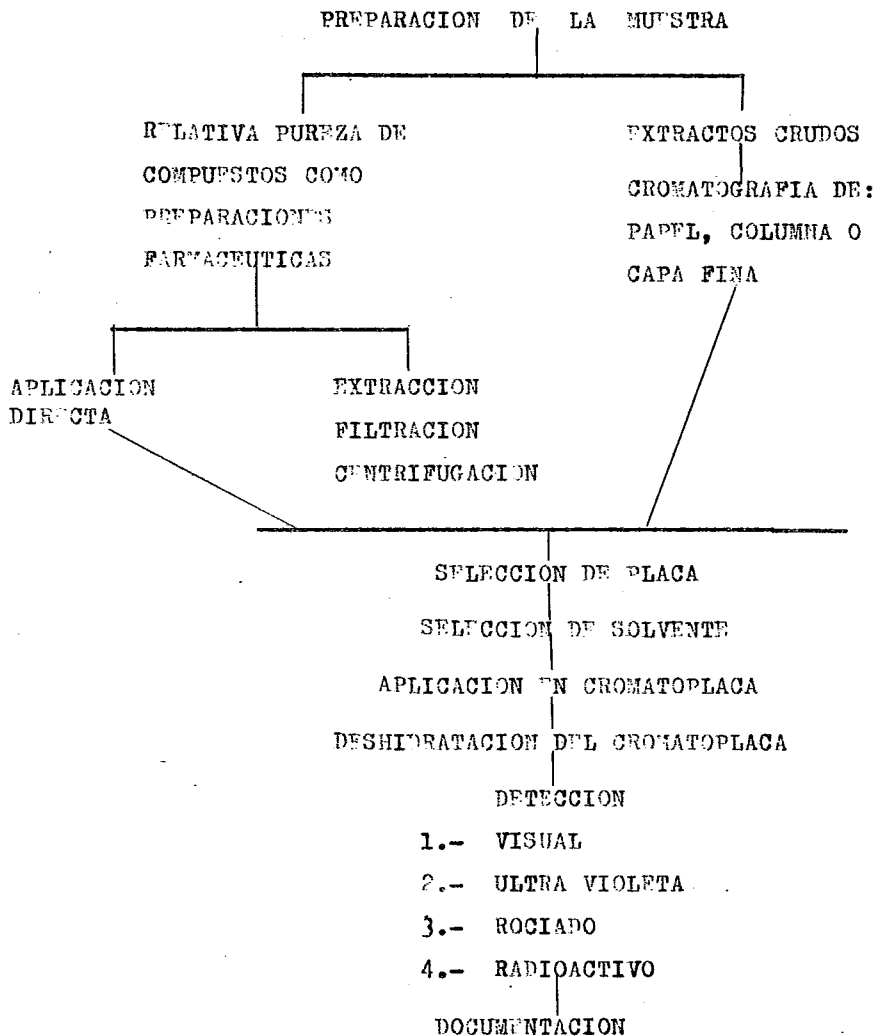
- a) La cromatografía en papel, los métodos son simples y baratos, pero también tardados, ya que el tiempo usual de desarrollo es de aproximadamente de 24 horas.
- b) En cromatografía de capa fina, la celulosa es el material que corre más rápidamente; los colores de las manchas en general son considerablemente más estables que en cromatografía de papel.

Otra ventaja de la cromatografía en capa fina, es que se pueden aplicar pequeñas cantidades conteniendo urea observándose manchas claras y definidas.

A continuación se presenta un esquema general de los procesos que se llevan a cabo hasta obtener un análisis cuantitativo por cromatografía en capa fina.



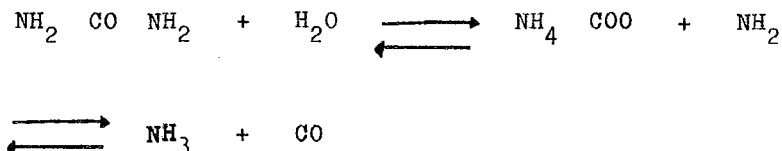
ESQUEMA No. 3



Se ha demostrado que la urea en un excipiente como la crema antes citada se encuentra en óptimas condiciones, sin embargo la urea en soluciones acuosas presenta un problema que es el de la hidrólisis, la cual aumenta con el calentamiento, así como los ácidos y álcalis también aumentan este rango de hidrólisis.

La hidrólisis de urea en varios medios acuosos ha sido ampliamente estudiada, incluyendo los más recientes en cuanto a la naturaleza de la reacción de hidrólisis.

En la degradación de urea, ésta se transforma en :



Se ha observado en estudios anteriores que la conductividad específica de soluciones de urea incrementan linealmente con el tiempo. Posteriormente notaron que el rango de incremento en la conductividad específica es proporcional al producto de la viscosidad relativa por concentración de urea. Aparece entonces que la degradación de urea sigue una cinética de Primer Orden tanto en soluciones diluídas como concentradas.

En los estudios realizados anteriormente se ha encontrado que el rango de degradación disminuye en función del tiempo; esto sugiere que la reacción reversible es un factor importante en la degradación de soluciones de urea.

### III PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 EQUIPO Y MATERIAL.

EQUIPO.

Espectrofotómetro de luz Ultravioleta y Visible

Unicam S.P. 800

Balanza Analítica

Unimatic Instruments Stanton

Potenciometro

pH asar I Digital Meter

Beckman Scientific Instruments.

Viscosímetro

Brookfield L.V.T.

Placas para Cromatografía en Capa Fina de Celulosa 300 mm.

Aspersor de Placas de Cromatografía de 125 ml.

Microgeringa.

#### MATERIAL

Material de vidrio utilizado comunmente en los laborato--  
rios de control analítico de medicamentos.

#### PREPARACION DE LAS PLACAS DE CELULOSA 300 mm.

Se mezclan 15 g. de Celulosa con 100 ml. de agua destilada en un matraz de bola de 250 ml. y se agita de 30 a 60 segundos. Se mezclan suavemente para tener una mejor hidratación y evitar la formación de burbujas de aire. Posteriormente se distribuye sobre las placas de vidrio de 20 x 20 cm. con un carro esparcidor dejando las mismas con un grosor de 0.3 mm. ; deshidratar con aire y no activarlas con calor.

### 3.2 SISTEMAS UTILIZADOS.

Al fabricar la crema cuya fórmula ya ha sido indicada en la sección 2.3, se observó que el pH inicial es de 6.5 y conforme va pasando el tiempo el pH obtenido aumentó hasta 9.

Esto probalmente se deba a la degradación de la urea. -- por lo que se seleccionó el método de Cromatografía en Capa Fina, para detectar dicha degradación.

Para poder elegir el mejor sistema para el desarrollo del cromatograma, se probaron diferentes tipos de adsorbentes, solventes y reveladores, obteniéndose los siguientes resultados:

#### SOLVENTES:

- S<sub>1</sub> .- Bu A N. Butanol - Acido Acético - Agua ( 60:15:25 )  
S<sub>2</sub> .- Bu P N. Butanol - Piridina - Agua ( 60:60:60 )  
S<sub>3</sub> .- I Pr Am Isopropanol - Agua - Amoníaco ( 200:20:10 )  
S<sub>4</sub> .- Pr A N. Propanol - Acido Acético 1N ( 3 : 1 )  
S<sub>5</sub> .- Pr Am N. Propanol - Amoníaco ( 3 : 1 )  
S<sub>6</sub> .- Bu A D N. Butanol - Acetona - Dietilamina-( 70:70:14:35 )  
Agua  
S<sub>7</sub> .- M A Metanol - Amoníaco ( 60 : 75 )

#### REVELADORES:

- D<sub>1</sub> .- Luz Ultravioleta  
D<sub>2</sub> .- Nitrato de Plata.- El cromatograma se rocía con una solución saturada de Nitrato de Plata en acetona. Calentar a 105° C. por 15 minutos.

C U A D R O No. 1

PLACA	SOLVENTE	REVELADOR	RESULTADOS
SILICA GEL G F 254	Bu A	Luz U. V.	No se observa ninguna macha
	Bu P	"	"
	I Pr Am	"	"
	Pr A	"	"
	Pr Am	"	"
	Bu A D	"	"
	M A	"	"
SILICA GEL G	Bu A	D <sub>4</sub>	Se observan las manchas claramente, pero <u>desapa</u> recen rápidamente.
	Bu P	D <sub>3</sub>	
	I Pr Am	D <sub>2</sub>	
	Pr A	D <sub>3</sub>	
	Pr Am	D <sub>4</sub>	
	Bu A D	D <sub>4</sub>	
	M A	D <sub>2</sub>	
CELULOSA	Bu A	D <sub>4</sub>	Se observan <u>clara</u> Rf. 0.54 mente las manchas Rf. 0.48
	Bu P	"	
	I Pr Am	"	
	Pr A	"	
	Pr Am	"	
	Bu A D	"	
	M A	"	

- D<sub>3</sub> .- Ferricianuro con Nitroprusiato.- Iguales volúmenes al-  
10% en soluciones acuosas de Ferricianuro de potasio, -  
Nitroprusiato de sodio e hidróxido de sodio, se mezclan  
Después de 15 a 20 minutos, el color de la solución se-  
torna amarilla y esta solución se emplea para rociar el  
cromatograma.
- D<sub>4</sub> .- p-Dimetilaminobenzaldehído.- Se disuelve 1.0 g. de p-  
dimetilaminobenzaldehído en 50 ml. de metanol, se adi-  
ciona 10 ml. de ácido clorhídrico y se afora a 100 ml.  
con metanol.

### 3.3 DETERMINACIONES EN CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

De acuerdo con los resultados obtenidos, el sistema que se seleccionó y utilizó para este estudio es el siguiente:

Placas.- Celulosa

Sistema.- N. Butanol - Acido Acético - Agua ( 60:15:25 )

Revelador.- Por rociado con p-Dimetilaminobenzaldehído

Tiempo para Ascender.- 4 horas.

Temperatura.- Temperatura ambiente 25<sup>o</sup> C.

Preparación de la Substancia de Referencia:

#### 1. Substancia de Referencia

Se pesó 50 mg. de urea substancia de referencia y se pasaron a un matríz volumétrico de 1 ml., se disuelve y se afora con agua destilada.

Se tiene una concentración de :

50 mg. ————— 1 ml.          50 mg. / ml.

#### 2. Substancia de Referencia con la Crema.

Se preparó la crema sin adicionarle urea. A 100 ml. de la crema antes mencionada, se le incorporó 10 g. de urea-Substancia de Referencia.

De esta crema, se pesó el equivalente a 5 g. de urea y se prosigió al igual que la muestra.

Procedimiento:

Pesar una cantidad equivalente a 5 g. de urea en un vaso de precipitados, pasarlos a un embudo de separación de 250 ml.



agregar 50 ml de agua destilada y agitar. Extraer con 5 porciones de 25 ml. de cloroformo; desechar los extractos clorofórmicos. La solución acuosa, se pasa a un matraz volumétrico de -- 100 ml., aforar con agua destilada, se agita y se filtra a través de papel Whattman No. 42.

De esta solución se miden 60  $\mu$ l. y se aplican a una placa con celulosa, preparada un día antes.

Hasta aquí se tiene la siguiente concentración:

5g. ----- 100 ml.                      50 mg. / ml.

De esta solución se aplican :

60  $\mu$ l. ----- Aplicar                      3 mg.

La misma cantidad que se pesó de muestra se pesa de la -- crema sin urea para tenerla como un blanco. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento que la muestra. El objeto de --- aplicar este blanco es para saber si presenta una absorción en el espectro.

Se aplican en forma similar Sustancias de Referencia, -- Mustras y Blanco a dos placas. También se deja un canal de cada placa vacío con el fin de tener un blanco de la fase estacionaria, en este caso Celulosa. Se prepara este blanco de Celulosa con el objeto de observar si interfiere presentando una absorción en el espectro.

Las dos placas se colocan en un ángulo ligero en la misma cámara cromatográfica previamente saturada, dejándose desarrollar el cromatograma por un tiempo de 4 horas.

Posteriormente se sacan las placas y se dejan secar.

Una de las placas se reveló por rociado con el reactivo - de p-dimetilaminobenzaldehído y se observó el lugar donde aparecen las manchas, así también se determinó el Rf. de la sustancia de referencia y las muestras.

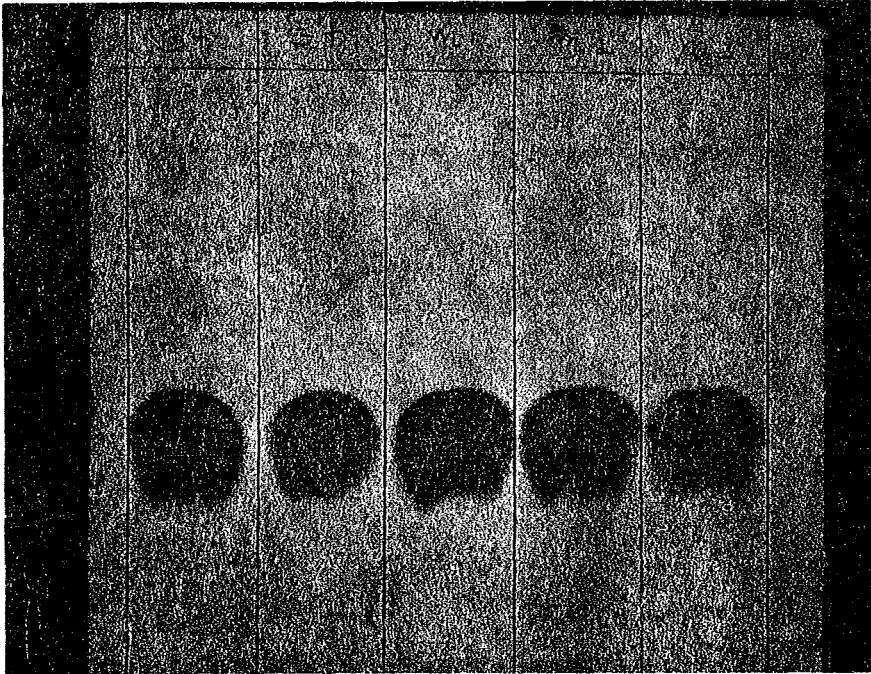
Por otra parte, en la placa que no se revela, se trazan - dos líneas limitando la zona donde aparecen las manchas al revelarlas. Se raspan cuidadosamente y se vacía la celulosa a un matríz erlenmeyer de 25 ml. en el cual se disuelve la urea al adicionar 10 ml. de agua, se agita y se filtra. La solución se pasa cuantitativamente a un matríz volumétrico de 25 ml. Se -- adicionan 10 ml. del reactivo p-dimetilaminobenzaldehído, se - agita y se afora con agua. Se espera exactamente 10 minutos, - después de los cuales se lee a una longitud de onda de 420 nm. en un Espectrofotómetro Ultravioleta y Visible.

La concentración final es de :

3 mg. ----- 25 ml.      120 mcg/ ml.

A continuación se presenta una fotografía de la placa que se reveló, observándose la posición de las manchas.

FOTOGRAFIA DE LA PLACA REVELADA



DETERMINACIONES EFECTUADAS EN LA  
LOCION CREMA.

No. DE MUESTRA Y LOTE	DETERMINACION DE pH	VISCOSIDAD	Rf. ENCONTRADO
1 ( L 37 )	6.5	4562	0.55
2 ( S 19 )	7.5	4565	0.55
3 ( T 72 )	7.8	4570	0.55
4 ( U 52 )	8.0	4552	0.55
5 ( X 69 )	8.2	4560	0.55
6 ( Z 91 )	8.5	4565	0.55

Los resultados obtenidos en la determinación de urea por espectrofotometría ultravioleta fueron los siguientes:

	Absorciones	Por ciento Encontrado
St.	0.440	
m <sub>1</sub>	0.440	100.0 %
m <sub>2</sub>	0.490	111.3 %
m <sub>3</sub>	0.540	122.7 %
m <sub>4</sub>	0.615	139.7 %
m <sub>5</sub>	0.745	169.3 %
m <sub>6</sub>	0.790	179.5 %

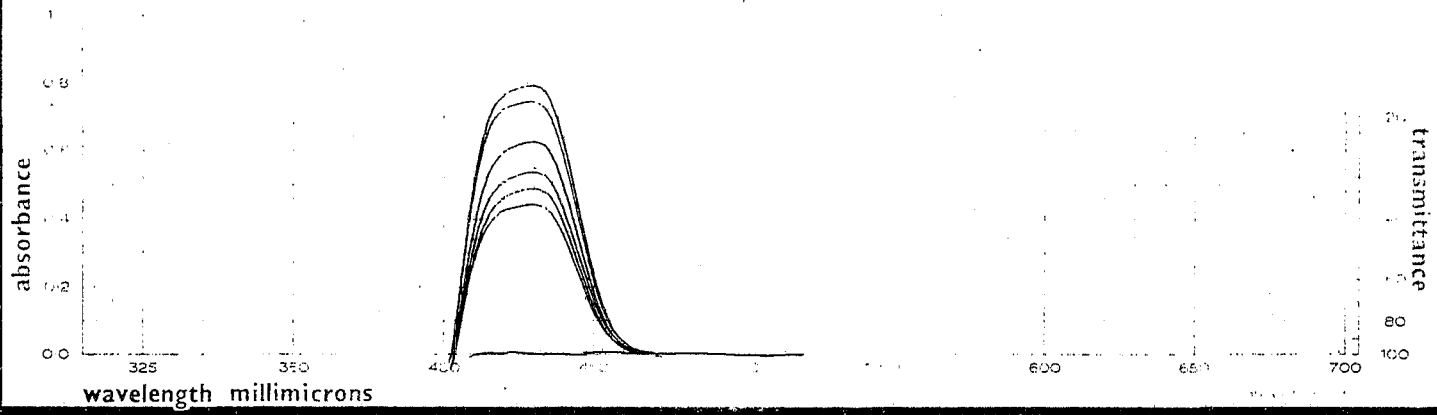
#### COMENTARIO

Los resultados obtenidos en la determinación de urea en las muestras, no corresponden a la cuantificación de ésta, -- sino a su degradación.

CURVA ESTANDARD  
DE  
U R E A



GRAFICA CORRESPONDIENTE  
 A LA CUANTIFICACION DE  
 LAS SEIS MUESTRAS



ALIGN WITH INDEX  
 ON THE RED POINTER

SAMPLE AND CELL NO.

WAVELENGTH  
 IN MILLIMICRONS

SWAN FREED FAULT  SLOW   
 DATE  
 MM INDIATOR

REF NO

M E T O D O    N o .    I I

DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

PRIMERA PRUEBA:

Método de Membrana

Detección de Hongos y Bacterias

- 1.- Medio de Cultivo:   Fluido de Sabouraud  
                          Dextrosa Agar

Preparación del Medio de Cultivo:

Suspender 65 g. del polvo en un litro de agua destilada, -mezclar perfectamente hasta obtener una solución, se calienta-agitando frecuentemente dejando hervir durante cinco minutos.

Se distribuye 40 ml. en tubos de 200 x 35 mm. pyrex con -tapa de acero inoxidable, anteponiendo una corunda.

Esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 121<sup>o</sup> C. y-a 15 lbs. de presión.

- 2.- Medio de Cultivo:   Medio Fluido de Tioglicolate- 30g.  
                          Polisorbato Tween 80           - 30 ml  
                          Asolectín                         - 5g.  
                          Agua destilada                   1000 ml

Se disuelve calentando y agitando frecuentemente, hervir -durante 5 minutos y dispersar 40 ml. en tubos de ensayo de ----



200 x 120 mm. pyrex con tapa de acero inoxidable, anteponiendo una corunda.

Esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 121° C. y a 15 lbs. de presión.

Una vez que los tubos han sido esterilizados, agitarlos -- enérgicamente para disolver el polisorbato acumulado en la parte baja del tubo.

Los tubos de ensaye deberán estar previamente estériles;-- se esterilizan por calor seco durante 2 horas a 180° C.

#### Solución Lavadora.

Preparación:	Peptona	-----	0.1 %
	Polisorbato Tween 80	-----	0.1 %

Se disuelve y se dispersa en frascos de vidrio neutral de 140 x 50 mm. con tapa de metal.

Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121° C. y a 15 lbs. de presión.

#### Cultivo de la Muestra:

Trabajando con material y equipo estéril, bajo una campana de flujo laminar, se analizaron seis muestras diferentes de la crema. Se tomaron 10 ml. de cada muestra y se filtraron a través de una membrana de 0.45 micras, posteriormente se lavó con tres porciones sucesivas de 20 ml. de la solución lavadora.

Con unas pinzas se partió a la mitad la membrana, una de ellas se vació a uno de los tubos que contenía el Medio de --- Sabouraud y la otra mitad se introdujo a uno de los tubos que contenía el Medio de Tioglicolate. Se agitaron ligeramente los tubos y se incubaron.

Se dejó un tubo de cada medio sin abrir, con el fin de tenerlos como testigo, se incuban al igual que los demás tubos y se observan.

Los tubos con Tioglicolate se dejan incubar a 37° C. durante siete días observándolos diariamente para ver si no hay desarrollo.

Por otra parte, los tubos con el Medio de Sabouraud se incubaron también a temperatura ambiente durante 14 días, observándose diariamente si el líquido presenta turbiedad.

No debe desarrollar ninguna burbiedad ya que esto indica el desarrollo microbiano.

SEGUNDA PRUEBA:

Medio de Cultivo: Agar Soya - Trypticase

Preparación del Cultivo:

Suspender 8 g. del polvo en un litro de agua destilada.

Se disuelve calentando y agitando constantemente, dejándo se hervir durante cinco minutos.

Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121<sup>o</sup> C., 15 libras de presión.

Cultivo:

Se analizaron seis muestras diferentes de la crema, de -- las cuales se efectuaron dos diluciones de cada una 1:10 y --- 1:100 con solución buffer de fosfatos pH 7.5

Se tomó 1 ml. de la primera dilución y se colocó en una - caja Petri previamente esterilizada; de igual forma se trabajó con la segunda dilución y posteriormente se adicionó a cada ca ja 20 ml. del medio de Agar Soya previamente fundido, se mez-- cló y se dejó solidificar.

Se deja una caja sin cultivo como testigo.

Posteriormente se incuban a 37<sup>o</sup> C. por 72 horas.

Pasado este tiempo, se saca un promedio de las colonias - desarrolladas en cada caja de diferente dilución.

TERCERA PRUEBA:

Medio de Cultivo: Agar

Preparación del Cultivo:

Suspender 30.5 g. de polvo en un litro de agua destilada. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante - cinco minutos.

Dispersar en tubos pyrex 10 ml. del medio, tapando cada - uno con tapón de vakelita.

~~Est~~erilizar por autoclave durante 20 minutos a 121<sup>o</sup> C. y-a a 15 lbs. de presión.

U

Una vez estériles los tubos, se mantienen en posición in- clinada y se espera a que solidifiquen en 30 minutos.

Cultivo:

Al igual que el análisis anterior, se preparó bajo una -- campana de flujo laminar dos diluciones de cada muestra 1:10 y 1:100 con solución buffer de fosfatos pH 7.5

Se formaron cuatro series de tres tubos, con 10 ml. del - medio de Agar en cada tubo.

La primera serie se inoculó con 1 ml. de la muestra di--- luída 1 : 10.

La segunda serie se inoculó con 1 ml. de la muestra di--- luída 1 : 100.

La tercera serie se inoculó con 1 ml. de una cepa de Es-- cherichia coli que contenía 150,000 microorganismos por mililii

litro.

La cuarta serie se dejó sin inocular para tenerla como testigo.

Se incubaron a  $37^{\circ}$  C. durante 48 horas, después de las cuales se observaron los tubos para ver el desarrollo bacteriano.

## DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

## DETECCIÓN DE

MEDIO DE CULTIVO	BACTERIAS	HONGOS	
SABOURAUD		No hubo desarrollo	
TIOGLICOLATO	Se observó un crecimiento bacteriano, por lo que se realizó un frotis y una tinción de Gramm encontrándose microorganismos :	No. DE COLONIAS	
	Gramm negativos	DILUCIONES	
	Streptococos	1 : 10	1 : 100
AGAR SOYA		50x10 = 500	4x100 = 400
TRIPTICASE		53x10 = 530	7x100 = 700
		49x10 = 490	4x100 = 400
		30x10 = 300	5x100 = 500
		54x10 = 540	3x100 = 300
		38x10 = 380	6x100 = 600
AGAR NUTRITIVO	No pudo reproducirse		

## V CONCLUSIONES

De acuerdo con los estudios realizados se puede concluir lo siguiente:

Las condiciones utilizadas para el análisis de urea por Cromatografía en Capa Fina en este trabajo, pueden emplearse como un método de identificación, más no para cuantificar, ya que los reactivos empleados para formar el complejo y poder detectar el principio activo reacciona con todos los grupos amino, esto significa que en el método utilizado también cuantificará el amoniaco liberado, siendo éste un producto de degradación.

La liberación de amoniaco produce una alcalinización en la crema, que puede ser producida por diferentes factores entre los cuales se encuentra la contaminación microbiana.

En las determinaciones microbiológicas realizadas, se pudo observar, que el producto se encuentra contaminado por microorganismos patógenos, aún en las pruebas practicadas con diluciones más grandes.

De acuerdo a todos estos resultados podemos decir que desde la elaboración del producto éste estuvo expuesto a diferentes factores contaminados como pueden ser: materias primas contaminadas, equipo, personal, areas de trabajo, así como también uno de los factores que más afectan que es el envase, los cuales por lo general no se lavan adecuadamente, sino que solo

se soplétean pudiendo quedar partículas de polvo que en algunos casos contienen microorganismos patógenos que producen -- tales efectos indeseables.

Por lo que se suquiere que este tipo de productos sea -- elaborado de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura, -- para obtener un productos que cumpla su cometido.



## VI BIBLIOGRAFIA

- G. Touchstone Joseph and Murrell F. Dobbins  
Practice of Thin Layer Chromatography  
London 1978,  
p. 21 - 53
  
- De la Paz Alvaro  
Microbiología en los Cosméticos  
Rev. Perfumeria Moderna.  
p. 6 - 17 1978
  
- E. Richard Lindstrom and Alexander R. Giaquinto  
Salt Effects in Aqueous Solutions of Urea  
J. of Pharmaceutical Soc.  
1970 , 11 , 59  
p. 1622 - 1629
  
- F. M. Pope Et al.  
J. Dermatologi  
1972 , 86 , 291
  
- Harry L. Welles, Alexander R. Giaquinto and Richard E.  
Lindstrom.  
Degradation of Urea in Concentrated Aqueous Solution  
1971 , 8, 60  
p. 1213 - 1215
  
- 
  
- J. Asmeyda and L. Fry.  
Br. J. Dermatologi  
1973, 88, 493
  
- K. Crece Et. al  
Acta Dermvener Stoch  
1973 , 53 , 14
  
- Lachman Leon, Lieberman, A. Herbert  
The Theory and Practice of Industrial Pharmacy  
Philadelphia 1970.
  
- Litter Manuel  
Farmacología 5 a. Ed.  
Buenos Aires, Editorial Ateneo 1975

- Repart. No. 179 of The General  
Practitioner Research  
1973 , 21o , 294
- Rosten M. Aust.  
J. Dermatologi  
1970 , 11 , 142
- T. C. Hidoon, Archs.  
Archs. Derm.  
1971 , 45 , 530.
- Viglioglia Pablo Alberto y Rubin Jaime  
Enfoque Médico Y Cosmetológico de la Urea  
Cosmetics and Perfumery  
Ed. Ibero - Latino Americana 1975  
Buenos Aires  
p. 29 - 52
- Smith I. Rider J., J. Linda Rider and Richard Lerner.  
Cromatography of Amino - acids, Indoles and Imidazoles  
on Thin Layers of Avicel and Cellulose and on Paper.

