

35

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"



## **"IMPORTANCIA DE LOS ESTERES DEL ACIDO P-HIDROXIBENZOICO EN LAS INDUSTRIAS FARMACEUTICA Y COSMETICA"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
**MARIA LUISA MENESES ALANIS**

DIRECTOR DE TESIS:  
Q.F.I. JUAN JOSE DIAZ ESQUIVEL



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 está 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.

## I N D I C E

		PAGINA
CAPITULO	I. INTRODUCCION	1
CAPITULO	II. OBJETIVOS	4
CAPITULO	III. GENERALIDADES	5
	1. IMPORTANCIA DE LOS PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS	9
	2.1 TIPOS DE PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS - UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA	11
	2.2 TIPOS DE PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS - UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA COSMETICA	14
	3. PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS MAS UTILIZADOS EN LAS INDUSTRIAS FARMACEUTICA Y - COSMETICA	16
	4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE UN PRESERVATIVO ANTIMICROBIANO	18
	5. PRUEBA DE EFECTIVIDAD	27
	6. SELECCION DE UN PRESERVATIVO ANTIMICROBIANO	30
CAPITULO	IV. ESTERES DEL ACIDO PARA-HIDROXIBENZOICO (Parabenos)	
	1. INTRODUCCION	32
	2. ASPECTOS HISTORICOS	35
	3. OBTENCION	40
	4. PROPIEDADES	
	4.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	45
	4.2 PROPIEDADES TOXICOLOGICAS	56
	5. MECANISMO DE ACCION	66
	5.1 ACTIVIDAD ANTIFUNGICIDA	66

5.2	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	68
6.	CUANTIFICACION	70
7.	APLICACIONES	72
7.1	APLICACIONES FARMACEUTICAS	75
7.2	APLICACIONES COSMETICAS	79
CAPITULO V.	COMENTARIOS	82
CAPITULO VI.	RESUMEN	84
CAPITULO VII.	BIBLIOGRAFIA	87

# C A P I T U L O

I

## CAPITULO I. INTRODUCCION.

Los productos farmacéuticos y cosméticos estan sujetos a la deterioración por los microorganismos que actúan como agentes catalíticos en las reacciones de descomposición. Estos microorganismos pueden ser hongos, levaduras y bacterias y deben ser destruidos o inhibir su reproducción ya sea por esterilización y/o con la adición de preservativos antimicrobianos (1).

La deterioración se refiere a una contaminación microbiológica de los productos antes mencionados, cuyo término se aplica a la presencia de microorganismos patógenos o de otro tipo, siempre y cuando representen un peligro para la integridad física del usuario, en tanto que el término contenido microbiológico, se refiere a la presencia de microorganismos saprófitos o -- inocuos al individuo; por lo tanto una contaminación microbiológica, se manifiesta siempre por un contenido microbiológico, pero éste no siempre produce contaminación, ejemplo, flora normal, contenido microbiológico de la piel (2).

Si la contaminación es debida a microorganismos patógenos, tales como *Pseudomona aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, existe la posibilidad de que el consumidor se perjudique durante el uso de un producto (6).

El término esterilización, implica la eliminación total de los microorganismos viables en un material determinado -- (4,8).

Puede ser que un producto farmacéutico o cosmético, -- sea utilizado en el menor tiempo posible por el consumidor, pero también puede suceder lo contrario, en cuyo caso se debe tratar de estabilizar el producto y prevenirlo de cambios por largos -- períodos de almacenamiento y bajo la exposición de diversas variaciones de clima (2,7).

La preservación de un producto farmacéutico o cosmético, implica retardar o evitar su deterioro -el cual se presentaría en el caso de que la cantidad de gérmenes se encontrase por encima de su tolerancia- desde que se fabrica, hasta que el consumidor utiliza todo el contenido del envase (2,7).

Las preparaciones conteniendo agua, son particularmente susceptibles al ataque por microorganismos y si no se verifica el crecimiento, pueden resultar cambios adversos en la naturaleza de la preparación (3).

Por ejemplo, se pueden contaminar fácilmente las emulsiones con alto contenido de agua y sobre todo, si la formulación contiene carbohidratos, proteínas o esteroides (3).

En los medicamentos y cosméticos acuosos y aun en los que se encuentran libres de agua, puede existir contaminación, ya que en ellos crecen levaduras, hongos y bacterias a menos de que en su formulación vaya incluido un preservativo antimicrobiano adecuado (6).

Los preservativos antimicrobianos, se incluyen en las formulaciones de medicamentos y cosméticos, para reducir la probabilidad de crecimiento en las preparaciones acuosas y para reducir también la posibilidad de que exista una persistencia microbiana en las preparaciones secas (6).

Los ésteres alifáticos del ácido para-hidroxibenzoico, son un ejemplo de preservativos antimicrobianos empleados en la conservación de productos farmacéuticos y cosméticos.

La estabilización y preservación de un producto farmacéutico o cosmético, significan lo mismo, ya que el término preservación, no es mas que la justa estabilización de un producto contra el ataque de los microorganismos (2).

Un Preservativo Antimicrobiano\* (que es sinónimo de -- Preservativo Químico, Agente Antimicrobiano, Conservador o simplemente Preservativo), actúa sobre células vivas y es aquel material que reacciona previniendo el crecimiento o destruyendo a los microorganismos que pueden afectar en primer término al consumidor del producto (ya sea farmacéutico o cosmético) y a la -- estabilidad de este último, la cual puede verse comprometida si la calidad y cantidad de microorganismos se encuentran por encima de los límites permisibles, en donde la contaminación puede llegar a ocasionar cambios definitivos irreversibles en las características del producto (2.6).

\*Para efecto del presente trabajo, se empleará la expresión: **Preservativo Antimicrobiano.**



C A P I T U L O

I I

## CAPITULO II. OBJETIVOS.

Al tener gran importancia los Preservativos Antimicrobianos en la conservación de diferentes productos y ya que la información sobre el tema se encuentra dispersa, se persiguen los siguientes objetivos en este trabajo de tesis:

1) Realizar una investigación bibliográfica, dando un panorama general de los preservativos antimicrobianos, profundizando sobre un tipo específico de los mismos, los Esteres del Acido Para-Hidroxibenzoico (Parabenos).

2) Hacer una recopilación de la información que existe de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, utilizados en la preservación de productos farmacéuticos y cosméticos.

3) Buscar posibles reacciones tóxicas sobre piel producidas por presentaciones tópicas, así como posibles incompatibilidades de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico con los excipientes que se utilizan en la elaboración de los productos antes mencionados.

C A P I T U L O

III

## CAPITULO III. GENERALIDADES.

El uso de sustancias químicas, tales como el cloruro de sodio para preservación de productos alimenticios por ejemplo, es un procedimiento que se ha venido llevando a cabo desde tiempos remotos (9).

Asimismo, el llamado curado de carnes utilizando el vinagre, se acostumbra desde hace mucho tiempo (9).

El hecho de preservar las formulaciones de productos farmacéuticos y cosméticos -objeto de este estudio-, ha surgido de la necesidad de protegerlas de la contaminación microbiológica, la cual puede ocasionar cambios de color, de viscosidad, mal olor, puede asimismo, descomponer una emulsión -por ejemplo-, afectar la actividad de los excipientes incluidos y en general deteriorar dichas formulaciones, llegando inclusive a producir con ello riesgos en la salud.

Un Preservativo Antimicrobiano, es la parte vital de una formulación para asegurar que un producto mantendrá predeterminados estándares microbiológicos, desde el proceso de manufactura hasta que es usado (13).

Los preservativos antimicrobianos, se incluyen en las preparaciones farmacéuticas y cosméticas cuando es necesario -- combatir los efectos de la contaminación por microorganismos, los cuales se pueden encontrar en los ingredientes o introducirse durante el proceso de producción o durante el uso (3).

Un Preservativo Antimicrobiano, es aquel material que previene el crecimiento de microorganismos o que reacciona destruyéndolos y que pueden dañar un producto farmacéutico o cosmético al crecer en él (10).

Las preparaciones farmacéuticas que requieren un preservativo antimicrobiano, pueden ser clasificadas en dos grupos:

El primer grupo, consta de preparaciones tales como -- productos parenterales y oftálmicos que son considerados productos estériles y son mantenidos en envases multidosis (18).

La función de un preservativo antimicrobiano en una -- preparación de este grupo, es para mantener la esterilidad y -- asimismo al usarlo se tenga la seguridad de que no va a ocasionar daños en el usuario y por supuesto debe ser efectivo contra una amplia variedad de bacterias patógenas y hongos (18).

Algunos preservativos antimicrobianos usados en este -- grupo de preparaciones son: alquil ésteres del ácido para-hidro-xibenzoico, fenol, cloruro de benzalconio, etc. (63).

El segundo grupo, consta de aquellas preparaciones que no son consideradas productos estériles e incluye la mayoría de preparaciones apropiadas para uso oral o externo (63).

La función de un preservativo antimicrobiano en una -- preparación de este grupo, es inhibir el crecimiento de hongos y otros microorganismos que pueden introducirse durante la preparación y uso (18).

El crecimiento microbiano, normalmente es menos probable que sea peligroso en este grupo de preparaciones que en las anteriores, pero puede ocasionar considerable deterioración de las mismas; no obstante, es deseable que todos los medicamentos esten libres de microorganismos patógenos tales como *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. La preservación efectiva de cremas y otras preparaciones tópicas que son aplicadas, es especialmente importante (18).

Se debe tomar especial cuidado para evitar la contaminación en la preparación, administración, dilución y empaque de tales productos (18).

Algunos preservativos antimicrobianos que son usados en este grupo, (además de que se pueden utilizar también los compuestos del primer grupo) son: alcoholes, ácido benzoico, cloroformo, etc.

Las preparaciones cosméticas, como se mencionó en un principio, también están sujetas a contaminación microbiológica (10).

Ciertos efectos indeseables se presentan en los productos cosméticos por el crecimiento de microorganismos, por ejemplo en emulsiones se incluye: separación física de fases, decoloración, formación de gas, olor fétido y cambios en sus propiedades reológicas (1,5).

Los cosméticos acuosos pueden soportar el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias si no tienen un preservativo antimicrobiano apropiado en su formulación (10).

Los cosméticos secos como mascararas, sombras para ojos, polvos, etc., están sujetos también a la contaminación con el uso continuo (10).

Existe la posibilidad de que el consumidor se perjudique durante el uso subsecuente de estos productos, si la contaminación se debe a microorganismos patógenos (10).

Los preservativos antimicrobianos, se incluyen en las formulaciones cosméticas para reducir la posibilidad del crecimiento de microorganismos en productos acuosos y también la posibilidad de una persistencia microbiana en preparaciones secas (6).

Algunos de los preservativos antimicrobianos utilizados en las preparaciones cosméticas, son: alquil ésteres del ácido - para-hidroxibenzoico, ácido sórbico, etc.

### III.1. IMPORTANCIA DE LOS PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS.

En los últimos años se ha manifestado una seria preocupación por parte de productores e investigadores debido a los riesgos y peligros potenciales derivados de la contaminación microbiológica de preparados farmacéuticos y cosméticos; los riesgos y peligros se consideran desde dos puntos de vista, en primer lugar, en cuanto atañe al consumidor del producto, cuya salud puede afectarse y en segundo lugar, en lo que se refiere a la estabilidad del preparado, que puede verse comprometida si la calidad y cantidad de gérmenes se encuentra por encima de su tolerancia (18).

El farmacéutico a cuyo cargo se encuentra el diseño y la formulación de un producto debe procurar, que el mismo resulte adecuadamente preservado, que el sistema de preservación sea estable a lo largo de toda la vida útil del producto, desde su fabricación hasta su consumo, que se fabrique y controle con el nivel de higiene requerido y que el envase sea el adecuado para mantener su integridad microbiológica durante la vida de éste -- (18).

La preservación microbiológica, es un concepto que va mucho más allá de una simple adición de preservativos antimicrobianos a las formulaciones. Además de los requerimientos ya citados, existen factores que pueden influir en la integridad primaria de la fórmula; estos factores se vinculan al modo como se haga la selección y almacenamiento de materias primas, la fabricación y empaque del producto y el almacenamiento del producto terminado, los que deben cumplirse de modo tal que eliminen la posibilidad de una contaminación significativa en cualquiera de las etapas (18).

El análisis microbiológico de las materias primas y -- del producto terminado, es indispensable en el control de calidad para asegurar que los productos sean idénticos de partida a --



partida y que no haya variación importante en cuanto a estabilidad, seguridad y eficacia. Por razones obvias, el control debe extenderse a los procesos de fabricación, en los que debe evitarse cualquier posibilidad de contaminación y conducirse dentro de rigurosas y estrictas normas de higiene (18).

Por su propia naturaleza, los preservativos antimicrobianos actúan sobre células vivas y por lo tanto, deben ser controlados como tales por separado, pero también con la fórmula a la que se adicionan para poder determinar los efectos de toxicidad (5,18).

El número de preservativos antimicrobianos de que se dispone actualmente, se incrementa año con año; el farmacéutico - desde hace varias décadas, está empeñado en buscar este tipo de compuestos para medicamentos y cosméticos e investiga nuevas estructuras y sustancias al margen de las tradicionalmente usadas como el etanol, cloroformo, el ácido benzoico, el fenol, etc.

### III.2.1 TIPOS DE PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA (18,20,21).

Los tipos más comunes de preservativos antimicrobianos utilizados en preparaciones farmacéuticas estériles y no estériles son presentados a continuación:

#### PREPARACIONES ESTERILES:

Esteres del Acido Para-Hidroxibenzoico.- Son muy activos contra hongos y levaduras y menos efectivos contra bacterias, especialmente en los tipos gram negativos en concentraciones relativamente bajas. Son efectivos en un amplio rango de pH. Forman complejos con surfactantes no iónicos.

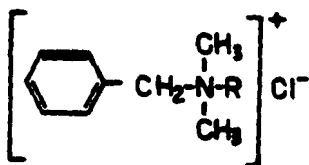


**R=Metilo, Etilo, Propilo ó Butilo**

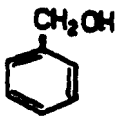
Fenol.- Es un buen preservativo bacteriostático, aunque su uso está limitado en preparados parenterales que se administran en volúmenes pequeños. Su olor, la irritación que provoca y su toxicidad, hacen que su uso sea restringido.



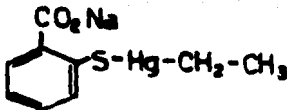
Compuestos Cuaternarios de Amonio.- Activos aun en bajas concentraciones contra bacterias gram positivas y gram negativas. Se considera que son los compuestos de selección para tales preparaciones.



Alcohol Bencílico.- Eficiente preservativo bacteriostático. Muy efectivo contra bacterias del tipo gram negativo.



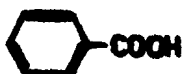
Thimerosal.- Es un poderoso preservativo antimicrobiano que se utiliza en concentraciones relativamente bajas. Comúnmente se usa como la sal de sodio.



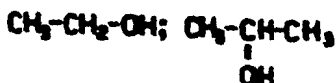
## PREPARACIONES NO ESTERILES:

Para este grupo de preparaciones se usan tanto los compuestos que se mencionaron anteriormente como los siguientes.

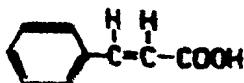
Acido Benzoico.-- Es un compuesto que se ha utilizado desde hace muchos años. Resulta mejor como preservativo fungicida que bactericida. Su actividad se ve reducida cuando aumenta el pH del medio.



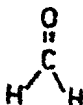
Alcoholes (Etilico e Isopropilico).-- Son muy efectivos contra una gran variedad de microorganismos. Actúan en un amplio rango de pH entre 4 y 9.



Acido Cinámico.-- Es más efectivo como preservativo fungicida que bactericida, poco soluble en agua. Al aumentar el pH, disminuye su actividad.



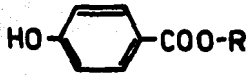
Formaldehído.-- Es un potente preservativo antimicrobiano. Es más efectivo contra bacterias que contra hongos. Se utiliza mucho en preparaciones cutáneas.



### III.2.2 TIPOS DE PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA COSMETICA (2,7).

Los tipos más comunes de preservativos antimicrobianos utilizados en preparaciones cosméticas son presentados a continuación:

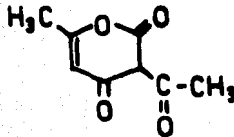
Esteres del Acido Para-Hidroxibenzoico.- Para-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo y butilo.



Acido Sórbico.- Es mejor como preservativo fungistático que bacteriostático y es más efectivo a pH ácidos que alcalinos. Es ligeramente irritante a la piel.



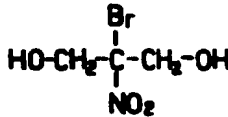
Acido Dehidroacético.- Es un preservativo antimicrobiano muy utilizado. Su actividad antimicrobiana se ve reducida al incrementar el pH del medio.



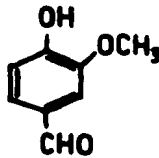
Orto-Fenilfenol.- Es efectivo contra hongos y bacterias, difícilmente causa irritación. Es inactivado por la presencia de surfactantes no iónicos.



Bronopol.- Se usa desde hace poco tiempo en la preservación de cosméticos y ha sido más aplicado en las formulaciones de shampoos. Es efectivo a pH de 5 a 8 y es particularmente activo contra bacterias gram negativas.



Vainillina.- Tiene propiedades bacteriostáticas. Ligeramente soluble en agua. En general, no es considerado compuesto tóxico.



### III.3. PRESERVATIVOS ANTIMICROBIANOS MAS UTILIZADOS EN LAS INDUSTRIAS FARMACEUTICA Y COSMETICA (2,7,15,16,17,18, 20,21).

Los grupos más importantes de preservativos antimicrobianos y algunos ejemplos típicos usados en emulsiones farmacéuticas y cosméticas, se enlistan en la siguiente tabla:

TIPO	EJEMPLO
Esteres	Para-hidroxibenzoato de metilo
	Para-hidroxibenzoato de propilo
	Para-hidroxibenzoato de butilo
Acidos	Acido benzoico
	Acido sórbico
	Acido dehidroacético
Aldehídos	Formaldehído
	Vainillina
Fenólicos	Fenol
	Orto-fenilfenol
Cuaternarios	Cloruro de benzalconio

La actividad de estos compuestos varía ampliamente y depende del microorganismo involucrado (15).

La concentración de preservativo antimicrobiano reque-

rida en una emulsión, depende en gran parte de su capacidad para interactuar con los microorganismos, ya que estos pueden residir en la fase acuosa o en la fase lipídica o en ambas; el preservativo antimicrobiano, independientemente de su coeficiente de partición agua/aceite, debe estar disponible a un nivel efectivo en ambas fases (15).

Es casi inconcebible que un solo preservativo antimicrobiano se pueda distribuir en concentraciones efectivas entre las fases, independientemente de su composición, por lo cual se acostumbra incluir un preservativo antimicrobiano que sea soluble en la fase acuosa y uno que sea soluble en la fase oleosa - (15).

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, son buenos ejemplos, ya que el metil parabeno es soluble en agua, mientras que el propil y butil parabenos, casi no lo son (15).



### III.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE UN PRESERVATIVO ANTIMICROBIANO.

Son muy variados los factores a cuya influencia están sujetos los preservativos antimicrobianos, a continuación se mencionan los más importantes:

a) Concentración.- La concentración, es obviamente una principal consideración; el preservativo antimicrobiano más concentrado, más efectivo será en su actividad contra una gran variedad de microorganismos (2).

Para obtener la protección adecuada de un producto farmacéutico o cosmético contra el crecimiento de todos los probables microorganismos que se encuentren presentes, es necesaria una concentración suficiente del preservativo antimicrobiano (2).

Wyss (22), enfatizó en que los microorganismos son complejos sistemas adaptados para sobrevivir continuamente en el medio ambiente disponible y que una mayor concentración del preservativo antimicrobiano, reduce la posibilidad de que el sistema microbiano sea capaz de desarrollar medios de resistencia.

La concentración del preservativo antimicrobiano, tiene que ser más bien letal que inhibitoria para los microorganismos (18).

El principal problema en la preservación de un producto farmacéutico o cosmético, es la producción de una concentración adecuada del preservativo antimicrobiano en la superficie de las células microbianas; es decir, lo importante no es la concentración del preservativo antimicrobiano adicionado a la totalidad del vehículo, sino la concentración efectiva, que es la cantidad acumulada en la superficie microbiana y dentro del mi-

croorganismo, que es la responsable de la acción letal (2,23).

b) Solubilidad.- El preservativo antimicrobiano debe ser muy soluble en el vehículo que se emplee (14).

Para que exista una seguridad acerca de la efectividad del preservativo antimicrobiano, se debe disolver en la fase -- acuosa, para asegurarse de su homogeneidad en el medio (14).

Existen preservativos antimicrobianos como los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, cuyos derivados más solubles, - muestran baja capacidad inhibitoria y los derivados menos solubles, es decir, con una cadena más larga, muestran gran efectividad, sin embargo, aún en el caso de estos últimos, el factor solubilidad en agua es determinante (17,29).

c) pH.- El pH del medio, puede tener un profundo efecto sobre la actividad de un preservativo antimicrobiano (2).

La acidez o alcalinidad extrema pueden limitar el desarrollo de microorganismos y para determinadas condiciones de temperatura y medio, puede asignarse un pH óptimo para un crecimiento máximo (16).

Tratándose de los microorganismos más frecuentes y de peligro potencial, no sería una simplificación exagerada decir - que las bacterias prefieren un pH de 6-7 y los hongos un pH de - 5-6 (15,62); sin embargo, algunos autores (2,7,10) mencionan que el rango de crecimiento para bacterias es en un pH entre 6-8 ó - entre 7-8 y para hongos es en un pH de 4-6 ó 4.5-5.5.

Pocos microorganismos pueden crecer debajo de pH de 3 o arriba de pH de 9, es decir, la mayor parte de los microorganismos viven en medios con grados de pH de 3 a 9 y la mayoría de los productos farmacéuticos y cosméticos, se encuentran en este rango de pH (12,15).

En estudios de preservación se ha probado que no es el pH el mayor responsable de la acción antimicrobiana sino la actividad intrínseca del preservativo antimicrobiano (15).

Albert (24) demostró que la actividad antiséptica de los ácidos débiles es debida principalmente a la molécula no disociada. El equilibrio entre ácido disociado y no disociado es una función del pH.

Por otro lado, Rahn y Conn (25) mostraron que la acción bacteriostática y bactericida del ácido benzoico se debe al ácido no disociado y no a la forma iónica, debido a la facilidad de la forma no disociada de penetrar la membrana lipídica de la bacteria; por lo tanto, la porción disociada, es incapaz de penetrar al microorganismo.

Para que sea efectivo un preservativo antimicrobiano - por lo tanto, debe disolverse en suficiente concentración en la fase acuosa. Solamente la fracción no disociada de la molécula de un preservativo antimicrobiano, posee la capacidad antimicrobiana (16).

Los preservativos antimicrobianos ácidos como el benzoico, bórico y sórbico, son más disociados y menos efectivos en medio alcalino (16).

Por el contrario, los preservativos antimicrobianos alcalinos, son menos efectivos en medio ácido y neutro y más efectivos en medio alcalino (16).

Los fenoles por ejemplo, son ácidos débiles, por lo tanto el fenol no disociado tiene la mayor actividad (19).

Winsley y Walters (26) demostraron la actividad/pH y postularon que los factores responsables de la actividad del fenol no disociado son precisamente su solubilidad en lípidos y su

fácil penetración a través de la membrana celular. Como en el caso de los ácidos débiles, los valores de pKa de los fenoles, constituyen una indicación útil en la práctica para intuir el valor de un compuesto como preservativo antimicrobiano en un sistema de pH dado.

Garrett (27) opina que el factor más importante a considerar en la preservación de formulaciones, es precisamente el pH.

En el caso de los compuestos cuaternarios de amonio, son efectivos sólo arriba de pH de 7; en tanto que otros preservativos antimicrobianos ya mencionados como el ácido sórbico, ácido benzoico, ácido dehidroacético y compuestos fenólicos tales como los parabenos, poseen hidrógenos ácidos. por lo tanto a pH bajo, tendrán la mayor actividad, como se muestra a continuación:

% DE PRESERVATIVO ANTIMICROBIANO NO DISOCIADO A DIFERENTES pH's.

	pH	4	5	6	7	8.5
Acido Sórbico		86	37	6	0.6	
Acido Benzoico		60	13	1.5	0.15	
Acido Dehidroacético		95	65	16	2	
Parabenos			77		63	50

Estos valores muestran el reconocido bajo rendimiento de los compuestos presentados como preservativos antimicrobianos en condiciones moderadamente alcalinas o que tienden hacia la alcalinidad (27).

Garrett y Woods (28) mostraron que la concentración de preservativos ácidos en sistemas aceite/agua, no tiene sentido bacteriostático, sino la constante de disociación del ácido no disociado en ambas fases, el pH de la preparación, los volúmenes relativos de las fases y la concentración inhibitoria mínima en la fase acuosa necesaria para la acción del preservativo antimicrobiano.

Martini y Guinet (30) realizaron análisis fisicoquímico y microbiológico de 40 emulsiones fluidas, de las cuales el 82% contenía mezclas de ésteres del ácido para-hidroxibenzoico a una concentración promedio de 0.25% y observaron que los valores de pH alcalinos o neutros no fueron favorables para el almacenamiento, sino un pH entre 5 y 6 y que los productos con alto contenido de agua, fueron medios menos favorables para la rápida desaparición de gérmenes.

Es conveniente tener presente que al efecto del pH sobre el preservativo antimicrobiano mismo, modificando su disociación y por ende su actividad, debe sumarse la toxicidad propia de los iones hidrógeno e hidroxilo. Cualquier solución con un pH menor de 2 o mayor de 12 se preserva por sí misma y habitualmente es de rápida acción bactericida. Condiciones ácidas o alcalinas, reguladas de manera adecuada a  $\text{pH} \leq 3$  ó  $\geq 10$ , por lo regular se preservan por sí mismas, pero son tóxicas (15,30).

d) Coeficiente de Partición.- El preservativo antimicrobiano se encuentra distribuido entre las tres fases, ya que aun en el sistema más simple de emulsión, se compone de una fase oleosa, una fase acuosa (que por lo regular contiene el emulsificador en solución micelar -emulsión aceite/agua) y de una interfase con el agente coloidal o emulsificador adsorbido (15).

Las bacterias se localizan en la fase acuosa y en la interfase de emulsiones aceite/agua (1,31).

En bases anhidras, no es necesaria la adición de un -

preservativo antimicrobiano porque aunque llegue a contaminarse el producto, no han proliferación de microorganismos. En bases con agua debe considerarse el coeficiente de partición del preservativo antimicrobiano y su incompatibilidad con tensoactivos (3).

La eficacia del preservativo antimicrobiano en emulsiones, dependerá del coeficiente de partición del mismo entre las fases oleosa y acuosa y de su inactivación parcial por el agente emulsificante o el coloide hidrofílico (3).

El coeficiente de partición del preservativo antimicrobiano en las fases acuosa y oleosa cuando se desee formular una emulsión por lo tanto, es de vital importancia para mantener la concentración necesaria en la interfase aceite/agua (2).

En el caso de una alteración en la temperatura de las emulsiones, cambia las actividades del preservativo antimicrobiano en la misma forma que las reacciones químicas -cuya velocidad se incrementa con la temperatura- (15).

La relación aceite/agua en una emulsión es muy importante, pues cualquier incremento en la proporción de agua en una fórmula aumenta el problema de preservación y por lo tanto, emulsiones de aceite en agua, requieren más estudio en su formulación que las de agua en aceite. Cuando el coeficiente de partición aceite/agua es menor de 1.0, la mayor parte del preservativo antimicrobiano se encuentra en la fase acuosa y disminuyendo la relación aceite/agua, la concentración del mismo en la fase acuosa, se aumenta (19).

Cuando el coeficiente de partición es mayor de 1.0, la mayor parte del preservativo antimicrobiano se encuentra en la fase oleosa e incrementando la relación aceite/agua, la concentración de éste en la fase acuosa, se reduce (19).

e) Agentes Surfactantes.- Algunos excipientes de una formulación, interfieren con la solubilidad o disponibilidad de un preservativo antimicrobiano, su concentración entonces, puede ser engañosa, ya que no es una verdadera medida de la concentración efectiva (16).

En años recientes, se han descubierto muchas combinaciones incompatibles de los preservativos antimicrobianos y otros excipientes (16).

La interacción entre un preservativo antimicrobiano y otros componentes de una formulación que son incompatibles entre sí, puede dar como resultado una parcial o completa inactivación del efecto preservativo (3).

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, son inactivados cuando se usan en presencia de algunos agentes surfactantes y gomas vegetales (17,32).

Esta pérdida de actividad, puede deberse a la formación de un complejo entre el preservativo antimicrobiano y el surfactante (16,17,32).

Kostenbauder (58) utilizó una técnica de diálisis para demostrar una interacción entre polisorbato 80 y metil y propil

parabenos, mostrando que el efecto deseado del preservativo antimicrobiano, puede no ser obtenido, a menos que se adicione un exceso de éste para compensar aquella parte del mismo que es la que se encuentra complejada (15).

La interacción de dos alquil hidroxibenzoatos con los ingredientes de una emulsión, presentando el problema de complejación y haciendo al preservativo antimicrobiano no disponible, es ilustrada en la siguiente tabla:

INTERACCION DE METIL Y PROPIL PARABENOS CON LOS INGREDIENTES DE UNA EMULSION (15)

COMPUESTOS MACROMOLECULARES	PARA-HIDROXIBENZOATO DE METILO		PARA-HIDROXIBENZOATO DE PROPILO	
	(%)Libre	(%)Unido	(%)Libre	(%)Unido
Gelatina	92	8	89	11
Metil Celulosa	91	9	87	13
Polietilenglicol 4000	84	16	81	19
Polivinilpirrolidona	78	22	64	36
Polioxietilen monoestearato	55	45	16	84
Polioxietilen sorbitan mono- laureato	43	57	14	86
Polioxietilen sorbitan mono- oleato	43	57	10	90

Como se puede observar, los preservativos antimicrobianos fenólicos son susceptibles a interactuar con compuestos conteniendo grupos polioxietileno que interfieren en la eficacia de los mismos (15).



Además del exceso de preservativo antimicrobiano adicionado para compensar aquella parte de éste que es complejada, se ha descubierto también que la adición de algunos alcoholes, activa a los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, en presencia de surfactantes no iónicos; el propilenglicol, es especialmente usado (15).

En la siguiente tabla, se muestra el grado de unión de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico con varias macromoléculas, indicando con ello, la disminución de la concentración de ellos por la complejación química con el agente surfactante:

GRADO DE UNION DE LOS ESTERES DEL ACIDO PARA-HIDROXIBENZOICO  
CON ALGUNAS MACROMOLECULAS (15)

MACROMOLECULA 2% w/v	% DE METIL PARABENO LIBRE	% DE PROPIL PARABENO LIBRE
Gelatina	92	89
Metil celulosa	91	87
Carbowax 4000	84	81
PVP	78	64
Myrj 52	55	16
Tween 20	43	14
Tween 80	43	10

### III.5. PRUEBA DE EFECTIVIDAD.

La prueba de efectividad para un preservativo antimicrobiano, es muy importante, ya que por medio de ella, se puede verificar si un producto farmacéutico o cosmético, se encuentra en las condiciones óptimas para ser usado (6).

Esta prueba es llevada a cabo para determinar el tipo y concentración de un preservativo antimicrobiano que debe usarse en un producto determinado (6).

Los métodos para probar su eficacia, siguen los principios publicados por la United States Pharmacopeia (USP), por la British Pharmacopeia (BP) y por la Cosmetic Toiletory and Fragrance Association (CTFA) (6, 20, 55, 57, 60).

El empleo de estos métodos, implica desafiar la muestra a probar con diferentes microorganismos desarrollados en aerobic plate count (APC) en diferentes tiempos, para después determinar el número de microorganismos viables que quedan en dicha muestra (6,20).

Los microorganismos usados en el Método U.S.P., son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*; en el Método B.P., se usan los mismos que en el anterior, excepto *E. coli*; en el Método C.T.F.A., se usan: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*, *P. luteus* y *B. subtilis* (20).

En el método USP, se usa un inóculo de 0.1 ml. por cada 20 ml. de la muestra de prueba. Las muestras de prueba inoculadas, se incuban a 20-25°C y las APC, se leen a los 7, 14, 21 y 28 días subsiguientes a la inoculación. El cambio en el porcentaje de la concentración de cada microorganismo durante la prueba, es calculado por el uso de las concentraciones teóricas de los microorganismos presentes al inicio de la prueba (6,20,57).

El preservativo antimicrobiano se juzga efectivo en el producto examinado si:

-Las concentraciones de bacterias viables se reducen a un máximo de 0.1% de las concentraciones iniciales en el catorceavo día (6,57).

-Las concentraciones de hongos y levaduras viables estén por debajo de los niveles iniciales durante los primeros catorce días.

-La concentración de cada microorganismo de prueba se encuentre por debajo de estos niveles durante los veintiocho días restantes del período de prueba.

El método BP, es similar al USP, la principal diferencia entre los dos métodos, es el tiempo en que se efectúa la lectura de las placas, pues la BP, señala que las muestras de prueba se lean a las 6, 24 y 48 horas posteriores a la inoculación y después a los 7, 14 y 28 días (6,20,55).

El método CTFA, recomienda el uso de un inóculo conteniendo no menos de  $10^5$  microorganismos/ml. de un cultivo de caldo o un medio sólido para un crecimiento superficial. La cantidad del producto de prueba, no debe ser más de 20 ml. (g), por cada microorganismo de desafío. Después de inocular y mezclar las muestras de prueba, se incuban a temperatura ambiente (o a la temperatura óptima para el microorganismo de prueba). Se recomienda que las APC sean leídas a los 0, 1-2, 7, 14 y 28 días (6,60).

El preservativo antimicrobiano, se juzga inadecuado, si una alta cantidad de microorganismos se encuentra presente en las placas después del séptimo día (6,60).

El preservativo antimicrobiano, se considera efectivo

de acuerdo a los siguientes criterios:

-La reducción de bacterias vegetativas, debe ser mayor del 99.9% dentro de los siete días siguientes a cada desafío y se continúe la reducción durante la duración de la prueba.

-La reducción de hongos y levaduras debe ser mayor del 90% dentro de los siete días siguientes a cada desafío y se continúe la reducción durante la duración del período de prueba.

-Debe tener actividad bacteriostática durante toda la prueba.

## III.6. SELECCION DE UN PRESERVATIVO ANTIMICROBIANO.

La selección del mejor preservativo antimicrobiano para un producto farmacéutico y cosmético, presenta una tarea difícil para el desarrollo científico; cuando la experiencia en el almacenamiento de un producto indica que su formulación requiere de un preservativo antimicrobiano y no existiendo uno ideal, la selección de éste se basa en ciertas consideraciones como son:

1) Que el preservativo antimicrobiano sea efectivo en la prevención del crecimiento de un tipo de microorganismos considerados como los más probables contaminantes de la preparación farmacéutica o cosmética (3,11,16,20,21).

2) Que sea bastante soluble en agua para obtener concentraciones adecuadas en la fase acuosa de una, dos o más fases del sistema (3,16,20,21).

3) La proporción del residuo o del resto del preservativo antimicrobiano no disociado al pH de la preparación farmacéutica o cosmética, hace que sea capaz de penetrar al microorganismo y destruir su integridad (3,14,16).

4) La concentración requerida del preservativo antimicrobiano, no debe afectar la seguridad o la salud del paciente cuando la preparación farmacéutica o cosmética se utilice por la vía acostumbrada (3,16,20,21).

5) Debe tener una adecuada estabilidad y en consecuencia no debe reducir su concentración ya que esto aceleraría la descomposición química de la preparación farmacéutica o cosmética durante su almacenamiento (3,11,16,20,21).

6) Debe ser completamente compatible con todos los otros ingredientes de la formulación farmacéutica o cosmética y por consiguiente no interferir con ellos, ni ellos interferir --

con la efectividad del preservativo antimicrobiano (3,11,16,20.-21).

7) Además de no interferir con los ingredientes de la formulación y viceversa, el preservativo antimicrobiano, tampoco debe reaccionar con el envase o el tapón, ni estos con él (16, -20,21).

8) El preservativo antimicrobiano, debe estar libre de olor, sabor o color desagradables (3, 20, 21).

9) Debe considerarse el factor costo, es decir, el preservativo antimicrobiano debe ser económico (14, 20, 21).

C A P I T U L O

I V

CAPITULO IV. ESTERES DEL ACIDO PARA-HIDROXIBENZOICO  
(Parabenos)

IV.1. INTRODUCCION.

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico comúnmente llamados parabenos, son ésteres alifáticos que se aplican en diferentes productos a causa de su poder antimicrobiano, en concentraciones bajas frente a numerosos microorganismos (15,19,33).

Son entonces, preservativos antimicrobianos ácidos, - tienen una acción que corresponde a la de los fenoles y por lo tanto, se les ha clasificado como compuestos fenólicos (15,19,33, 34).

Oficialmente se conocen cuatro ésteres del ácido para-hidroxibenzoico que son el para-hidroxibenzoato de metilo, el para-hidroxibenzoato de etilo, el para-hidroxibenzoato de propilo y el para-hidroxibenzoato de butilo.

Gersnenfeld y Perlstein (35) han sugerido que los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, tienen las características - teóricas que debe reunir un preservativo antimicrobiano en general, ya que éste:

- 1.- Debe ser efectivo para todos los tipos de microorganismos que causan descomposiciones.
- 2.- Debe ser soluble en la concentración usada.
- 3.- No debe ser tóxico a la concentración empleada.
- 4.- Debe ser compatible con los demás excipientes de la formulación.
- 5.- No debe alterar el carácter de la preparación has-



ta donde sea posible: olor, color, sabor, además debe ser prácticamente neutro y no alterar el pH de la misma.

6.- El efecto de inhibición debe ser duradero.

7.- El costo no debe ser mayor al del producto.

Por supuesto que estos investigadores no habían hecho estudios muy profundos respecto a estos compuestos, pues años más tarde se investigó que los parabenos tienen características tales como las que se mencionan a continuación, pero que sin embargo, son ampliamente usados como preservativos antimicrobianos en productos farmacéuticos y cosméticos, porque en general:

No son tóxicos o su toxicidad es baja; son completamente inocuos en las concentraciones para su uso (15,33,34).

El para-hidroxibenzoato de metilo, tiene un ligero olor característico, pero los otros ésteres son prácticamente inodoros, son incoloros, en soluciones acuosas saturadas, tienen un ligero sabor quemante; no son volátiles, no son higroscópicos, son estables en el aire y son resistentes a hidrólisis en agua fría y caliente (15,29,36).

Son efectivos en un rango de pH de 3-9; asimismo, son efectivos en bajas concentraciones como se mencionó antes, contra diversos microorganismos en soluciones ácidas, neutras y alcalinas, son menos efectivos contra bacterias gram negativas que contra hongos y levaduras (15,29).

El metil parabeno que tiene alta solubilidad en agua en relación a los otros compuestos, es usualmente empleado en -- concentraciones de 0.1-0.2% mientras que los otros ésteres son usados en soluciones casi saturadas (16,18).

Por lo regular, se usan mezclas de ésteres metílico y propílico, esta mezcla es sinérgica, como lo es la combinación

con otros preservativos antimicrobianos (15,17).

El para-hidroxibenzoato de metilo es en particular efectivo contra bacterias que contra hongos, pero a medida que se incrementa la longitud de la cadena alquímica, la actividad de los parabenos, aumenta volviéndose tan eficaces para frenar el desarrollo tanto de bacterias como de hongos (17,18).

Por otro lado, tienen baja solubilidad en agua, pero en los últimos años, se han venido usando las sales de sodio, por su solubilidad en agua fría; son en verdad útiles en la preservación de materiales y productos sensibles al calor (17,29,36).

Su solubilidad en agua disminuye con un correspondiente incremento de su solubilidad en medio oleoso cuando aumenta el peso molecular del compuesto (17,18).

Poseen un coeficiente de partición no favorable entre las fases oleosa y acuosa de emulsiones (36).

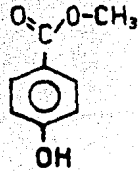
Son incompatibles con surfactantes no iónicos (16,17, 36).

Los materiales de envase no son todos inertes frente a los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico y es aconsejable probarlos antes de su empleo (18).

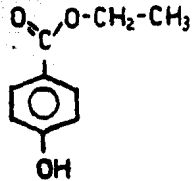
Son usados no solamente como preservativos antimicrobianos, sino también como antisépticos y antioxidantes (34).

FORMULAS ESTRUCTURALES

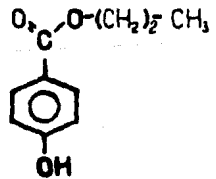
PARA-HIDROXIBENZOATO DE METILO



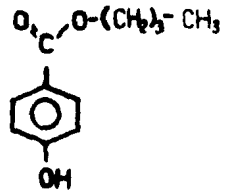
PARA-HIDROXIBENZOATO DE ETILO



PARA-HIDROXIBENZOATO DE PROPILO



PARA-HIDROXIBENZOATO DE BUTILO



#### IV.2. ASPECTOS HISTORICOS.

La historia de la aplicación de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, se dió a conocer en 1924, cuando Sabalitschka (37) publicó el primero de sus muchos reportes sobre su uso como agentes antibacterianos y antifungicidas al descubrir su efecto antimicrobiano y sus propiedades para usarse como preservativos antimicrobianos de productos farmacéuticos y cosméticos (29).

Los estudios teóricos fueron iniciados entonces por este investigador quien se interesó en las interrelaciones entre la estructura química de compuestos como el ácido benzoico, ácido salicílico, ácido para-hidroxibenzoico y los productos de su esterificación con su acción preservativa sobre microorganismos. Comparando la acción de esos ácidos y de varios productos de su esterificación sobre los microorganismos concluyó lo siguiente:

1.- Los ésteres del ácido benzoico y salicílico, ejercen una acción más débil que la de los ácidos libres (37).

2.- Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico por otra parte, son mucho más efectivos en su acción sobre los microorganismos que el ácido libre (37).

3.- La longitud de la cadena del grupo alquilo en el éster indica una mayor acción de inhibición (37).

4.- Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, son de dos a tres veces más efectivos que el ácido benzoico en la inhibición bacteriana (37).

Después del primer reporte publicado en 1924 sobre la aplicación de estos compuestos, en los siguientes años apareció un gran número de artículos principalmente en revistas europeas

sobre sus propiedades y sus diversos usos, particularmente como preservativos antimicrobianos para medicamentos y cosméticos (29).

En 1930, se desarrolló en los Estados Unidos una interesante difusión y una producción comercial (29).

El término "parabeno" es una abreviatura del sufijo usado por la profesión farmacéutica en los Estados Unidos y en la United States Pharmacopeia (USP) para denotar a los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico; así el para-hidroxibenzoato de metilo, es referido como metil parabeno, el para-hidroxibenzoato de etilo, es referido como etil parabeno, el para-hidroxibenzoato de propilo, como propil parabeno y el para-hidroxibenzoato de butilo, como butil parabeno (34).

Los para-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo y butilo, se han estudiado más extensamente que el para-hidroxibenzoato de bencilo y otros ésteres, aunque estos últimos y sus sales se han aprovechado comercialmente.

Como se observa, la relación química de estos compuestos, varía por sucesión lineal con adiciones de metileno sobre la porción éster de la molécula (19).

Son obtenidos como los ésteres libres o como sus derivados de sodio.

La preparación del para-hidroxibenzoato de metilo, etilo, propilo y butilo, se lleva a cabo por medio de la esterificación de metanol, etanol, propanol y butanol respectivamente y ácido para-hidroxibenzoico, en presencia de ácido sulfúrico (12, 38,39,40,41,45).

El metil parabeno, fue el primero de los para-hidroxibenzoatos reconocido oficialmente en la quinta edición de la -- Farmacopea Suiza en 1934, en donde después se incluyeron los otros ésteres (29).

Posteriormente, fueron enlistados en el suplemento de la sexta edición de la Farmacopea Alemana (29).

En 1944, Neidig y Burrell (42), resumieron aproximadamente 400 artículos referentes a las propiedades y usos de los para-hidroxibenzoatos (14).

En los Estados Unidos, el metil parabeno, fue primeramente adoptado en la National Formulary VII en 1940 y después admitido por la U.S.P. XIII en 1945, junto con los otros compuestos (29).

Actualmente el metil y propil parabenos son más comúnmente usados en los Estados Unidos, sin embargo el etil y butil parabenos se aplican más en países europeos (14).

En México, al igual que en Estados Unidos se utilizan más el metil y propil parabenos y en la Farmacopea Nacional de -

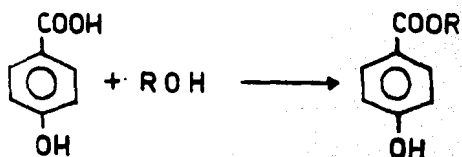
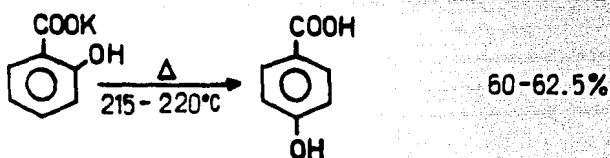
los Estados Unidos Mexicanos, que es la cuarta y última edición - publicada hasta la fecha y que apareció en 1974, solamente se - encuentran el metil y propil parabenos (43,44).

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, se han - llegado a conocer por todo el mundo como preservativos antimicrobianos efectivos bajo la marca registrada de Nipa Esteres (Nipa Laboratorios Ltd.); son vendidos bajo los nombres comerciales de Nipagin, Nipagin-etílico, Nipasol y Nipagin butílico respectivamente (34).

## IV.3. OBTENCION.

Zbarskii ( 39 ), obtuvo ácido para-hidroxibenzoico ( $p\text{-HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ ) por calentamiento de salicilato de potasio ( $o\text{-HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{K}$ ) a una temperatura de 215-220°C.

El rendimiento del producto obtenido fue de 60-62.5%. El ácido y el alcohol apropiado, en presencia de ácido sulfúrico, produce el éster deseado (39).

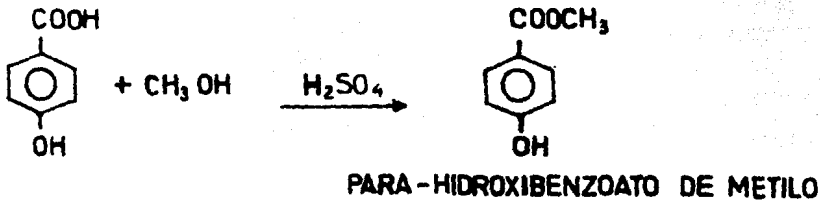
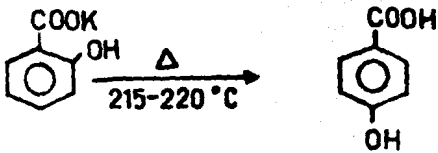


Donde: R = METILO, ETILO, PROPILO ó BUTILO

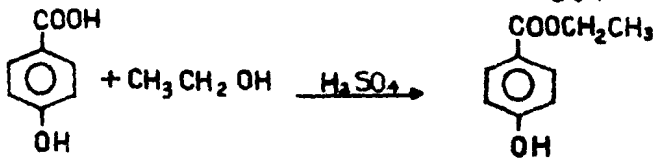
Nobili (45), preparó los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico por la vía usual, a partir del ácido para-hidroxibenzoico y los alcoholes correspondientes.

Los rendimientos de los productos obtenidos para metil, etil y propil parabenos fueron de 85, 95 y 80% respectivamente - (45).

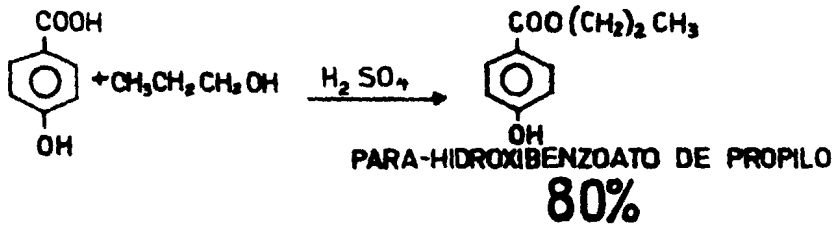




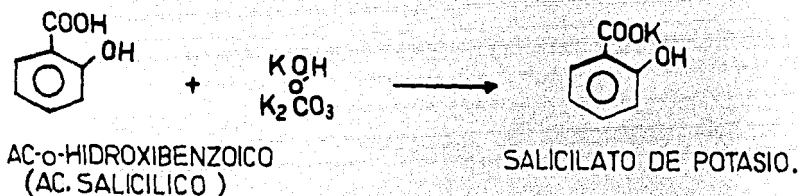
85%

**PARA-HIDROXIBENZOATO DE ETILO**

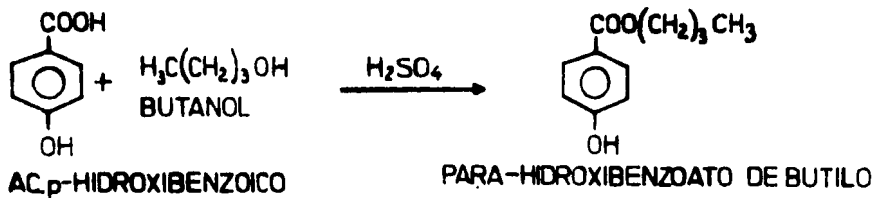
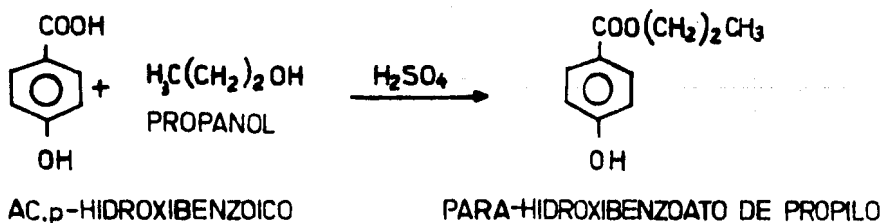
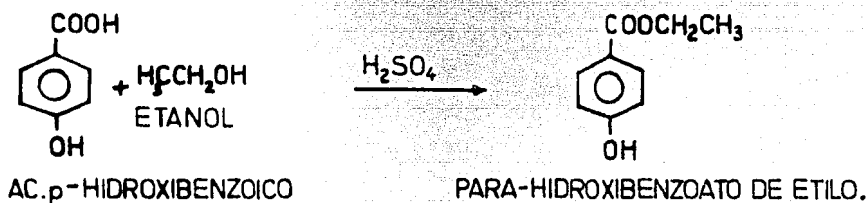
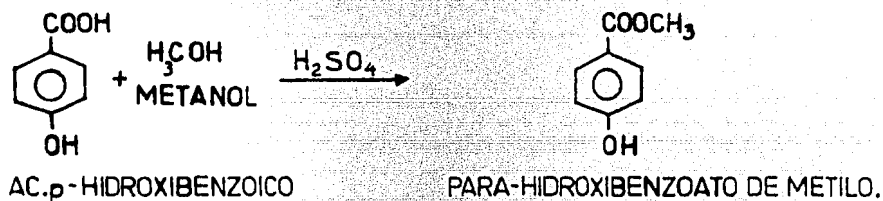
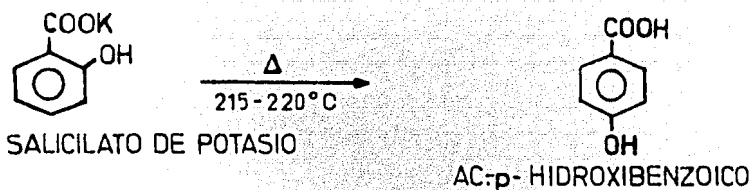
95%



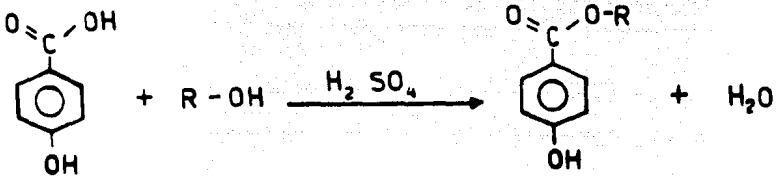
Blatt (46) y Rojahn (47) describen un método para preparar los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, que consiste en obtener primero salicilato de potasio a partir de cantidades equivalentes de ácido salicílico ( $\text{o-HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ ) e hidróxido o carbonato de potasio técnicos y cuya reacción se efectúa en medio acuoso y con agitación; posteriormente se evapora a sequedad en baño maría.



Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico se obtienen calentando a reflujo durante diferentes tiempos que varían de 5 a 15 horas; una mezcla del ácido para-hidroxibenzoico con un -- exceso del correspondiente alcohol y como catalizador ácido sulfúrico (48) o clorosulfónico (49,50,51). Se agregan también como deshidratantes benceno, tolueno o dicloruro de etileno (52); se neutraliza, se hace una destilación posterior del exceso de alcohol y disolvente. Se cristaliza el éster disolviéndolo en etanol y precipitándolo con agua; se repite la operación para que por cristalizaciones sucesivas, se eliminen impurezas (52).

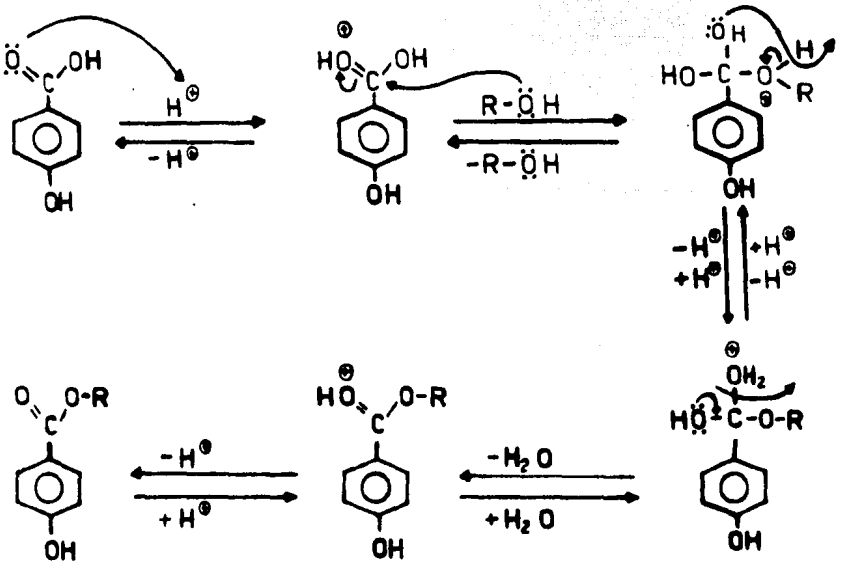


## REACCION:



R: Metilo, Etilo, Propilo ó Butilo.

## MECANISMO DE REACCION:

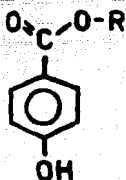


## IV . 4. PROPIEDADES.

## IV . 4.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, se encuentran estrechamente relacionados con el ácido benzoico; por lo tanto, tienen muchas propiedades en común con él, aunque difieren en ciertos aspectos que mejoran su utilidad (14,29).

La estructura común de estos compuestos, está constituida por un anillo de seis miembros y un grupo hidroxilo en posición para con respecto al grupo éster correspondiente:



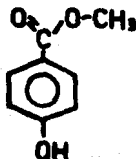
R=Metilo Etilo Propilo y  
Butilo respectivamente.

## PARA-HIDROXIBENZOATO DE METILO:

Se conoce también como: Metil Parabeno, de acuerdo a la nomenclatura empleada por la CTFA\*, como Nipagin y Parasept metílico (6,18,52,53).

El para-hidroxibenzoato de metilo, tiene una fórmula empírica de :  $C_8H_8O_3$  y un peso molecular de 152.1 (14,18).

## Fórmula Estructural :



## Apariencia:

Cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco ( 53 ).

\* CTFA = Cosmetic Toiletries & Fragrance Association.

## Características organolépticas :

Inodoro o con olor débil característico y sabor ligeramente quemante (53).

Tamaño de partícula:

Muy pequeño (29).

Higroscopicidad:

No higroscópico (36).

Estabilidad:

Buena (29,36).

Densidad aparente a 20°C:

0.65 - 0.75 (52).

pH óptimo:

3-8 (29,36) ; 3-9 (14,17).

Punto de solidificación:

123.9 - 124.9°C (52).

Punto de fusión:

126°C (3) ; 131°C (54) ; 125 - 128°C (52,53,55).

Punto de ebullición:

270 - 280°C con descomposición (54).

Solución 1:10 en Acido Sulfúrico:

Transparente, clara como agua (52).

Solución en Eter:

Transparente (52).

Acidez:

Ligeramente ácido a Litmus (52).

Solubilidad:

Soluble en agua a 25°C: 0.30% w/w (54).

Poco soluble en agua, benceno y tetracloruro de carbono (53).

Muy poco soluble en agua caliente (53).

Muy soluble en alcohol; soluble en acetona, éter, soluciones de hidróxidos alcalinos y metanol (3,53,54,55).

Un gramo se disuelve en 400 ml. de agua, 40 ml. de aceite caliente y 70 ml. de glicerina caliente (54).

Coefficiente de Partición:

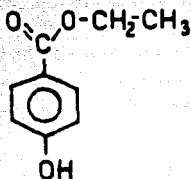
Posee un coeficiente de partición no favorable entre la fase oleosa y acuosa de emulsiones (36).

PARA-HIDROXIBENZOATO DE ETILO:

Se conoce también como: Etil Parabeno, de acuerdo a la nomenclatura empleada por la CTFA, como Nipagin etílico y Para-sept etílico (6,18,52,53).

El para-hidroxibenzoato de etilo, tiene una fórmula empírica de:  $C_9H_{10}O_3$  y un peso molecular de 166.2 (14,18).

Fórmula Estructural:



Apariencia:

Cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco (54).

Polvo cristalino, ligeramente amarillento, aún después de efectuadas varias cristalizaciones (45).

Características organolépticas:

Inodoro o casi inodoro y sabor ligeramente amargo (52,55).

Tamaño de partícula:

Muy pequeño (29).

Higroscopicidad:

No higroscópico (36).



Estabilidad:

Buena (29,36).

Densidad aparente a 20°C:

0.6 - 0.65 (52).

pH óptimo:

3 - 8 (29,36) ; 3 - 9 (14,17).

Su campo de aplicación es efectivo desde medios ligeramente alcalinos pH = 8, neutros y hasta medios ácidos de - - - pH = 3 (52).

Punto de solidificación:

113.5 - 115°C (52).

Punto de fusión:

116°C (54) ; 117°C (55) ; 115 - 118°C (52).

Punto de ebullición:

292 - 298°C con descomposición (54).

Solución 1:10 en Acido Sulfúrico:

Transparente clara como agua (52).

Solución en Eter:

Transparente (52).

Acidez:

Ligeramente ácido a Litmus (52).

Solubilidad:

Soluble en agua a 20°C: 0.070% w/w; a 25°C: 0.075% w/w  
(54).

Poco soluble en agua y en glicerina (53).

Muy soluble en acetona, alcohol, éter y en propilenglicol (53).

Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos (55).

Coefficiente de Partición:

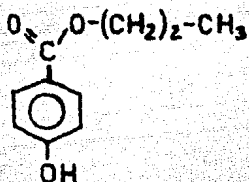
Posee un coeficiente de partición no favorable entre la fase oleosa y acuosa de emulsiones (36).

PARA-HIDROXIBENZOATO DE PROPILO:

Se conoce también como Propil Parabeno, de acuerdo a la nomenclatura empleada por la CTFA, como Nipasol y Parasept - propílico (6,18,52,53).

El para-hidroxibenzoato de propilo, tiene una fórmula empírica de:  $C_{10}H_{12}O_3$  y un peso molecular de: 180.2 (14,18).

Fórmula Estructural:



Apariencia:

Cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco (53).

Características organolépticas:

Casi inodoro o ligero olor aromático (52,53,55).

Tamaño de partícula:

Muy pequeño (29).

Higroscopicidad:

No higroscópico (36).

Estabilidad:

Buena (29,36).

Densidad aparente a 20°C:

0.6 - 0.7 (52).

pH óptimo:

3 - 3 (29,36) ; 3 - 9 (14,17).

Su campo de aplicación es efectivo desde medios ligeramente alcalinos, pH = 8, neutros y hasta medios ácidos de - - - pH = 3 (52).

Punto de solidificación:

92.2 - 94.4°C (52).

Punto de fusión:

96 - 97°C (54) ; 95 - 98°C (52,53,55).

Solución 1:10 en Acido Sulfúrico:

Transparente, clara como el agua (52).

Solución en Eter:

Transparente (52).

Acidez:

Ligeramente ácido a Litmus (52).

Solubilidad:

Casi insoluble en agua; poco soluble en agua caliente (53).

Muy soluble en alcohol, acetona y en éter (53).

Muy soluble en metanol, éter y soluciones de hidróxidos alcalinos (55).

**Coefficiente de Partición:**

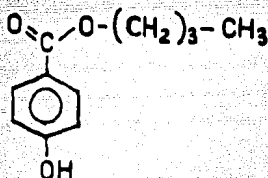
Posee un coeficiente de partición no favorable entre la fase acuosa y oleosa de emulsiones (36).

PARA-HIDROXIBENZOATO DE BUTILO:

Se conoce también como Butil Parabeno, de acuerdo a la nomenclatura empleada por la CTFA, como Nipagin butílico y Para-sept butílico (6,18,52,53).

El para-hidroxibenzoato de butilo, tiene una fórmula empírica de:  $C_{11}H_{14}O_3$  y un peso molecular de 194.2 (14,18).

Fórmula Estructural:



Apariencia:

Cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco (52, 53, 54).

Características organolépticas:

Inodoro o casi inodoro y sabor ligeramente amargo (52,55).

Tamaño de partícula:

Muy pequeño (29).

Higroscopicidad:

No higroscópico (36).

Estabilidad:

Buena (29,36).

Densidad aparente a 20°C:

0.6 - 0.65

pH óptimo:

3 - 8 (29,36) ; 3 - 9 (14,17).

Su campo de aplicación es efectivo desde medios ligeramente alcalinos, pH = 8, neutros y hasta medios ácidos de - - pH = 3 (52).

Punto de solidificación:

83.2 - 85.4°C

Punto de fusión:

68 - 69°C (54) ; 68 - 72°C (53) ; 69 - 71°C (52) ; 69°C (55).

Acidez:

Ligeramente ácido a Litmus (52).

Solubilidad:

Casi insoluble en agua y en glicerina (53,54).

Muy soluble en acetona, alcohol, éter, cloroformo y en propilenglicol (53,54).

Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos (55).

Coefficiente de Partición:

Posee un coeficiente de partición no favorable entre la fase acuosa y oleosa de emulsiones (36).

## IV. 4.2 PROPIEDADES TOXICOLÓGICAS

El hecho de que los preservativos antimicrobianos tengan la capacidad de destruir células microbianas, obviamente calificaría a estas sustancias como potencialmente nocivas para el hombre.

Afortunadamente, la cantidad de los mismos para destruir la vida microbiana, se encuentra a un nivel que en general, no es tóxico para el hombre.

Uno de los primeros estudios acerca de la toxicidad aguda producida por los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, fue efectuada por Schubel y Manger (112) en gatos, perros y conejos y los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Compuesto	Dosis (g./Kg.)	
	Tóxica	Letal
Metil parabeno	2	3
Etil parabeno	4	5
Propil parabeno	3-4	6
Acido benzoico	1	2

La conclusión de estos resultados, fue que administrados estos compuestos por vía oral, no son tóxicos, comparados particularmente con el ácido benzoico.

Matthews y colaboradores (59), presentan los resultados de un estudio de toxicidad aguda y crónica del ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres metílico, etílico, propílico y butílico, realizado en ratones, ratas y perros, mostrando en ellos que cada uno de estos compuestos, posee un bajo orden de toxicidad aguda, que en la forma de sal de sodio, incrementa con la



longitud de la cadena alquímica, es decir, la toxicidad de las sales de sodio, es una función de la longitud del alquil sustituyente, pues en el caso del butil parabeno, se observó que es aproximadamente tres veces más tóxico que el metil parabeno.

El principal efecto tóxico que produjeron estos compuestos, fue una depresión aguda del miocardio, acompañada por hipotensión, lo cual se observó que fue de naturaleza transitoria y no acumulativo (59).

No hubo efecto adverso en roedores con dosis administradas de los cuatro ésteres de 0.9-1.2 g./Kg./día, aun cuando el tratamiento se haya prolongado por noventa y seis semanas (59).

En cambio con los roedores a los que se les administró una dosis tan grande como de 5.5-5.9 g./Kg./día, el butil parabeno, fue definitivamente más tóxico que los otros compuestos y mató a todos los animales en las primeras doce semanas (59).

A los perros, se les administró una dosis de 1.0 g./Kg./día durante un año, no mostrando toxicidad alguna (59).

No existió evidencia de daño en sangre o cambios histológicos de riñón, hígado, corazón, pulmón, bazo y páncreas en ninguno de los animales tratados (59).

En concentraciones abajo del 5%, ninguno de los ésteres produjo irritación cuando se aplicaron a la piel del hombre y aun cuando se hicieron repetidas aplicaciones, no produjeron sensibilización (59).

Con los resultados presentados, se demostró que los para-hidroxibenzoatos de metilo, etilo y propilo, pueden usarse con confianza como preservativos antimicrobianos en las concentraciones recomendadas (59).

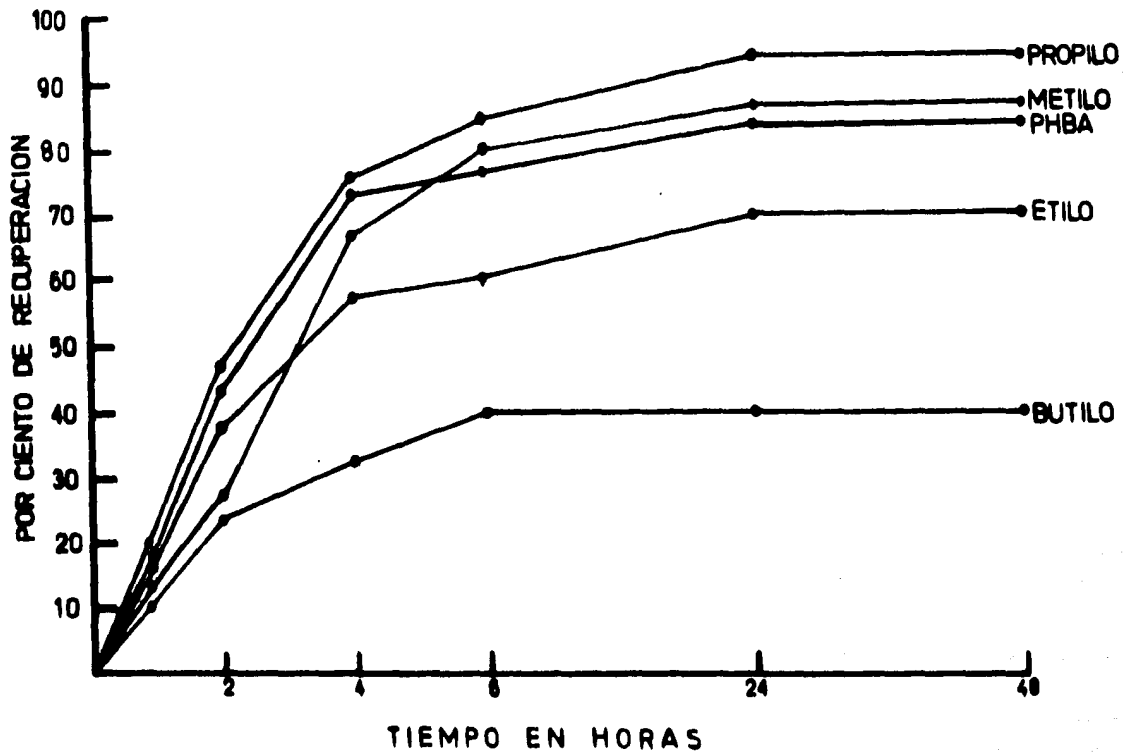
Passie y Thigpen, llevaron a cabo un estudio sobre la

absorción y excreción del ácido para-hidroxibenzoico (PHBA) y sus ésteres administrados a perros por vía intravenosa en inyecciones de 50 mg./Kg. y vía oral en cápsulas de 1.0 g./Kg. (94).

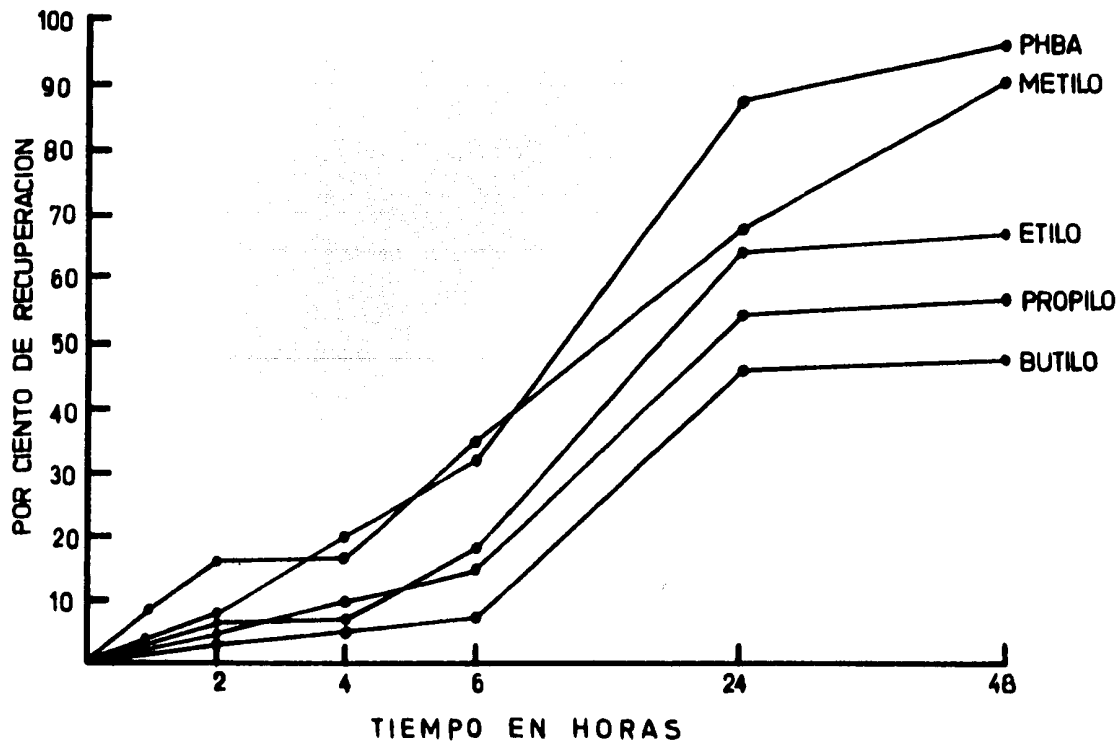
Asimismo, observaron que hubo una buena recuperación del material total en orina (60-95%) por ambas vías de administración, indicando con ello, que la mayor porción del mismo fue metabolizado y excretado, conservando su estructura fenólica (94).

La mayor parte del material, fue excretado en orina a las 6 horas después de la administración intravenosa, como se puede observar en la gráfica # 1.

Después de la administración oral, la mayor parte del material fue excretado en orina, entre las 6 y las 24 horas; los resultados muestran que después de administrar los compuestos por esta última vía, la absorción fue completa, como lo muestra la gráfica # 2.



GRAFICA # 1.- Recuperación en orina del ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres administrados a perros en una dosis intravenosa de 50 mg./Kg. de cada compuesto.



GRAFICA # 2.- Recuperación en orina del ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres administrados a perros en una dosis oral de 1.0 g./Kg. - de cada compuesto.

En ambas vías de administración, la recuperación del para-hidroxibenzoato de butilo, fue entre 40 y 48%, a diferencia de los otros compuestos, indicando con ello, que no se hidrolizó totalmente en el organismo de los animales tratados (94).

En general, los resultados del estudio, indican que el ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, se absorben efectivamente después de la administración oral (94).

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, no producen efectos tóxicos generales; sin embargo, introducidos en pomadas antibacterianas, preparaciones dermatológicas, lociones y cremas cutáneas comerciales, suelen causar graves dermatitis por contacto, de difícil tratamiento (33).

La dermatitis por contacto atribuida a estos compuestos, se ha reportado mucho en la literatura dermatológica británica (34,96) y europea (97,98) y en Estados Unidos, se le ha prestado menor atención (95).

Como se mencionó antes, prácticamente no producen irritación, pero a causa de su uso tan expandido en toda clase de productos a través de los años, se refieren algunos casos de personas sensibilizadas a estos compuestos (33).

Bonnevie en 1940 (99), reportó el primer caso de sensibilización producida por una preparación antifúngica -- "Mycocoten" y mostró que la hipersensibilidad al medicamento fue debida al etil parabeno presente y no al ácido salicílico también presente en la preparación y a quien se le había atribuido inicialmente dicha reacción.

Sokol (100), probó en cincuenta individuos, concentraciones distintas de los ésteres metílico, etílico, propílico y butílico en propilenglicol. Comprobó que las concentraciones límites que no causan irritación, son 5% P/V para el metil parabe-

no, 7 para el etil parabeno, 12 para el propil parabeno y 5 para el butil parabeno (2,19).

Schorr (101), demostró que pacientes alérgicos a los parabenos, muestran sistemáticamente falsas respuestas negativas en las pruebas efectuadas en 48 horas, usando como material de prueba una crema o loción. Cuando la concentración alcanza del 3 al 5%, se observan resultados positivos en pacientes alérgicos. Sin embargo, grandes cantidades de voluntarios utilizados como testigos no registraron reacciones.

Sarkani y Col. (34) reportaron el caso de un individuo con dermatitis por contacto, cuya reacción se atribuyó primeramente a la tetraciclina presente en una pomada de Acromicina, ya que se conoce que en general, las tetraciclinas poseen un bajo índice de sensibilización a la piel.

La pomada contenía 3% de acromicina, 3% de tetraciclina, 2.4% de metil parabeno y 0.6% de propil parabeno y después de llevar a cabo las pruebas respectivas, comprobaron que no fue la tetraciclina, sino los parabenos las sustancias nocivas en la preparación al encontrarse en concentraciones altas (34).

Rudner (95) presenta el caso de diez pacientes con dermatitis por contacto causada por la aplicación tópica de medicamentos, a los cuales se les administraron las pomadas de cloromicetina (0.1% de propil parabeno y 1% de cloranfenicol) y clorotetraciclina (metil parabeno 2.4%, propil parabeno 0.6%, aureomicina 3%) para efecto de prueba y a la cual reaccionaron positivamente.

Posteriormente, se efectuó una prueba con los componentes del medicamento, exceptuando los parabenos que fue negativa; por último se probó con una mezcla al 3% de parabenos en una crema base y los pacientes reaccionaron positivamente, sien-

do entonces estos compuestos los responsables de la dermatitis - en cuestión.

En lo que se refiere a productos parenterales, los parabenos han mostrado un bajo orden de toxicidad y son considerados preservativos antimicrobianos seguros a las concentraciones usadas en la conservación de estas sustancias (20,106).

Sin embargo, el efecto más conocido en la administración parenteral de estos compuestos, ha sido el de producir reacciones alérgicas (20,106).

Por otro lado, se ha observado que en preparaciones - oftálmicas, los parabenos producen irritación ocular (17).

En soluciones nasales, el metil y propil parabenos, - tienden a ser más irritantes para las mucosas que los compuestos cuaternarios de amonio, como el cloruro de benzalconio o las sales fenil mercúricas (15).

Se ha observado que los pacientes sensibles a un parabenos, muestran sensibilidad cruzada a los demás compuestos del - grupo (33).

Para el tratamiento, la primera medida es suprimir el contacto con estas sustancias, tarea difícil, pues se hallan muy extendidos en preparados de patente y su presencia suele no estar indicada en la etiqueta de un producto farmacéutico o cosmético (33).

Es de importante ayuda conocer qué productos contienen parabenos para que no sean usados por aquellos individuos que - muestran hipersensibilidad a ellos y la siguiente tabla enlista una serie de preparaciones farmacéuticas y cosméticas que los - contienen:

PREPARACIONES FARMACEUTICAS Y COSMETICAS  
QUE CONTIENEN PARABENOS

(102,103,104,105)

Preparaciones Tópicas  
Esteroides

Pomadas

Aristocort  
Cortril  
Medrol

Lociones

Cetacort  
Heb-Cort  
Kenalog  
Nutracort

Cremas

Aristocort  
Caldecort  
Celestone  
Kenalog  
Meti-Derm  
Synalar

Esteroides y Antibacterianos

Pomadas

Neo-Cortef  
Neo-Delta Cortef  
Neo-Oxylone

Lociones

Cortisporin  
Florinef-S  
Heb-Cort V  
Neo-Cort-Dome  
Neo-Hydeltrasol  
Vioformo -Hidro cortisona

Cremas

Celestone con Neomicina  
Heb-Cort N  
Heb-Cort V  
Neo-Synalar  
Esterosan-Hidro cortisona

Antibacterianos

Pomadas

Acromicina  
Aureomicina



## Lociones

Neosporin  
Vioformo

## Cremas

Acromicina  
Cloromicetina  
Esterosan

## Otros (especificos)

## Pomadas

Pomadas Hidrofilicas (USP)

## Lociones

Antivy  
Nupercainal

## Cremas

Lotocrema  
Micoestatin

## Soluciones

Peróxido de Hidrógeno

## Otros (generales)

Cosméticos  
Dentifricos  
Desodorantes  
Cremas faciales  
Cremas para manos

## Preparaciones Orales

Gotas Acromicina Pediátrico  
Jarabe Aristocort  
Suspensión Maalox

## Preparaciones Parenterales

Prednisona, penicilina y estreptomina  
solución.  
Solu-Medrol

## Para Uso No Humano

Pegamentos  
Pastas

## IV.5. MECANISMO DE ACCION.

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, son compuestos con carácter lipofílico y su sitio de acción es a nivel de membrana celular, desnaturalizando proteínas(66,109,110).

Estos compuestos, muestran una marcada actividad antimicrobiana a bajas concentraciones, contra un gran número de microorganismos.

## I V . 5 . 1 ACTIVIDAD ANTIFUNGICIDA:

Para conocer las actividades antifungicidas de los parabenos, se llevó a cabo un estudio usando los cuatro compuestos, contra un grupo de hongos que pueden ser encontrados como contaminantes comunes:

**ACTIVIDAD ANTIFUNGICIDA DE LOS PARA-HIDROXIBENZOATOS**

Hongos	(% ) Requerido para inhibición			
	Metil	Etil	Propil	Butil
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10254	0.1	0.04	0.02	0.02
<i>Penicillium digitatum</i> ATCC 10030	0.05	0.025	0.0063	0.0032
<i>Rhizopus nigricans</i> ATCC 6227A	0.05	0.025	0.0125	0.0063
<i>Trichoderma lignorum</i> ATCC 8678	0.025	0.0125	0.0125	0.0063
<i>Chaetomium globosum</i> ATCC 6205	0.05	0.025	0.0063	0.0032
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	0.008	0.008	0.004	0.002
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 10218	0.008	0.008	0.004	0.002
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.1	0.1	0.0125	0.0125
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	0.1	0.05	0.0125	0.0063
<i>Saccharomyces pastorianus</i> ATCC 2366	0.1	0.05	0.0125	0.0063

De los resultados anteriores, se puede observar que los cuatro ésteres muestran considerable actividad contra este grupo de hongos (66,109, 110).

Por otro lado, es notable que las actividades antifúngicas incrementan con la longitud de la cadena alquílica; por lo tanto, se considera que el butil parabeno es el mejor agente fungicida de la serie de los cuatro compuestos; sin embargo, la solubilidad en agua de los mismos, disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica (17,66,109,110).

Para reafirmar lo anterior, Huppert (111) preparó y probó los ésteres n-alquilo hasta  $C_{16}$  y encontró la mayor actividad fungicida con los grupos hexilo y heptilo.

## IV. 5.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Se han realizado estudios que muestran que los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, son en general más activos contra hongos que contra bacterias, es decir, no se consideran eficientes agentes bacteriostáticos (17,66,109,110).

Sin embargo, se ha comprobado que los parabenos, son más activos contra bacterias gram positivas que contra gram negativas y los resultados son mostrados a continuación:

## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS PARA-HIDROXIBENZOATOS

Bacterias	(%) Requerido para inhibición			
	Metil	Etil	Propil	Butil
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.2	0.1	0.025	0.0125
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 6462	0.2	0.1	0.0125	0.0063
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> ATCC 6538P	0.4	0.1	0.05	0.0125
<i>Sarcina lutea</i>	0.4	0.1	0.05	0.0125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.1	0.05	0.025	0.0125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	0.4	0.1	0.1	0.4
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	0.2	0.1	0.05	0.05
<i>Aerobacter aerogenes</i> ATCC 8308	0.2	0.1	0.1	0.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0.4	0.4	0.8	0.8

Como se mencionó antes, se puede observar que los parabenos son más activos contra bacterias gram positivas que contra gram negativas; en el grupo de bacterias gram negativas, no se observa aumento en la efectividad del bacteriostático cuando aumenta la longitud de la cadena alquílica (66,109,110).

El metil parabeno, es en particular efectivo contra -

bacterias, aunque es menos efectivo contra hongos, pero a medida que se incrementa la longitud de la cadena alquílica, la actividad de los ésteres aumenta volviéndose tan eficaces para frenar el desarrollo tanto de bacterias como de hongos (17).

Lang y Rye (109) trabajando con ésteres marcados (carboxilo con  $^{14}\text{C}$ ) y *E. coli*, mostraron que la actividad antibacteriana aumenta con el tamaño de la molécula; observaron asimismo, que la absorción celular es proporcional a la concentración del éster en el medio y que la relación del éster intracelular/extracelular es 3.5, 6.4 y 18.5 para los ésteres metílico, etílico y propílico respectivamente.

Las concentraciones intracelulares del éster que producen una disminución del 50% en la tasa de crecimiento son aproximadamente las mismas y esto hace pensar que al margen del tamaño molecular, las moléculas de los ésteres en su sitio de acción son de igual forma efectivos en su efecto inhibitorio del crecimiento de los microorganismos (109).

#### IV.6. CUANTIFICACION.

Uno de los métodos de determinación de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, es proporcionado por el Reactivo de Millon's que puede ser usado en soluciones acuosas en ausencia de sustancias interferentes y en donde previamente, es necesaria una extracción de los mismos con alcohol o éter (29).

Un método más sensible aun y particularmente usado para el análisis de tejidos y fluidos biológicos para la determinación del ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres metílico, etílico, propílico y butílico, es un método colorimétrico, que hace uso del reactivo 4-amino antipirina, al cual se unen los fenoles (82).

Bajo condiciones de oxidación alcalina, el reactivo se combina con las sustancias fenólicas, específicamente con el grupo hidroxilo de la posición para, para formar un compuesto altamente colorido (82,83).

Para que se lleve a cabo esta reacción, el grupo fenólico debe estar libre y la posición para no sustituida; sin embargo, la presencia de los grupos carboxilo y éster (del ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres respectivamente) en la posición para, no impide unirse, ya que bajo las condiciones usadas, estos grupos son removidos (82,83).

Los para-hidroxibenzoatos, pueden ser fácilmente determinados cuantitativamente en ausencia de sustancias interferentes por absorción ultravioleta. Las curvas de transmisión de los ésteres individuales son idénticas, con una amplia banda de absorción a 245-270 nm. La densidad óptica es medida a 255 nm y la concentración del éster puede ser calculada mediante una curva de calibración estándar (86,87,88).

Los para-hidroxibenzoatos en aceites, pueden ser determinados disolviendo la muestra en éter de petróleo y extrayendo los ésteres con tres porciones de 80% de etanol, antes de medir la densidad óptica (89,90).

Los ésteres individuales pueden ser determinados mediante una separación cromatográfica y una determinación espectrofotométrica ideada por Higuchi (85).

Esta técnica proporciona una medida para analizar la mezcla de los ésteres y determinándola en presencia de sustancias interferentes (85,91).

Austin (92) usando el método de cromatografía líquida, determinó simultáneamente sulfato de morfina, metil parabeno y propil parabeno de una inyección de sulfato de morfina, obteniendo una cuantificación rápida y reproducible de cada componente.

Galiano y colaboradores (93) llevaron a cabo experimentos para valorar la eficacia de los parabenos durante cierto tiempo en emulsiones cosméticas; el crecimiento microbiano fue examinado a intervalos de 25-30 días en varias muestras de cold cream envasadas y almacenadas. Los resultados reportados fueron obtenidos durante un año. El metil, etil, propil y butil ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, fueron determinados en las emulsiones cosméticas por cromatografía líquida.

#### IV.7. APLICACIONES.

Son muy variados los usos de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico como preservativos antimicrobianos, ya que su aplicación se extiende a los campos farmacéutico y cosmético (29)

En vista de su gran actividad, Boehm (64,65) y Suess - (69), acordaron utilizar en general, bajas concentraciones de los parabenos requeridas para preservar los productos antes mencionados (29).

Son sin embargo, muchos factores involucrados para determinar las cantidades óptimas de uso (tales como la forma física de la preparación, la naturaleza de los ingredientes, el pH, el método de manufactura y la manera de uso) por lo cual ha sido conveniente llevar a cabo pruebas apropiadas (29).

Las concentraciones empleadas de los parabenos entonces, varían de producto a producto y deben ser empíricamente determinadas (12).

Sin embargo, se habla de que el metil parabeno que -- tiene alta solubilidad en agua en relación a los otros compuestos, es usualmente empleado en concentraciones de 0.1-0.2% en preparaciones acuosas, mientras que el etil, propil y butil parabenos, son usados en soluciones casi saturadas (16,18).

De acuerdo a otros estudios realizados, se dice que la concentración empleada de los parabenos, es de 0.05-0.15% (17).

El valor de combinación de los ésteres desde el punto de vista de efectividad y también de solubilidad, se reconoció - desde las primeras investigaciones al respecto; en la práctica dos para-hidroxibenzoatos fueron generalmente usados y se nece-



sitó aumentar la concentración de los mismos, para incrementar - también su actividad (29).

Se ha reportado que una combinación de dos o más ésteres, produce una especie de efecto sinérgico en que la eficacia bacteriostática es mayor que la suma de actividades atribuíbles a cada componente y que tal combinación puede ser efectiva contra una amplia variedad de microorganismos (12).

Frecuentemente se usa entonces, una combinación de dos o más ésteres para alcanzar el efecto antimicrobiano deseado y la mezcla típica usada, es la del metil y propil parabenos (15).

A continuación se mencionan las combinaciones más utilizadas de estos compuestos para producir el efecto sinérgico antes mencionado:

Una preparación conteniendo 0.15% de propil parabeno y 0.05% de butil parabeno, tiene una mayor acción antiséptica - que 0.2% de cualquier éster sólo (17).

La mezcla de metil y propil parabenos en la proporción de 2:1 (correspondiendo a concentraciones de 0.06 y 0.03% respectivamente) es frecuentemente usada (18).

También se usa la mezcla de metil y propil parabenos - en la proporción de 10 a 1 respectivamente (15).

En algunos productos comerciales, se han usado con eficiencia las combinaciones siguientes: clorobutanol con EDTA o con parabenos, thimerosal con EDTA o con parabenos y fenil etil - alcohol con parabenos (17).

Se ha observado que combinaciones de los parabenos con fenoxietanol o con imidazolidinil urea, mejoran su actividad --  
contra bacterias (15).

## I V . 7 . 1 APLICACIONES FARMACEUTICAS

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, especialmente los para-hidroxibenzoatos de metilo y propilo, son ampliamente usados en la industria farmacéutica. Son muy efectivos en un amplio rango de pH (3-9) y son usados a un nivel de concentración de 0.2% (17).

Las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral y oftálmica de dosis única, deben ser especialmente preparadas y esterilizadas. Si la presentación es en envases multidosis, se debe incluir un preservativo antimicrobiano en la formulación (3,12,18,20,108).

A causa de los resultados de toxicidad y solubilidad, son pocos los preservativos antimicrobianos aceptables para administración parenteral (20,70,71,72).

El preservativo antimicrobiano más utilizado en administración parenteral, es el alcohol bencílico, seguido de los parabenos (20).

Para soluciones oftálmicas, se debe tener en cuenta que los preservativos antimicrobianos, son potentes sustancias y pueden fácilmente causar irritación ocular, aun en bajas concentraciones (11).

Son entonces pocos compuestos químicos usados como preservativos antimicrobianos en soluciones oftálmicas (7,11).

En términos generales, los para-hidroxibenzoatos no son bactericidas muy apropiados para soluciones oftálmicas y parenterales (12,18).

Gershenfeld y Tomkin (78) usaron 0.05% de etil parabeno, 0.05% de propil parabeno, 0.02% de butil parabeno y 0.15% de metil parabeno para preservar geles nasales y soluciones oftálmicas, observando que en forma de sus sales de sodio, hubo una buena disolución de los parabenos y que el butil parabeno, - ejerció una acción bactericida después de 20 días, mientras que el metil parabeno lo hizo después de 35 días.

Asimismo, se incluyen los preservativos antimicrobianos en la formulación de otras formas farmacéuticas en las cuales los microorganismos son capaces de multiplicarse como en el caso de formas farmacéuticas para administración oral y tópica - que contienen vehículos acuosos (3).

Las preparaciones que proporcionan un excelente medio para el crecimiento microbiano, son la mayoría preparaciones -- acuosas, como suspensiones, emulsiones, jarabes y algunas preparaciones semisólidas, particularmente cremas (16).

En soluciones acuosas, se recomienda adicionar una concentración de 0.05-0.1% de metil parabeno (16).

Las suspensiones y los geles, son excelentes medios para el crecimiento de bacterias y hongos y por lo tanto son adecuadamente conservadas con los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, pero los preservativos catiónicos cuaternarios, son inefectivos (15).

En las emulsiones, la concentración del preservativo antimicrobiano requerida, depende en gran parte de su habilidad para interactuar con los microorganismos, ya que estos pueden residir en el agua, o en la fase lipídica o en ambas y por ello debe estar disponible a un nivel efectivo en ambas fases. Es casi inconcebible que un solo preservativo antimicrobiano pueda distribuirse entre las fases de una emulsión a concentraciones -

efectivas; por lo tanto, se acostumbra incluir en el caso de los para-hidroxibenzoatos, al metil parabeno que es soluble en la fase acuosa y al propil parabeno que lo es en la fase oleosa (15).

En una investigación sobre bases terapéuticas y el pH de la piel, Harry (30), encontró una combinación de 0.15% de para-hidroxibenzoato de metilo, 0.05% de para-hidroxibenzoato de propilo y 0.02% de para-hidroxibenzoato de butilo efectiva para la conservación de cremas contra una amplia variedad de microorganismos. Concentraciones relativamente bajas de metil parabeno (0.025%) y propil parabeno (0.015%) son prescritas en la U.S.P. para pomadas hidrofílicas (73).

Darlington y Guth (77) al conocer las propiedades de la bentonita usada como componente en bases para pomadas, establecieron que el crecimiento de hongos en tales bases, se previene mediante la incorporación de 0.15% de metil parabeno y 0.05% de propil parabeno.

En la preservación de soluciones de vitamina C, se han encontrado ventajas en la estabilidad y reacción neutra de los para-hidroxibenzoatos y se ha recomendado una combinación de 0.18% de metil parabeno y 0.02% de propil parabeno (74,75).

Woo y Huyck (79) encontraron que los jarabes usados en casos de diabetes conteniendo gomas, sacarina y para-hidroxibenzoato de metilo, son estables al almacenamiento.

En el caso de ciertas preparaciones alcohólicas, generalmente 15% de alcohol previene el crecimiento en medio ácido y 18% en medio alcalino y no se requiere de preservativos antimicrobianos (74).

En preparaciones alcohólicas, se recomienda usar de -  
0.05 - 0.1% de los parabenos (74).

En preparaciones antibióticas acuosas, Johnson y Lerrigo (81), encontraron un interesante uso de los para-hidroxibenzoatos como agentes antifungicidas y observaron que el metil y propil parabenos no afectan la estabilidad del sodio cristalino de la penicilina G en solución salina. Esta compatibilidad, se ha confirmado en estudios similares hechos con soluciones acuosas de potasio penicilina G.

Por otro lado, Dietmann (76), sugirió el uso de una combinación de 0.07% de metil parabeno y 0.03% de propil parabeno para mantener la esterilidad en preparaciones farmacéuticas que no puedan ser calentadas.

El crecimiento microbiano en preparaciones para uso oral o externo, generalmente es menos peligroso que en las soluciones parenterales u oftálmicas; no obstante, es deseable que todos los medicamentos se encuentren libres de microorganismos patógenos (18).

#### I V .7.2 APLICACIONES COSMETICAS.

Los preservativos antimicrobianos, juegan también un papel esencial en la protección de la seguridad de los productos cosméticos. La contaminación microbiológica de estos productos, es la mayor preocupación del químico cosmetólogo (10).

Los preservativos antimicrobianos apropiados para usar se en cosméticos, encuentran los mismos requerimientos a los -- presentados en productos farmacéuticos (29).

Son importantes consideraciones, su color, olor, estabilidad, efectividad en medios ligeramente alcalinos y su reacción sobre la piel. Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, poseen las propiedades deseadas y son ampliamente usados en productos cosméticos, tales como cremas, shampoos, lociones, jaleas, pastas, desodorantes, polvos, etc.

Boehm (113) mostró que concentraciones arriba del 1% de para-hidroxibenzoato de metilo, o bien 0.3% de para-hidroxibenzoato de etilo, 0.2% de para-hidroxibenzoato de propilo o 0.15% de para-hidroxibenzoato de butilo, son requeridas en cremas con alto contenido de aceite; asimismo, observó que es ventajoso usar el propil y butil parabeno cuando el contenido de aceite en una preparación incrementa.

En emulsiones y preparaciones acuosas, sin embargo, - combinaciones de metil y etil parabeno con los otros dos ésteres, son convenientes.

Frecuentemente es mencionado el uso de los ésteres de ácido para-hidroxibenzoico para preservar dentífricos (114).

parabeno o la mezcla de 0.2% de metil parabeno y 0.4% de propil parabeno.

En productos hidroalcohólicos como agua de colonia, se agrega 0.0010% de metil parabeno; en colonia y loción para después de afeitar, 0.003% del mismo éster.

En desodorantes sólidos, se usa de 0.15-0.20% de metil parabeno.

En formulaciones de shampoos, se adiciona 0.2-0.4% de metil parabeno o la mezcla de 0.25% de metil parabeno y 0.3% de propil parabeno.

En enjuagues capilares, se usa la mezcla de 0.002% de metil parabeno y 0.04% de propil parabeno.



Burlinson (84), encontró que 0.05% de propil parabeno es más efectivo para preservar gomas tragacanto.

Deakers (115), recomienda el para-hidroxibenzoato de metilo para preservar gomas usadas en máscaras faciales.

Para lociones de manos, se propone una combinación de 0.12% de metil parabeno solubilizado en la fase acuosa y 0.10% de propil parabeno en la fase oleosa (116).

Gorchoff (117), recomienda que el propil parabeno sea usado como antioxidante en productos grasosos que contienen aceites vegetales, ya que se han hecho pruebas utilizando grasas y se ha confirmado que este éster tiene apreciable actividad antioxidante.

La prevención de la rancidez y preservación de cold creams, fueron descritas por Gottfried (118), quien sugirió que 0.25% de propil parabeno o bien 0.1% de propil parabeno más 0.12% de metil parabeno, resultan efectivos. Asimismo, se sugirieron combinaciones similares en aceites para el pelo, cremas para el cutis, pastas acuosas conteniendo almidón y gomas mucilaginosas.

Se ha investigado la efectividad de varias concentraciones de los para-hidroxibenzoatos como preservativos antimicrobianos para productos cosméticos típicos y a continuación se presenta:

En cremas limpiadoras se acostumbra adicionar de 0.1-0.2% de metil parabeno o bien la mezcla de 0.1% de metil parabeno y 0.3% de propil parabeno.

En cremas humectantes se agrega de 0.1-0.3% de metil

C A P I T U L O

V

## CAPITULO V. COMENTARIOS.

La importancia que se le ha conferido a los preservativos antimicrobianos en las industrias farmacéutica y cosmética en los últimos años, ha hecho necesaria la investigación de nuevas estructuras, así como en las ya establecidas, investigar más aún respecto a sus propiedades en general para tener un mayor conocimiento de las mismas y darles una mejor utilidad.

Como se mencionó en el presente trabajo, debido a la naturaleza de una formulación farmacéutica o cosmética dada y del preservativo antimicrobiano en sí, es necesario realizar una cuidadosa selección de éste último para que sea compatible con los excipientes involucrados y de esta forma se evite un posible deterioro del producto.

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, llamados para-hidroxibenzoato de metilo, etilo, propilo y butilo, son preservativos antimicrobianos que se usan mucho en las industrias farmacéutica y cosmética, ya que reúnen propiedades muy similares a las de un preservativo antimicrobiano ideal.

En México, al igual que en Estados Unidos, se usan más los para-hidroxibenzoatos de metilo y propilo, que los otros dos compuestos por razones de solubilidad, además de que en ocasiones se usan en la misma formulación, ya que de esta manera se logra potencializar el efecto de preservación.

Usados en las concentraciones recomendadas son prácticamente inocuos, sin embargo, se han reportado casos de individuos que muestran sensibilidad a ellos.

Por otro lado, a pesar de que en preparaciones parenterales se les puede considerar inocuos en las concentraciones recomendadas para su uso, el efecto que más se conoce en este tipo

de administración, es el de producir reacciones alérgicas.

En lo que se refiere a la información existente acerca de estos compuestos, es muy extensa y actualmente se cuenta con una buena cantidad de artículos que hablan de ellos, sin embargo, se carece de un trabajo que resuma lo concerniente al tema en forma monográfica, por lo cual se ha realizado este trabajo, resumiéndose en él la mayor información bibliográfica posible, lográndose cumplir con ello, con los objetivos planteados.

C A P I T U L O

V I

## CAPITULO VI. RESUMEN.

Los productos farmacéuticos y cosméticos deben ser adecuadamente preservados para evitar que se desarrolle una contaminación microbiológica que ocasione perjuicios en la salud del consumidor y en la estabilidad de los mismos.

Un preservativo antimicrobiano, es aquella parte de las formulaciones farmacéuticas o cosméticas que previene el crecimiento de microorganismos o que reacciona destruyéndolos, ya que en un momento dado pueden dañarlas - si son saprófitos, - pero se encuentran por encima de su tolerancia, o más aun, si son patógenos-, al crecer en ellas.

La preservación no sólo se logra adicionando preservativos antimicrobianos en los productos antes mencionados, sino que debe considerarse además que el sistema de preservación sea estable desde su fabricación hasta su consumo, que su fabricación y control tenga un nivel de higiene requerido, es decir, es indispensable un control de calidad microbiológico tanto de la materia prima como del producto terminado y que el envase sea el adecuado, todo esto para evitar su deterioro.

Por otro lado, se deben considerar los factores que pueden influir en la actividad de un preservativo antimicrobiano, tales como el pH, pues en el caso de los ácidos orgánicos, como el benzoico, por ejemplo, su efectividad depende de la concentración del ácido no disociado y esta será mayor cuanto menor sea el pH; otro de los factores que pudiera presentarse, es el efecto de surfactantes, o sea la interacción con otros excipientes de la formulación en cuestión, ya que en el caso del metil y propil parabenos, interaccionan con macromoléculas hidrofílicas, y al hacerlo, se reduce notablemente su efectividad.

Es necesario que se efectúe una prueba de efectividad para preservativos antimicrobianos, que asegure que un producto farmacéutico o cosmético se encuentre en condiciones óptimas de uso; por todo lo anterior, se debe hacer una selección cuidadosa de los mismos y en la actualidad, existe una gran variedad de preservativos antimicrobianos usados en las industrias farmacéutica y cosmética que va incrementándose año con año y que se seleccionan de acuerdo a las necesidades de una formulación dada.

Los Esteres del Acido Para-Hidroxibenzoico, comúnmente llamados parabenos y que son los para-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo y butilo, son de los preservativos antimicrobianos más conocidos en la actualidad y se dieron a conocer por Sabalitschka en 1924, quien publicó un reporte sobre su aplicación como agentes antibacterianos y antifungicidas al descubrir su efecto antimicrobiano y sus propiedades fisicoquímicas para usarse en productos farmacéuticos y cosméticos.

Más tarde en 1929, se iniciaron estudios sobre estos compuestos, relacionados con el aspecto toxicológico por Schubel y Manger en donde se observó que administrados a una dosis determinada por vía oral, no son tóxicos, comparándolos con el ácido benzoico.

Posteriormente, en los siguientes años, se siguieron efectuando estudios referentes a sus propiedades tanto fisicoquímicas como toxicológicas que muestran por una parte, que son mejores como preservativos fungistáticos que bacteriostáticos y que son más activos contra bacterias gram positivas que contra gram negativas, pero que a medida que se incrementa la longitud de la cadena alquílica, su actividad también aumenta, volviéndose tan eficaces para frenar el desarrollo tanto de bacterias como de hongos y su sitio de acción se encuentra a nivel de membrana celular, desnaturalizando proteínas.

En lo que se refiere al aspecto toxicológico, se ha investigado que usados en las concentraciones recomendadas, no producen toxicidad, excepto para aquellos individuos que muestran sensibilidad a estos compuestos.

La obtención de los mismos, se lleva a cabo a partir del ácido para-hidroxibenzoico y los alcoholes correspondientes en presencia de ácido sulfúrico, en donde se produce el éster deseado.

Los para-hidroxibenzoatos más usados en México, son el metil parabeno y el propil parabeno, por cuestiones de solubilidad.

Por otro lado, se han realizado estudios referentes a la cuantificación de estos compuestos y se usan eficientemente algunos métodos para tal fin.

Con lo que respecta a la aplicación de los mismos, como se mencionó en un principio, es muy variada y las concentraciones recomendadas para su uso, varían según el producto para el que vayan a ser usados. En muchas preparaciones se utilizan el metil y propil parabenos en la misma formulación por el efecto sinérgico que producen.



C A P I T U L O

V I I

## CAPITULO VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Martin, Alfred; J. Swarbrick & Cammarata, A.: "Physical Pharmacy", Ed. Lea & Febiger, 2a. Ed., 1969, Págs.: 318, 535-536.
- 2) Balsam, M.S.; Edward Sagarin: "Cosmetics. Science and Technology", Ed. Board, Second Edition, 1974, Págs. 391-447.
- 3) "The Pharmaceutical Codex", Ed. The Pharmaceutical Press, Eleventh Edition, 1979, Págs.: 231, 324, 556, 614, 733-735.
- 4) Davis, Bernard; R. Dulbecco, et al: "Microbiology", Ed. Harper International, Second Edition, 1978, Pág.: 1475.
- 5) Wedderburn, D.L.: "Advances in Pharmaceutical Sciences", Vol. I. Academic Press, London, 1964, Pág.: 195.
- 6) Orth, D.S.: "Principles of Preservative Efficacy Testing", Cosmetic & Toiletries, 96, 43-52 (1981).
- 7) Harry, R.G.; B.A. Scott, et al: "Harry's Cosmetology", Ed. Leonard Hill Books, Vol. I, 1973, Págs.: 655-677.
- 8) Witton, G. Gray: "Witton's Microbiology", Ed. McGraw-Hill Book Co., Second Edition, 1981, Págs.: 126-127.
- 9) Banfield, F.H., et al: "Problems arising from the use of Chemicals in Food", Chemistry and Industry, 2, 114-119 (1952).
- 10) Steinberg, D.C.: "Cosmetics Preservatives", Drug Cosmetic, 134, [5], 32-35 (1984).
- 11) Hoover, John, E.: "Dispensing of Medication", Merck Publishing Company, Eighth Edition, 1976, Págs.: 20-22, 236-237, 430, 467-468, 559-560.

- 12) Osol, A.; R. Pratt et al: "The United States Dispensatory", J. B. Lippincott Company, 27th Edition, 1973, Págs.: 746-747, 975.
- 13) Murray, S. Cooper: "Quality Control in the Pharmaceutical Industry", Vol. II, New York, 1973, Págs. 169-170.
- 14) Furia, E. Thomas: "Handbook of Food Additives", Vol. I, Ed. CRC Press, Inc., Second Edition, 1980, Págs.: 122-128.
- 15) Lachman, Leon; Herbert A. Lieberman et al: "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lea & Febiger, Second Edition, 1976, Págs.: 174, 179, 182, 201-203, 230-234, 407, 551-553, 645.
- 16) Howard C. Ansel: "Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms", Lea & Febiger, 3a. Ed., 1981, Págs.: 88-91.
- 17) Remington's; Arthur, Osol: "Pharmaceutical Sciences" Easton, 16th Edition, 1980, Págs.: 1225, 1367, 1439, 1509-1511, 1527.
- 18) Martindale: "The Extra Pharmacopeia", The Pharmaceutical Press, 27th Edition, 1979, Págs.: 42, 501, 504, 507, 512, 514, 528, 1272-1287.
- 19) Helman, José: "Farmacotecnia Teórica y Práctica", Cía. Ed. Continental, 1a. Ed., 1980, Págs.: 1485-1509.
- 20) Akers, Michael J.: "Considerations in selecting antimicrobial preservative agents for parenteral product development", -- Pharm. Technol., 8, [5], 36-45 (1984).
- 21) Grundy, W.F.: "Antimicrobial Preservatives in Pharmaceuticals", in Disinfection, Sterilization and Preservation, 2nd. Ed. Block, S. S. Ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977, Págs. - 757-767.

- 22) Wyss, O.: "Bacterial resistance and dynamics of antibacterial activity", Antiseptics, Desinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization, Lea & Febiger, Philadelphia, 1954, Pág.: 158.
- 23) Lamanna, C.; M.F. Mallette: "Basic bacteriology: its biological and chemical background", Williams and Wilkins, Baltimore, 1953, Pág.: 608.
- 24) Albert, W.: "Selective Toxicity", John Wilkery and Sons, New York, 1960, Pág.: 122.
- 25) Rahn, O. & Cohn, J. A.: "Effect of increase in acidity on - antiseptic efficiency", Ind. Eng. Chem., 36, 185 (1944).
- 26) Winsley, B.E. & V. Walters: J. Pharm. Pharmacol., 17 Suppl. 22S, (1965).
- 27) Garrett, E. R.: J. Pharm. Pharmacol., 18, 589 (1966).
- 28) Garrett, E.R.; O.R. Woods: "The optimum use of acid preservatives in oil-water systems: benzoic acid in peanut oil-water", J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 42, 736 (1953).
- 29) Aalto, T.R.; M.C. Firman, et al: "p-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives I. Uses, Antibacterial and Antifungal Studies, Properties and Determination", Journal of the American Pharmaceutical Association Sci. Ed., 42, [8], 449-457 (1953).
- 30) Martini, M. C.; R. Guinet: "Relationship between physico-chemical characteristics and microbiological quality of fluids emulsions", J. Pharm. Belg., 37, [2], 97-107 (1982).
- 31) Bean, H. S.; Heman-Ackah, S.M. et al: Paper CI, Scientific and Technical Symposia presented to the A. Ph. A. convention, Detroit, 1965.

- 32) Winsor, P. A.: "Solvent Properties of Amphiphilic Compounds", Butterworth's Scientific Publications, Londres, 1954: Mfg. Chemist 27, 89 (1956).
- 33) Goodman, L.S.; A. Gilman: "Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Ed. Interamericana, 5a. Ed., 1978, Pág.: 831.
- 34) Sarkani, I.: "Contact Dermatitis from Paraben", Brit. J. - Derm., 72, 345-347 (1960).
- 35) Gershenfeld, L.; D. Perlstein: "Preservatives for preparations containing gelatin", Am. J. Pharm., 111, 277 (1939).
- 36) Gene, Jacobs: "Cosmetic Preservatives - 1981", Cosmetics & Toiletries, 96, 34 (1981).
- 37) Sabalitschka, Th.; K. R., Dietrich et al: "Einfluss der Veresterung Carbozyklischer Säuren auf deren entwicklungsverhindernde Wirkung gegenüber Mikroorganismen", Pharm. Ztg., 71, 834-836 (1924).
- 38) Ladenburg, Fitz.: Liebigs Ann. Chem., 141, 247 (1867).
- 39) Zbarskii, Yu.: Trans. Ukrain. Inst. Exptl. Pharm., 1, 97-105 (1938).
- 40) Cavill, Vincent: J. Soc. Chem. Ind. (London), 66, 175 (1947).
- 41) Stohmann: Journal fur Praktische Chemie, 36, 368 (1887).
- 42) Neidig, C.P.; H. Burrell: Drug Cosmetic Ind., 54, 408-415 (1944).
- 43) S.S.A.: "Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos", 4a. Ed., 1974, Págs.: 590, 971, 972, 1072.

- 44) Plática directa con la Q. Angélica Rosete, S.S.A., Depto. Técnico, Registro de Productos.
- 45) Nobili, Luigi: *Giorn. Farm. Chim.*, 84, 168-175 (1935).
- 46) Blatt, A.H.: "Organic Synthesis", J. Wiley & Sons, Inc. New York, 2, 341-343 (1944).
- 47) Rojahn, C.A.; F. Giral: "Productos Químicos y Farmacéuticos", Editorial Atlante, S.A., 2, 1111 (1966).
- 48) Cavill, G.W.K.; J.M. Vincent: "The Esters of 4-Hydroxybenzoic acid and Related Compounds. Part II. Relationship between the Fungistatic Activity and Physical and Chemical properties of the Esters", *Journal Soc. of Chem. Ind.*, 66, 175-182 (1947).
- 49) Erdos, B.J.; S. A. Bogati: "Estudio sobre la esterificación de los alcoholes butílicos con ácido clorosulfónico como catalizador y método para seguir la marcha de la reacción", *Revista de la Sociedad Química de México*, 1, 223-228 (1967).
- 50) Erdos, B.J.; T.S. Piñeda: "Esterificación del fenol con anhídridos orgánicos empleando ácido clorosulfónico como catalizador", *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 7, 67-74 (1953).
- 51) Erdos, B. J.; L.E. López: "La preparación de ésteres de ácidos aromáticos con ácido clorosulfónico como catalizador", *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 7, 87-92 (1953).
- 52) Revista Publicada por Salicilatos de México, S.A.
- 53) "United States Pharmacopeia" XIX Revision, Merck Publishing, Co., Easton P. A., 1975, Págs.: 84, 258, 430, 561.

- 54) "The Merck Index", Merck & Co., Ninth Edition, 1976, Págs.: 201, 503, 796, 1018.
- 55) "British Pharmacopoeia," London, Her Majesty's Stationery Office, Vol. I, 1980, Págs.: 66, 185-186, 192-194, 286, 375, 407.
- 56) Clinton, R. O.; S. C. Laskowski: "The Preparation of Methyl Ester", Journal of the American Chemical Society, 70, 3135 (1948).
- 57) Anon, Microbiological tests, antimicrobial preservatives effectiveness, United States Pharmacopoeia XIX, United States Pharmacopoeial Convention, Rockford, M. D., 587-592 (1975).
- 58) Kostenbauder, H. B.; F.D. Pisano: "Interaction of Preservatives With Macromolecules II. Correlation of Binding Data With Required Preservative Concentrations of p-Hydroxybenzoates in the Presence of Tween 80", Journal of the American - Pharmaceutical Association, 48, [6], 310-314 (1959).
- 59) Matthews, Carol, J. Davidson, et al: "p-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives II. Acute and Chronic Toxicity in Dogs, Rats and Mice", Journal of the American Pharmaceutical Association, 45 [4], 260-267 (1956).
- 60) Preservation Subcommittee of the CTFA Microbiological Committee. A guideline for the determination of adequacy of preservation of cosmetics and toiletry formulations, TGA Cosm. J. 2, 20-23 (1970).
- 61) Anonymous: "Preservatives keep up to date", Manuf. Chem. 54, 41-43 (1983).
- 62) Koburger, J. A.: "Yeasts and Molds", 225-287 (1984).

- 63) Wallhauber, Von K. H., et al: "Uso de desinfectantes en la Industria Farmacéutica", Pharmazeutische Industrie, 42, [11a], 1177-1185 (1980).
- 64) Boehm, E.; H. Jegliaski: Pharm. Ztg., 73, 30 (1928).
- 65) Boehm, E.: Drug & Cosmetic Ind., 32, 510 (1933).
- 66) Kenneth, S. Alexander; H. Petersen, et al: "Molecular Orbital Calculations for Parabens: A Possible Mechanism of Action", Journal of Pharmaceutical Sciences, 65, [6], 851-855 (1976).
- 67) O. Wyss: "Advances in Food Research", Vol. I, Academic, New York, N. Y., 1948.
- 68) March, Jerry: "Advanced Organic Chemistry", Reactions, Mechanisms and Structure, Second Edition, New York, 1979, Pág.: 601.
- 69) Suess, A.: Am. Perfumer. Essent. Oil Rep., 55, 6 (1936).
- 70) Eisman, P. C.; E. Ebersold, et al: "Stability of Antibacterial Preservatives in Parenteral Solutions II", 52, 2 (1963).
- 71) Lachman, L.; S. Weinstein, et al: "Stability of Antibacterial Preservatives in Parenteral Solutions III", 32, 3 (1963).
- 72) Lachman, L.; T. Urbabyi, et al: "Stability of Antibacterial Preservatives in Parenteral Solutions IV", 52, 3 (1963).
- 73) "United States Pharmacopeia", Fourteenth Revision, Merck Publishing, Co., Easton P. A., 1950, Pág.: 391.
- 74) Parrot, Eugene L.; W. Saski: "Pharmaceutical Technology", Ed. Burgess Publishing Co., 1970, Págs.: 104, 170, 198.
- 75) Anon. Bull. Am. Soc. Hosp. Pharm., 6, 118 (1949).
- 76) Dietmann, H.: Pharm. Ind., 12, 205 (1950).



- 77) Darlington, R. C.; E. P. Guth., This Journal, Pract. Pharm. Ed., 11, 82 (1950).
- 78) Gershenfeld, I.; D. Tomkin, Am. J. Pharm., 11, 385 (1939).
- 79) Woo, M.; C.L. Huyck, Bull. Nat. Formulary Comm., 16, 140 (1948).
- 80) Harry, R.G., Brit. J. Dermatol. Syphilis, 54, (1942).
- 81) Johnson, B.; A. F. Lerrigo, Quart. J. Pharm. Pharmacol., 20, 183 (1947).
- 82) Ettinger, M. B.; C. C. Ruchhoft, et al: Anal. Chem., 23, 1783 (1951).
- 83) Emerson, E., J. Org. Chem., 8, 417 (1943).
- 84) Burlinson, H.Q., J. Pharm. Pharmacol., 7, 489 (1934).
- 85) Higuchi, T.; K. P. Patel, et al: This Journal, 41, 293 (1952).
- 86) Boyce, E. G., J. Assoc. Official Agr. Chemists, 28, 301 (1945).
- 87) Emerson, J., J. Org. Chem., 8, 419 (1945).
- 88) Friend, J. A., J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales, 80, 224 (1947).
- 89) Johnson, H. W., Analyst., 71, 77 (1946).
- 90) Jones, C. N., J. Assoc. Official Agr. Chemists, 30, 486 (1947).

- 91) Fink, D. W.; H. C. Fink, et al: "Difference spectrophotometric determination of p-hydroxybenzoic acid in presence of its esters", *J. Pharm. Sci.*, 67, [6], 837-839 (1978).
- 92) Austin, Kevin L.; E. L. Mather: "Simultaneous quantitation of morphine and paraben preservatives in morphine injectables", *J. Pharm. Sci.*, 67, [11], 1510-1511 (1978).
- 93) Galiano, F.; a. Bettero, et al: "Studio sull'efficacia preservante degli esteri dell'acido 4-idrossibenzoico in forme cosmetiche", 37, [10], 314-319 (1982).
- 94) Passie, S. J.; D. Thigpen, et al: "p-Hydroxybenzoic Acid - Esters as Preservatives III. The Physiological Disposition of p-Hydroxybenzoic Acid and Its Esters", *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 45, [4], 268-273 (1956).
- 95) Rudner, Earl, J.; E. Cronin, et al: "Contact sensitivity to p-Hydroxybenzoate Esters", *Dermatology Digest*, 51-54 (1966).
- 96) Hjorth, N.; C. Trolle-Jassen, Trans., *St. John. Hosp. Derm. Soc.*, 49, 127 (1963).
- 97) Klaschka, F., *Zbl. Haut. Geschlechtskr.*, 37, 312 (1958).
- 98) Slotze, R., *Acta Derm.-Venerol.*, 46, 54 (1966).
- 99) Bonnevie, P., *Nord. Med.*, 6, 688 (1940).
- 100) Sokol, H., *Drug Standards*, 20, 89 (1952).
- 101) Schorr, W. F., *Cosmetics and Perfumery*, 89, 25 (1974).
- 102) Schamberg, I. L.: "Allergic Contact Dermatitis to Methyl and Propyl Paraben", *Arch. Derm.* 95, 626-628 (1967).

- 103) Evans, Susan: "Epidermal Sensitivity to Lanolin and Parabens, Occurrence in Pharmaceutical and Cosmetic Products", *Brit. J. Derm.*, 82, 625 (1970).
- 104) Brauer, E. W.; J. R. Simpson: "Parabens in Cosmetic Creams", *Contact Dermatitis*, 5, 265 (1979).
- 105) Fischer, A. A.: "The Paraben Paradoxes", *Cutis*, 12, 830-832 (1973).
- 106) William, P. S.; A. H. Mohajerin, et al: "Paraben Sensitivity", *Arch. Derm.* 93, 721-723 (1966).
- 107) Sbarbati, N.; N. Ethel: "Estabilidad de Medicamentos", Ed. El Ateneo, 1975, Págs. 100, 103, 109, 112.
- 108) McDonald, Etta Mae: "The Preservative p-Hydroxybenzoic Acid Esters", *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 181-182 (1965).
- 109) Lang, Mildred; R. M. Rye: "The uptake by *Escherichia coli* and growth inhibitory properties of methyl, ethyl and propyl p-hydroxybenzoates. British Pharmaceutical Conference", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, Suppl., 160-161 (1972).
- 110) Judis, Joseph: "Studies on the Mechanism of Action of Phenolic Disinfectants I. Release of Radioactivity from Carbon<sup>14</sup>-Labeled *Escherichia coli*", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, [3], 261-265 (1962).
- 111) Huppert, Milton: "The Antifungal of a Homologous Series of Parabens", *Antibiotics and Chemotherapy*, 7, [1], 29-36 (1959).
- 112) Schubel, K.; J. Manger, *J. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 146, 208-222 (1929).

- 113) Boehm, E.; H. Jeglinski. Pharm. Ztg., 73, 30 (1968).
- 114) Anon., Bull. Am. Soc. Hosp. Pharm., 6, 118 (1959).
- 115) Deakers, T., Drug & Cosmetic Ind., 38, 479 (1966).
- 116) Deakers, T., Drug & Cosmetic Ind., 38, 37 (1966).
- 117) Gorchoff, N. T., Drug & Cosmetic Ind., 46, 682 (1966).
- 118) Gottfried, D., Perfumery Essent. Oil Record, 37, 93 (1970).